

Université de Montréal

Caractérisation des gènes cytochrome oxydase (I, II et III) ainsi que des 22 ARN
de transfert mitochondriaux dans la maladie d'Alzheimer

par

Pierre Chagnon

Département de pathologie et biologie cellulaire

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)
en biopathologie cellulaire

Septembre, 1999

© Pierre Chagnon, 1999



Université de Montréal

Caractérisation des gènes cytochrome oxydase (I, II et III) ainsi que des 22 ARN
de transfert mitochondriaux dans la maladie d'Alzheimer

par

Pierre Chagnon

Département de pathologie et biologie cellulaire

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)
en biopathologie cellulaire

Septembre, 1999

© Pierre Chagnon, 1999



Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée:

Caractérisation des gènes cytochrome oxydase (I, II et III) ainsi que des 22 ARN
de transfert mitochondriaux dans la maladie d'Alzheimer

Présenté par :

Pierre Chagnon

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

M. Réjean Morais, Ph.D.

M. Guy Doucet, Ph.D.

M. Vincent Raymond, M.D., Ph.D.

M. Denis Gauvreau Ph.D.

SOMMAIRE

La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie neurodégénérative caractérisée par la détérioration progressive et irréversible de toutes les facultés intellectuelles. Les récents développements scientifiques, et en particulier les apports de la génétique moléculaire, ont permis des avancées considérables dans la compréhension de l'étiologie de cette maladie. En fait, il s'agit d'une maladie dont les causes, tant environnementales que génétiques, sont nombreuses. Malgré ces progrès remarquables, les causes précises de la majorité des cas de MA demeurent en cette année 1999, inconnues. Il faut en déduire que d'autres facteurs restent à être identifiés.

Plusieurs indices biochimiques et génétiques suggèrent qu'une anomalie mitochondriale pourrait être impliquée dans le développement de la MA. Ainsi, on rapporte que l'activité de l'un des maillons de la chaîne respiratoire mitochondriale (complexe cytochrome oxydase) est diminuée en comparaison d'individus normaux du même âge. La littérature scientifique suggère très fréquemment que le génome mitochondrial pourrait être la cause de ce déficit enzymatique. Cependant, aucune publication n'a pu jusqu'à ce jour lever le voile sur le rôle exact que joue ce génome dans la MA. Pour cette raison, nous avons amorcé un programme de recherche ayant pour but premier d'étudier la séquence de l'ADN mitochondrial (ADNmt) d'un nombre important de patients et de témoins provenant, pour la grande majorité, de la population fondatrice du Saguenay-Lac-St-Jean. Notre objectif était de déterminer si le déficit de l'activité cytochrome oxydase (CO) était associé à des variations de l'ADNmt situées dans les gènes pouvant affecter directement l'activité de cette enzyme (gènes COI, COII, COIII et les 22 ARN de transfert mitochondriaux).

Avant de débiter l'analyse du génome mitochondrial, nous avons mesuré l'activité CO dans différentes régions du cortex cérébral de patients décédés de la MA et comparé l'activité mesurée à celle d'individus normaux ou décédés suite au développement d'une autre maladie neurodégénérative (démence à corps de Lewy, maladie de Parkinson ou démence cérébrovasculaire). Ainsi, nous avons démontré que l'activité CO était significativement diminuée dans le cortex frontal et pariétal des patients Alzheimer. Par contre, nous ignorons pourquoi certaines régions cérébrales, comme l'hippocampe qui est une structure très affectée par la MA, présentent une activité CO comparable à celle des témoins. D'autres part, nous avons observé que les patients Alzheimer de type sénile ayant une durée de maladie très courte ont une activité CO dans le cortex frontal et pariétal encore plus faible que ceux qui survivent plus de dix ans à la maladie. Comme le niveau d'activité CO est un reflet de l'activité neuronale, on ne peut dire si cette diminution de fonction du complexe CO est réellement impliquée dans le développement de la MA ou si elle n'en est qu'une conséquence. Pour pouvoir incriminer ce déficit enzymatique, il faudrait pouvoir l'associer à une ou plusieurs anomalies génétiques, comme c'est le cas dans les cytopathies mitochondriales. Puisque le complexe CO est composé d'unités codées par le génome nucléaire et mitochondrial, la cause du déficit enzymatique pourrait se situer à l'intérieur de l'un de ces deux génomes. Pour notre étude, nous avons analysé toutes les régions du génome mitochondrial pouvant influencer le niveau d'activité de cette enzyme. C'est-à-dire les trois gènes indispensables à la formation du complexe CO (CO I, II et III) ainsi que les 22 ARN de transfert mitochondriaux (ARNt) qui servent à leur traduction. Au total, nous avons détecté la présence de 95 variations différentes à l'intérieur du génome mitochondrial de 69 patients Alzheimer et de 83 individus témoins.

Ce qui ressort essentiellement de cette analyse génétique, c'est qu'il n'y a pas de différence majeure dans la séquence de l'ADNmt (gènes CO I, II, III et les 22 ARNt) entre les patients et les témoins. Nous pouvons donc affirmer que la baisse d'activité CO observée dans le cortex cérébral de la majorité des patients Alzheimer n'est pas causée directement par une anomalie de ces gènes mitochondriaux. En conséquence, l'hypothèse voulant que le génome mitochondrial soit la cause de ce déficit enzymatique et qu'il ait un rôle dans la MA est rejetée. Il existe seulement deux autres possibilités principales qui pourraient expliquer l'origine de ce déficit enzymatique. Soit que l'un des gènes nucléaires impliqués dans la formation ou le fonctionnement du complexe CO est défectueux ou finalement soit que cette diminution d'activité CO ne résulte que d'une adaptation de la chaîne respiratoire à une diminution importante de l'activité synaptique et du métabolisme cellulaire dans le cortex des patients Alzheimer.

Néanmoins, nous ne pouvons pas totalement exclure la possibilité que l'ADNmt soit impliqué dans l'étiologie de la MA. En effet, nous avons observé qu'un nombre restreint de sujets sont porteurs de variations que l'on retrouve uniquement chez les individus qui ont développé la MA. Cependant, puisque ces variations sont relativement rares, elles ne sont certainement pas la cause du déficit CO présent chez la majorité des patients. Une de ces variations est un haplotype composé des polymorphismes situés aux positions 5633 (ARNt^{Ala}), 7476 (ARNt^{Ser}) et 15812 (cytochrome b) que l'on a détecté chez 4,7% des patients mais chez aucun des 83 témoins. Étant donné que l'une de ces variations (15812) est déjà associée à une autre maladie neurodégénérative, que ces trois modifications sont modérément conservées et que leur fréquence dans différentes populations a été établie à environ 0,1%, nous pensons que la présence de cet haplotype pourrait représenter un risque de développer la MA. Il est donc possible

que cette anomalie de l'ADNmt explique un faible pourcentage des cas de MA. Cependant, cette affirmation n'est pour l'instant que spéculative et ne sera vérifiée que lorsque d'autres groupes de recherche auront confirmé ou infirmé cette association.

D'autres résultats ont également été obtenus concernant, entre autres, 2 modifications de l'ADNmt qui avaient déjà été associées à la MA dans des études antérieures. Nous avons détecté ces deux variations (4336/ARNt^Q et 5460/ND2) aussi bien chez les patients que chez les témoins; elles ne sont donc pas associées à la MA, du moins pas dans notre population.

Par ailleurs, le troisième article (Chagnon *et al.*, 1999) de la section résultat de cette thèse, rapporte que nous avons observé une différence significative ($p < 0.05$) entre les cas Alzheimer et les témoins pour 2 modifications différentes aux positions 709 (ARNr 12S) et 15929 (ARNt^{Thr}). Ces deux modifications sont trois fois plus fréquentes chez les témoins que chez les patients. Il s'agit en fait d'une erreur que nous avons commise, puisque lors de la rédaction de l'article, nous avons établi la valeur du seuil de signification à 0.05 alors qu'il aurait dû être de 0.001. Cette différence nous oblige à modifier notre interprétation de ces résultats. Dans l'article en question, nous avons envisagé la possibilité que ces deux variations puissent être des facteurs de protections pour la MA. Maintenant, nous croyons que le hasard est probablement la cause de cette différence et qu'il n'y a pas lieu de croire que ces deux variations améliorent le rendement de la chaîne respiratoire et se traduirait, par exemple, par de meilleures capacités d'oxydoréduction, moins de radicaux libres et moins de chance de développer la MA.

Dans la dernière portion de notre étude, nous avons mesuré le taux de mutations somatiques (mutations ponctuelles qui s'accumulent au cours de la vie d'un individu) de plusieurs sujets et démontré qu'il n'y a pas plus de mutagenèse dans le gène COIII de l'ADNmt chez les patients que chez les témoins. Ce mécanisme, souvent cité dans la littérature pour sa participation au phénomène du vieillissement cellulaire, ne serait pas la cause du déficit CO et ne jouerait aucun rôle dans l'étiologie de la MA.

En conclusion, cette étude du génome mitochondrial a nécessité l'analyse de la séquence de près de 10 kb d'ADN chez plus de 150 individus (au total, plus de 1 million de nucléotides analysés). Malgré l'ampleur de cette tâche, nous savions dès le départ que cette étude complète des trois gènes CO et des 22 ARNt mitochondriaux était, en quelque sorte, préliminaire. En effet, comme la MA est une maladie complexe et que les gènes connus ^{ai} faisant ^e partie de son étiologie n'expliquent qu'un faible pourcentage de cas Alzheimer, il était peu probable de trouver un gène muté pouvant expliquer une majorité de cas. Le mieux que nous pouvions espérer était d'identifier des variations présentes chez certains patients mais pas chez les témoins. Le problème avec ce type de résultats, c'est qu'il est pratiquement impossible d'arriver à des conclusions fermes. Ainsi, pour l'haplotype que nous avons détecté chez un certain nombre de patients, il faudra attendre la confirmation de d'autres études ultérieures pour conclure définitivement de son implication dans la MA.

Quoi qu'il en soit, cette étude a déjà atteint un objectif très important puisque nous savons maintenant que les trois gènes CO et les 22 ARNt mitochondriaux, qui étaient des gènes candidats importants, ne sont pas la cause du déficit CO qui est observé chez la majorité des patients Alzheimer.

TABLE DES MATIERES

Sommaire	iii
Liste des tableaux	xii
Liste des figures	xiii
Abréviations	xiv
Remerciements	xv
1 - INTRODUCTION	1
1.1 La maladie d'Alzheimer	7
1.1.1 Neuropathologie de la maladie d'Alzheimer	9
1.1.1.1 Les plaques séniles	9
1.1.1.2 Les dégénérescences neurofibrillaires	11
1.1.1.3 Autres structures anormales	12
1.1.1.4 Déficit de certains neurotransmetteurs	13
1.1.2 Génétique de la maladie d'Alzheimer	14
1.1.2.1 Gène APP	15
1.1.2.2 Gène PS1	17
1.1.2.3 Gène PS2	19
1.1.2.4 Apolipoprotéine E	20
1.1.2.5 Autres gènes	21
1.2 La mitochondrie	23
1.2.1 Bioénergétique cellulaire	24
1.2.2 La chaîne respiratoire mitochondriale	25
1.2.3 Le complexe cytochrome oxydase	28

1.3	L'ADN mitochondrial	29
1.3.1	Transmission maternelle	30
1.3.2	Hétéroplasmie et mutations somatiques de l'ADNmt	31
1.3.3	Code génétique	33
1.3.4	Expression du génome mitochondrial	34
1.3.4.1	Transcription de l'ADN mitochondrial	34
1.3.4.2	Réplication de l'ADN mitochondrial	36
1.3.4.3	Régulation de l'expression du génome mitochondrial	36
1.4	Les cytopathies mitochondriales	37
1.5	Modifications des fonctions mitochondriales dans la maladie d'Alzheimer	40
1.5.1	Déficit de l'activité CO	41
1.5.2	Augmentation du stress oxydatif	44
1.5.3	Modifications du génome mitochondrial	48
1.6	Hypothèses de travail	52
2	RÉSULTATS	56
2.1	Article publié dans la revue NeuroReport 6 : 711-715 (1995). Distribution of brain cytochrome oxidase activity in various neurodegenerative diseases	56
2.2	Article publié dans la revue Alzheimer's Research 2 : 237-242 (1996). Brain mitochondrial DNA polymorphism and cytochrome oxidase activity in Alzheimer disease	71
2.3	Article publié dans la revue American Journal of Medical Genetics 85 : 20-30 (1999). Phylogenetic analysis of the mitochondrial	

genomes indicates significant differences between patients with Alzheimer disease and controls in a French-Canadian founder population	91
2.4 Validation de la méthode de séquençage automatique pour la détection des variations hétéroplasmiques et homoplasmiques de l'ADNmt	120
2.5 Détection de mutations somatiques de l'ADNmt chez 5 patients Alzheimer et 5 individus témoins.	124
3 - DISCUSSION	128
3.1 Les sujets (patients et témoins)	128
3.2 Déficit de l'activité cytochrome oxydase chez les sujets Alzheimer de type sénile	130
3.2.1 Activité CO reliée à l'âge du début de la maladie	132
3.2.2 Activité CO reliée à la durée de la maladie	133
3.2.3 Le déficit de l'activité CO dans la MA est-il une cause ou un effet ?	134
3.3 Analyse du génome mitochondrial	138
3.3.1 Séquençage des 3 gènes CO et des 22 ARNt de l'ADNmt chez 69 patients Alzheimer et 83 individus témoins	141
3.3.2 Modifications de l'ADNmt associées aux patients	146
3.3.3 Modifications de l'ADNmt associées aux témoins	150
3.4 Mutations somatiques de l'ADNmt chez les patients et témoins	152

4 - CONCLUSION	154
----------------	-----

5 - RÉFÉRENCES	157
----------------	-----

ANNEXES

I	Nature et position des mutations somatiques détectées dans les clones Alzheimer et témoins	190
II	Électrophorégrammes représentant les 17 réactions de séquences nécessaires pour couvrir les 22 ARNt et les trois gènes CO de l'ADNmt d'un seul individu	195
III	Alignement et comparaison de 50 séquences d'ADNmt (réaction L5342/H5903) à l'aide du logiciel « <i>Sequencher</i> »	213
IV.	Position et nature des 95 modifications de l'ADNmt détectées suite au séquençage des trois gènes CO et des 22 ARNt chez 50 patients Alzheimer de type sénile et de individus témoins	221

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAUX

- | | | |
|-----|---|-----|
| I. | Nombre et fréquence des mutations somatiques détectées chez 5 patients Alzheimer et 5 témoins | 126 |
| II. | Nature des mutations somatiques de 61 clones représentant les 5 patients Alzheimer et de 64 clones représentant les 5 témoins | 127 |

LISTE DES FIGURES

FIGURES

- | | | |
|----|--|-----|
| 1. | Morphologie d'une mitochondrie en microscopie électronique | 23 |
| 2. | Schéma représentant la chaîne respiratoire et le cycle de Krebs à l'intérieur de la mitochondrie | 27 |
| 3. | Représentation schématique du génome mitochondrial humain | 30 |
| 4. | Modification hétéroplasmique à la position 6480 dont la fréquence varie de 0 à 100% | 122 |
| 4. | Détection de la variation 15812 chez un patient Alzheimer (A) et chez un individu témoin (G) | 123 |
| 5. | A) Détection chez une série de patients de la modification 8251 par la digestion du fragment PCR L7900/H8560 avec l'enzyme <i>Hae III</i>
B) Détection de la modification 10550 par la digestion du fragment PCR L10297/H10774 avec l'enzyme <i>Nla III</i> . | 123 |

ABRÉVIATIONS

ADN	:	Acide désoxyribonucléique
ADNmt	:	ADN mitochondrial
ADNn	:	ADN nucléaire
AMPC	:	Adénosine monophosphate cyclique
APP	:	Amyloid precursor protein
ARN	:	Acide ribonucléique
ARNt	:	ARN de transfert
ARNr	:	ARN ribosomal
ARNm	:	ARN messenger
ATP	:	Adénosine triphosphate
ADP	:	Adénosine diphosphate
CF	:	Cortex frontal
CP	:	Cortex pariétal
CO	:	Cytochrome oxydase
DNF	:	Dégénérescence neurofibrillaire
kb	:	Kilobases
MA	:	Maladie d'Alzheimer
Mg	:	Milligramme
Min	:	Minute
NADH	:	Nicotinamide adénine dinucléotide
OH ₈ dG	:	8-hydroxy-2'-deoxyguanosine
pb	:	Paire de bases
PCR	:	Polymerase chain reaction
PDAT	:	Maladie d'Alzheimer de type présénile
PS1	:	Présiniline 1
PS2	:	Présiniline 2
SDAT	:	Maladie d'Alzheimer de type sénile
SLSJ	:	Saguenay-Lac Saint-Jean
SOD	:	Superoxyde dismutase
µl	:	Microlitre

REMERCIEMENTS

C'est en tout premier lieu à M. Denis Gauvreau, celui qui a dirigé cette thèse, que s'adressent mes remerciements. Pour la confiance qu'il a placée en moi, ses encouragements et son professionnalisme, je tiens à lui exprimer ma plus profonde gratitude.

Pour son soutien moral, son appui et pour l'aide apportée à la rédaction de cette thèse, je tiens à remercier ma conjointe Nathalie ainsi que ma petite fille Marie. Je remercie également mes parents pour l'amour et l'encouragement qu'ils m'ont manifestés depuis le début de ma formation académique.

Merci à toute l'équipe du Projet IMAGE et de la Société Algène Biotechnologies. Spécialement à Anik Boudreau pour la correction du texte et de ses nombreux commentaires. Mes remerciements vont également à plusieurs personnes qui à un moment donné ont participé de loin ou de près à cette thèse : Christine Bétard, Yves Robitaille, Mario Filion et Majid Belouchi.

Mes pensées vont également à tous les patients et familles ayant contribué à cette étude. Ils ont été une part importante de ma motivation quotidienne et de mon désir de toujours vouloir repousser les frontières de la connaissance.

1 - INTRODUCTION

La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie neurodégénérative caractérisée par une détérioration progressive des facultés cognitives (la mémoire, le langage, les capacités visuo-spatiales, le jugement, l'orientation spatio-temporelle, etc.). Le processus dégénératif évolue d'une phase initiale de pertes de mémoire assez bénignes jusqu'à une perte totale d'autonomie. Au plan neuropathologique, la MA est caractérisée par la présence excessive de deux lésions distinctes, les plaques séniles et les dégénérescences neurofibrillaires, abondantes dans l'hippocampe et le néocortex.

Même si cette maladie est connue depuis 1907, son étiologie complète n'est pas encore élucidée. Jusqu'à présent, plusieurs facteurs génétiques ont été associés à la MA, mais la majorité des cas semblent être de nature sporadique, suggérant l'implication de facteurs environnementaux. Pour ce qui est des aspects génétiques, plusieurs gènes (préséniline 1 sur le chromosome 14, préséniline 2 sur le chromosome 1 et l'APP sur le chromosome 21) ont été associés à la forme présénile de la MA (début de la maladie avant 65 ans), alors que un des allèles du gène de l'apolipoprotéine E sur le chromosome 19 est un facteur de risque important pour la forme sénile (début de la maladie après 65 ans) et la forme présénile. Pourtant ces différents gènes n'expliquent qu'une faible portion des cas de MA; il y a donc forcément d'autres facteurs génétiques impliqués dans le développement de la MA qui ne sont pas encore identifiés.

Dans la littérature scientifique, on soulève fréquemment la possibilité qu'une anomalie mitochondriale soit l'un de ces facteurs. D'abord, il est reconnu que le déclin de l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale contribue au phénomène du vieillissement et pourrait être impliqué dans certaines maladies liées à ce processus. De plus, certaines manifestations de la MA, comme la diminution du métabolisme du glucose et la présence accrue de radicaux libres, suggèrent une défaillance mitochondriale. Par ailleurs, un déficit de l'activité cytochrome oxydase (CO), un des quatre complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale, a été observé chez plusieurs patients décédés de la MA. Enfin, certaines anomalies génétiques de l'ADN mitochondrial (ADNmt) ont également été détectées chez des patients atteints de MA.

L'ensemble de ces observations suggère que la MA présente certains aspects d'une maladie mitochondriale. Cependant, l'implication directe du génome mitochondrial dans l'étiologie de cette maladie demeure incertaine. Même si nombre de scientifiques croient que l'ADNmt pourrait jouer un rôle dans la MA, peu d'études se sont penchées sur l'analyse de ce génome chez des patients Alzheimer et la plupart de ces études sont incomplètes. En effet, dans certains cas, le nombre de sujets est très limité tandis que dans d'autres cas, la portion du génome mitochondrial analysée est minime. De plus, nous ne savons toujours pas si la diminution d'activité du complexe enzymatique CO joue un rôle réel dans le développement de cette maladie. De toute évidence, même si la littérature parle souvent d'un déficit mitochondrial dans la MA, rien ne prouve pour l'instant que l'ADNmt puisse influencer d'une quelconque façon le développement de cette maladie. Par conséquent, une étude plus complète est nécessaire afin de clarifier cette situation et de déterminer plus précisément si la MA est une maladie mitochondriale.

Notre projet de recherche porte directement sur l'analyse du génome mitochondrial chez un nombre important de patients décédés de la MA (n=69) et d'individus témoins (n=65) appariés pour l'âge et le sexe, provenant de la même population fondatrice du Saguenay-Lac-St-Jean, au Québec. L'ADNmt de 18 cerveaux témoins provenant de la région de Montréal a également été analysé. Dans le cadre de cette étude, nous avons aussi mesuré dans un premier temps, le niveau d'activité CO d'un certain nombre de patients Alzheimer, de témoins et de patients souffrant d'autres maladies neurodégénératives (maladie de Parkinson, démence à corps de Lewy, démence cérébrovasculaire). Cette étape préliminaire avait pour but de confirmer la présence de ce déficit enzymatique chez les patients Alzheimer avant d'entreprendre l'analyse génétique.

L'objectif principal de notre étude génétique est de déterminer si certaines modifications de l'ADNmt se retrouvent plus fréquemment chez des patients Alzheimer comparativement aux individus témoins. Pour ce faire, nous avons séquencé toutes les régions du génome mitochondrial pouvant affecter le niveau d'activité CO, soit les trois gènes CO (I, II et III) ainsi que les 22 ARN de transfert (ARNt) de l'ADNmt. Au total, cette étude représente 150 sujets et environ 10 000 paires de bases à séquencer pour chacun d'entre eux ; nous avons donc accumulé plus d'un mégabase d'information génétique.

Essentiellement, nous recherchons des variations dans l'ADNmt pouvant avoir des conséquences fonctionnelles chez les patients mais pas chez les témoins (changement d'acides aminés ou modification de l'un des ARNt). Les séquences de tous les sujets (Alzheimer et témoins) ont été analysées et comparées de façon à mettre en évidence la présence de modifications

génétiqes. Une base de données contenant les séquences variables de tous les sujets a été construite et la fréquence de chaque allèle de toutes ces modifications comparée entre patients et témoins à l'aide d'un test statistique (Fisher's exact test). Par cette analyse, nous avons pu déterminer s'il y avait des différences significatives entre les deux groupes. Nous avons également construit un arbre phylogénétique de tous les sujets faisant partie de cette étude, ce qui nous a permis de comparer non seulement la fréquence individuelle de toutes les variations de l'ADNmt mais également la présence simultanée de plusieurs modifications à l'intérieur d'un même embranchement phylogénétique. En d'autres termes, nous avons voulu comparer le ratio de patients et de témoins parmi les individus ayant le même génotype mitochondrial.

L'étude du génome mitochondrial a pour but d'élucider le rôle du déficit CO dans la MA. Si aucune différence n'est détectée dans l'ADNmt des patients, nous pourrions affirmer que la cause de ce déficit CO ne provient pas d'une mutation dans ce génome (gènes CO et ARNt). Par contre, la découverte d'une ou plusieurs variations de l'ADNmt affectant soit la structure d'une des protéines CO ou encore celle d'un ARNt chez un nombre important de patients mais pas de témoins, indiquerait que le génome mitochondrial et le déficit CO pourraient avoir une part de responsabilité dans l'étiologie de la MA. Il ne resterait qu'à confirmer cette observation dans d'autres populations ou de démontrer un effet sur la chaîne respiratoire par une étude fonctionnelle.

Par ailleurs, la génétique particulière du génome mitochondrial fait en sorte que le déficit CO pourrait également être causé, non pas par une modification homoplasmique, mais par une accumulation excessive de différentes mutations somatiques de l'ADNmt. Ces mutations sont généralement acquises après la

naissance et, pour plusieurs raisons, s'accumulent principalement dans les cellules post-mitotiques (cellules musculaires et neurones). La théorie du vieillissement mitochondrial est d'ailleurs basée sur ce principe, c'est-à-dire que l'accumulation d'erreurs dans l'ADNmt affecterait négativement la chaîne respiratoire ce qui causerait une augmentation du niveau de stress oxydatif. Cette mutagenèse pourrait donc être l'une des causes de la diminution d'activité CO dans la MA.

Le deuxième objectif de notre étude du génome mitochondrial était de vérifier si le taux de mutations somatiques est plus élevé chez les patients que chez les témoins. Contrairement aux modifications homoplasmiques qui peuvent être détectées directement par le séquençage d'un fragment PCR, les mutations somatiques sont hétéroplasmiques et faiblement représentées ce qui rend nécessaire une étape supplémentaire de clonage. Il faut dans certains cas séquencer quelques centaines de clones différents par individu pour détecter ces mutations qui sont parfois très rares.

L'étude des mutations somatiques a été la dernière étape de notre projet de recherche. Les sujets qui en font partie ont été sélectionnés en fonction de certaines anomalies homoplasmiques de l'ADNmt détectées dans la première phase de séquençage. Par cette approche, nous visons deux objectifs différents. Le premier était de comparer le niveau général de mutations somatiques entre patients et témoins et le deuxième de vérifier si certaines modifications homoplasmiques ont des conséquences fonctionnelles. Cette dernière hypothèse s'appuie sur le fait que si une modification de l'ADNmt a des conséquences pathologiques, elle doit obligatoirement entraver le fonctionnement de la chaîne respiratoire et donc augmenter le niveau de stress oxydatif. Or, selon certaines études, le stress oxydatif augmente les chances de mutations somatiques au sein

du génome mitochondrial. En principe, si une modification homoplasmique est pathologique, elle devrait être associée à un taux de mutagenèse plus élevé que chez des témoins porteurs d'aucune anomalie.

Bien que nous ayons publié deux articles portant sur les mesures d'activité du complexe CO et la MA, nous voulons souligner que le coeur de cette thèse réside dans l'analyse génétique du génome mitochondrial et non dans les mesures d'activité enzymatique. Les nombreuses publications à ce sujet, ainsi que nos résultats sur les mesures d'activité CO, confirment que la fonction de cette enzyme est bel et bien diminuée dans le cerveau des patients Alzheimer. La question cruciale est de déterminer si ce défaut enzymatique est impliqué dans le développement de la maladie ou s'il en est uniquement une conséquence.

Les résultats concernant les mesures d'activité CO et l'analyse du génome mitochondrial sont présentés sous forme de trois articles dans la section Résultats. L'article #1, publié en 1995 dans la revue "NeuroReport", concerne le dosage enzymatique du complexe CO de huit individus témoins et de patients atteints de différentes formes de maladies neurodégénératives: Alzheimer de type sénile (n=10), Alzheimer de type présénile (n=10), démence à corps de Lewy (n=5), démence cérébrovasculaire (n=5) et maladie de Parkinson (n=5). Ces mesures d'activité ont été effectuées dans 6 régions cérébrales différentes. L'article #2 a été publié en 1996 dans la revue "Alzheimer's Research" et démontre un déficit de l'activité CO plus prononcé chez les patients qui ont une durée de maladie inférieure à 5 ans. Nous avons également amorcé dans cette étude une première analyse génétique des trois gènes CO en détectant une douzaine de polymorphismes de restriction chez 31 patients Alzheimer de type sénile, 16 patients préséniles ainsi que 18 témoins. Étant donné le nombre restreint de sujets

(surtout en ce qui concerne les témoins), les résultats obtenus ne sont pas très concluants. Finalement, le troisième article publié en 1999 dans la revue "American Journal of Medical Genetics" contient toutes les données de séquençage de l'ADNmt de 69 patients Alzheimer et de 83 individus témoins. Il contient également une analyse phylogénétique complète de tous les sujets. En plus de ces trois articles la partie Résultats contiens également deux autres sections. L'une porte sur la validation de la méthode de séquençage automatique pour la détection des variations hétéroplasmiques et homoplasmiques de l'ADNmt. Enfin, la dernière section présente les données sur les mutations somatiques. Comme cette étude n'a pas encore fait l'objet d'une publication, les données sont présentées intégralement.

Avant d'aller plus loin, nous allons définir plus précisément ce qui est connu actuellement de la neuropathologie et de la génétique de la MA. De plus, nous nous pencherons sur les fonctions de la mitochondrie, sur la chaîne respiratoire, le complexe CO et le génome mitochondrial. Nous survolerons également les cytopathies mitochondriales, qui sont des maladies causées par différentes anomalies de l'ADNmt ainsi que d'aborder les différents déficits mitochondriaux associés à la MA. Nous terminerons cette introduction en présentant les hypothèses de travail, c'est-à-dire les raisons qui justifient cette étude du génome mitochondrial dans la MA et les réponses que nous voulons apporter.

1.1 La maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie dégénérative qui entraîne la destruction progressive des neurones du cerveau. Elle se caractérise par des

troubles de la mémoire, des troubles du langage, l'incapacité d'effectuer certains mouvements, l'incapacité d'identifier ou de reconnaître les choses et une altération du jugement et du raisonnement. C'est une maladie qui évolue en général très lentement; ainsi, les facultés du malade déclinent progressivement. Il peut s'écouler plusieurs années entre l'apparition des premiers symptômes et l'établissement du diagnostic clinique. La durée moyenne de survie est de 8 à 10 ans, bien qu'elle puisse varier beaucoup d'un individu à l'autre.

La MA est la quatrième cause de décès dans les pays industrialisés, après les maladies du coeur, le cancer et les accidents cérébro-vasculaires. On estime que plus de 5% des personnes de plus de 65 ans et 20% des personnes de plus de 80 ans en sont atteintes (The Canadian Study of Health and Aging, 1994; Evans *et al.*, 1989). Actuellement, 65 000 Québécois, 250 000 Canadiens et 4 millions d'Américains souffrent de cette maladie. Compte tenu du vieillissement de la population et de la prolongation de l'espérance de vie, on estime qu'en l'an 2030, 750 000 Canadiens seront atteints de cette maladie.

Bien que la prévalence de la MA soit élevée, on ne possède pas de tests de laboratoire permettant d'en établir le diagnostic avec précision. Le seul diagnostic entièrement fiable réside dans l'observation des lésions neuropathologiques à l'autopsie. L'âge de début de la maladie a traditionnellement été utilisé pour différencier la forme présénile (Presenile Dementia of the Alzheimer Type, PDAT), débutant avant 65 ans, de la forme sénile (Senile Dementia of the Alzheimer Type, SDAT), débutant après 65 ans (McKhann *et al.*, 1984). La forme présénile, que l'on retrouve surtout dans les cas familiaux, représente environ 5% de l'ensemble des cas de MA, alors que l'autre 95% correspond à la forme sénile qui est généralement de nature sporadique.

1.1.1 Neuropathologie de la maladie d'Alzheimer

Les lésions neuropathologiques de la MA ont été décrites pour la première fois en 1907 par le médecin allemand Alois Alzheimer. Elles sont caractérisées macroscopiquement par une atrophie du cerveau et une dilatation des ventricules. À l'observation microscopique, on rapporte une perte de neurones, principalement au niveau du cortex cérébral et de l'hippocampe (Terry *et al.*, 1981). Des lésions neuropathologiques sont également présentes sous forme de plaques séniles, de dégénérescences neurofibrillaires et de dégénérescences granulo-vasculaires. Par ailleurs, une prolifération astrogliale réactionnelle est régulièrement associée à ces lésions. Le diagnostic neuropathologique de la MA est principalement fondé sur une quantification des plaques séniles et des dégénérescences neurofibrillaires (voir Markesbery, 1997).

1.1.1.1 Les plaques séniles

Les plaques séniles sont des structures anormales de forme arrondie situées dans l'espace extraneuronal. Elles sont composées d'une partie centrale compacte, constituée de la substance dite amyloïde et souvent d'une couronne périphérique formée d'un enchevêtrement de terminaisons nerveuses en voie de dégénérescence. La substance amyloïde est composée d'un peptide d'une quarantaine d'acides aminés, le β -amyloïde (Glennner et Woog, 1984), dont le gène codant a été identifié et cloné en 1987 (Goldgaber *et al.*, 1987). Les dépôts de la protéine β -amyloïde dans le cortex cérébral se manifestent sous deux formes principales: les plaques diffuses et les plaques séniles classiques (voir Dickson, 1997) Elles sont habituellement localisées dans le néocortex, les régions limbiques

étant relativement épargnées au début du processus dégénératif. Leur rôle dans la pathogénèse de la MA est largement controversé puisqu'on les retrouve également dans le syndrome de Down et au cours du vieillissement normal. En plus de la β -amyloïde, les plaques séniles contiennent de faibles quantités d'autres espèces moléculaires dont l'alpha-1-antichymotrypsine, la protéine tau, l'ubiquitine, l'apolipoprotéine E et des protéoglycanes (Dickson, 1997).

Le peptide β -amyloïde a une masse moléculaire de 4 kD et il provient en fait d'un précurseur appelé APP (amyloid precursor protein), une protéine membranaire de masse beaucoup plus élevée (environ 120 kD). La protéine APP est transcrite à partir d'un seul gène localisé sur le chromosome 21 et selon le processus d'épissage de l'ARN messager, l'APP peut contenir de 695 à 770 acides aminés (Kang *et al.*, 1987). Au moins 8 isoformes d'APP résultant d'un épissage alternatif des exons 7, 8 et 15 ont déjà été identifiées. C'est par l'action de différentes protéases (sécrétases: α , β , γ) que le fragment β -amyloïde est libéré du précurseur initial. Ainsi, l'APP peut être clivé selon une voie potentiellement amyloïdonergique, via les sécrétases β et γ ou selon un processus non amyloïdonergique via les sécrétases α et γ qui sectionnent l'APP à l'intérieur du peptide β -amyloïde. Dans la voie β -sécrétase, le peptide amyloïde qui est formé possède soit 40 ou 42 acides aminés (a.a.). C'est la forme longue du β -amyloïde (42 a.a.) qui est la plus insoluble et par le fait même la plus pathogénique. Aucune des trois sécrétases n'a encore été identifiée formellement (Dickson, 1997).

Les fonctions de la protéine APP dans le cerveau demeurent encore aujourd'hui relativement mystérieuses. Cependant, un certain nombre d'études ont suggéré différents rôles possibles à l'APP (voir Ohsawa et Kohsaka, 1998). Ainsi, on rapporte une augmentation de l'expression de l'APP au cours du

développement de la moëlle épinière. À l'intérieur des neurones, l'APP se retrouve au niveau des terminaisons synaptiques (Allinquant *et al.*, 1994). On a par ailleurs signalé que la surexpression de l'APP dans des souris transgéniques a des effets synaptotrophiques et entraîne une forte augmentation du nombre de terminaisons nerveuses (Mucke *et al.*, 1994). Récemment, Huber *et al.* (1997) ont découvert que l'APP synaptique est plus élevé chez les rats qui présentent une capacité cognitive supérieure. Si l'on considère globalement toutes ces données, il semble que l'APP joue plusieurs rôles importants dans le développement et la maintenance du cerveau (croissance neuritique, synaptogenèse). À l'état de précurseur, cette protéine aurait donc un rôle fonctionnel bénéfique, mais c'est lors de sa "dégradation" par des protéases que les effets néfastes apparaîtraient et contribueraient au développement de la MA.

1.1.1.2 Les dégénérescences neurofibrillaires

La MA est également caractérisée au niveau neuropathologique par une accumulation de filaments hélicoïdaux appariés deux à deux à l'intérieur du cytoplasme et que l'on nomme dégénérescences neurofibrillaires (DNF). La présence de cette lésion est associée à la mort neuronale et à la diminution des fonctions intellectuelles. En effet, il existe une forte corrélation entre l'intensité de la démence et le nombre de DNF corticales (Arriagada *et al.*, 1992; Perry et Smith 1993).

Les paires de filaments en hélice sont constituées principalement d'une protéine anormale du cytosquelette, la protéine tau hyperphosphorylée (Delacourte et Défossez, 1986). D'autres protéines associées au cytosquelette (MAP 1 et 2),

ainsi que l'ubiquitine, sont également des constituants des DNF (Mori *et al.*, 1987). Dans le cerveau humain, on retrouve la protéine tau principalement dans le compartiment axonal des neurones (Binder *et al.*, 1985). Cette protéine est codée par un gène situé sur le bras long du chromosome 17 (Neve *et al.*, 1986).

La modification de la protéine tau causant son agrégation sous forme de DNF, ne résulte pas d'une mutation de son gène, mais d'anomalies de la phosphorylation post-traductionnelle. En effet, la protéine tau normale contient 2,5 à 3,5 moles de phosphates par mole de protéine, alors que la protéine tau pathologique contient 10 à 12 moles de phosphates par mole de protéine (Ksiezak-Reding *et al.*, 1992). Cette phosphorylation excessive provient probablement de l'activité anormale d'une protéine kinase ou d'une phosphatase. Les sites de phosphorylation de la protéine tau dans la MA semblent être spécifiques, puisque dans d'autres maladies neurodégénératives présentant des DNF (maladie de Pick, paralysie supranucléaire progressive), ces sites ne sont pas les mêmes (Delacourte *et al.*, 1996; Vermersch *et al.*, 1994).

1.1.1.3 Autres structures anormales

Les plaques séniles et les dégénérescences neurofibrillaires sont les principales lésions observées dans la MA. Cependant, d'autres structures moins fréquentes, comme les corps d'Hirano et les dégénérescences granulo-vacuolaires, ont été décrites dans la MA. (Blass *et al.*, 1991). Les corps d'Hirano sont composés principalement d'actine, de protéines associées à l'actine et de protéines tau, tandis que les dégénérescences granulo-vacuolaires sont

composées principalement de tubuline, une protéine du cytosquelette (Price *et al.*, 1986).

1.1.1.4 Déficit de certains neurotransmetteurs

La meilleure corrélation existant entre la MA et un déficit en neurotransmetteurs concerne le système cholinergique. En effet, l'innervation cholinergique du cortex est déplétée sévèrement dans la MA à cause principalement d'une perte importante de neurones dans le noyau basal de Meynert (Cumings et Benson, 1987). Cependant, cette lésion est non-spécifique à la MA puisqu'on l'observe, à un niveau moindre, dans d'autres types de maladies neurodégénératives, incluant la maladie de Parkinson (Mahler et Cummings, 1990).

De plus, près de la moitié des patients Alzheimer présentent également un déficit modéré ou sévère de l'innervation noradrénergique causée par une perte cellulaire dans le locus ceruleus (Bondareff *et al.*, 1987).

La perte cellulaire et l'accumulation de dégénérescences neurofibrillaires dans le noyau dorsal de raphé occasionnent également un déficit de l'innervation sérotonergique (German *et al.*, 1987). Les manifestations de ce déficit concernent probablement les troubles de sommeil et psychiatriques observés dans la MA (Blass, 1993).

1.1.2 Génétique de la maladie d'Alzheimer

Même si la majorité des cas de MA semblent être de nature sporadique, plusieurs arguments suggèrent fortement la présence de facteurs génétiques dans l'étiologie de la MA. Premièrement, une agrégation familiale est fréquemment observée et plusieurs études épidémiologiques ont mis en évidence une augmentation du risque pour les parents du premier degré d'un individu atteint (Fratiglioni *et al.*, 1993; Van Duijn *et al.*, 1993; Broe *et al.*, 1990; Fitch *et al.*, 1988). Le risque relatif de développer la MA est en moyenne 3,5 fois plus élevé pour les sujets ayant au moins un apparenté du premier degré atteint par la maladie et est 7,5 fois plus élevé pour ceux qui en ont deux (Van Duijn *et al.*, 1991).

L'étude de la concordance chez les jumeaux monozygotes et dizygotes suggère également qu'une composante héréditaire joue un rôle important dans l'étiologie de la MA (Rapoport *et al.*, 1991; Nee *et al.*, 1987). Une étude mentionne que l'agrégation familiale est plus forte dans les familles où on observe des cas de jumeaux concordants, que dans les familles où les jumeaux sont discordants (Rapoport et Schapiro, 1990). Selon plusieurs études, la concordance chez les jumeaux monozygotes est estimée à environ 40%. Cependant, une étude récente a observé uniquement 18,6% de concordance chez des jumeaux monozygotes (n=43) et 4,7% chez des jumeaux dizygotes (n=41) (Raiha *et al.*, 1996).

Selon Constantinidis (1989), la forme familiale de la MA toucherait environ 15% de l'ensemble des patients. Dans un nombre limité de cas (moins de 5%), certains de ces patients appartiennent à une famille où la maladie se transmet selon un mode autosomique dominant (Goate *et al.*, 1991; St George-Hyslop *et al.*, 1987). Cette forme de la maladie est entièrement héréditaire et est transmise

directement d'une génération à l'autre par l'intermédiaire d'un gène à caractère dominant. Cela signifie que si un parent est atteint chaque enfant a 50 pour cent de risque de contracter la maladie. Cette forme familiale est exclusivement de nature présénile, c'est-à-dire que les premiers symptômes de la maladie apparaissent avant l'âge de 65 ans. Les manifestations cliniques et neuropathologiques de ces sujets préséniles sont identiques à celles observées dans les cas sporadiques de type sénile (forme commune de la MA) (Cairns *et al.*, 1993).

La nature génétique de la MA est très hétérogène, c'est-à-dire qu'elle peut être causée par plusieurs gènes différents. Dans les cas de MA de type présénile et à transmission autosomique dominante, trois gènes ont déjà été identifiés: le premier, localisé sur le chromosome 21, code pour la protéine précurseur de l'amyloïde (APP), le deuxième est situé sur le chromosome 14 et code pour la préséniline 1 (PS1) et finalement, le troisième gène code pour la préséniline 2 (PS2) et est localisé sur le chromosome 1. Comme ces trois gènes n'expliquent qu'une très petite portion des cas familiaux, l'existence d'autres gènes causaux est vraisemblable. Mis à part ces gènes à transmission dominante, d'autres gènes sont des facteurs de risque pour la maladie. Il est maintenant bien établi que l'allèle e4 de l'apolipoprotéine E (apo E) est surreprésenté chez les patients Alzheimer. Le gène de cette protéine est localisé sur le chromosome 19.

1.1.2.1 Gène APP

En 1987, on a démontré pour la première fois une liaison génétique entre des marqueurs de la région proximale du bras long du chromosome 21 (21q22) et

certaines familles atteintes de la MA de type présénile (St George-Hyslop *et al.*, 1987). Cependant, cette liaison n'a pas été observée dans des familles Alzheimer de type sénile (Cheng *et al.*, 1988) ni dans d'autres familles de type présénile (Schellenberg *et al.*, 1988), démontrant ainsi que le gène responsable ne devait expliquer qu'une faible portion de l'ensemble des cas de MA.

La découverte de la liaison sur le chromosome 21 a engendré un grand intérêt pour le gène du précurseur de la protéine β -amyloïde qui est situé sur ce même chromosome. Plusieurs équipes ont donc recherché des modifications à l'intérieur de ce gène. En 1991, une première mutation remplaçant une valine par une isoleucine au codon 717 a été mise en évidence chez les patients d'une famille anglaise (Goate *et al.*, 1991). Néanmoins, cette mutation semble rare puisque Schellenberg *et al.* (1991) ne l'ont pas retrouvée dans 76 formes familiales de MA. Par la suite, d'autres mutations du gène APP en relation avec la MA ont été décrites (Carter *et al.*, 1992; Mullan, 1992; Chartier-Harlin *et al.*, 1991; Murrell *et al.*, 1991). Aujourd'hui, on estime que les cas de MA causés par le gène APP ne représentent que 1% des cas préséniles, ce qui se traduit par moins de 0.1% de l'ensemble des cas de MA.

Les différentes mutations de l'APP causant la MA sont situées à l'intérieur du gène, de part et d'autre de la région contenant le peptide β -amyloïde. Ces mutations ont donc possiblement un effet sur l'activité des sécrétases β et γ ; ce qui aurait pour conséquence d'augmenter la production de β -amyloïde dans un premier temps et, par la suite, la formation des plaques séniles.

1.1.2.2 Gène PS1

Comme la liaison au chromosome 21 n'a pas été détectée dans la plupart des familles Alzheimer de type présénile, d'autres groupes de scientifiques ont poursuivi leurs travaux sur l'identification de nouvelles liaisons génétiques. En 1992, une liaison a été observée entre le chromosome 14 (position 14q24.3) et plusieurs familles de type présénile à transmission autosomique dominante (Schellenberg *et al.*, 1992). Dans la même année, deux autres études ont confirmé cette observation (St George-Hyslop *et al.*, 1992; Van Broeckhoven *et al.*, 1992). Sur les 48 familles étudiées par l'ensemble de ces travaux, neuf d'entre elles ont démontré une liaison significative avec le chromosome 14. Cette liaison au chromosome 14 a été observée dans diverses populations: caucasienne, hispanique, mexicaine et dans au moins une famille japonaise. Une autre étude a démontré que cette liaison génétique est observée uniquement dans la forme présénile de la MA, et n'est pas impliquée dans sa forme sénile (Schellenberg *et al.*, 1993).

Le gène localisé sur le chromosome 14 a finalement été cloné en 1995 (Sherrington *et al.*, 1995). Il code pour une protéine de 467 acides aminés, nommée préséniline 1 (PS1). Cette protéine est exprimée dans les neurones du cerveau ainsi que dans de nombreux autres tissus de l'organisme. À l'intérieur du neurone, cette protéine est particulièrement abondante au niveau dendritique et associée au réticulum endoplasmique (Elder *et al.*, 1996; Kovacs *et al.*, 1996). Pour être fonctionnelle, PS1 subit un clivage qui aboutit à la formation d'un dérivé N-terminal d'environ 27-28 KDa et d'un dérivé C-terminal d'environ 17-18 KDa (Tanzi *et al.*, 1996). On attribue à PS1 un rôle dans la maturation et dans le transport de protéines nouvellement synthétisées au sein des cellules. Une

possibilité évidente est donc que PS1 soit impliqué dans le "processing" de la molécule APP et dans son sous-produit de dégradation, le peptide β -amyloïde.

De nombreuses mutations à l'intérieur de ce gène ont été observées chez des patients Alzheimer de type présénile, mais pas dans un groupe d'individus témoins (Sherrington *et al.*, 1995). Les mutations du gène PS1 expliquent environ 50% des cas de MA de type familial. À ce jour, plus de 40 mutations différentes à l'intérieur de PS1 ont été identifiées dans 74 familles. Toutes les mutations signalées dans PS1 proviennent de la substitution d'un acide aminé par un autre, sauf pour une qui est une délétion d'une boucle cytoplasmique.

Plus récemment, plusieurs équipes ont montré que les différentes mutations de PS1 se traduisent sur le plan du métabolisme cellulaire par une production accrue de la forme longue (42 acides aminés) du peptide β -amyloïde. Mehta *et al.* (1998) ont en effet observé que le niveau de cette protéine était anormalement élevé dans des fibroblastes en culture porteurs du gène PS1 muté. D'autres études ont également démontré que la co-expression de PS1 et APP mutés avait un effet encore plus drastique sur l'accumulation de β -amyloïde (Citron *et al.*, 1997). Les fonctions de PS1 ont également été testées chez des souris transgéniques. Les souris porteuses du gène humain PS1 normal semblent demeurer intactes, tandis que celles ayant reçu une version mutante du gène présentent une accumulation de la forme longue du peptide β -amyloïde dans le cortex cérébral. Même si les souris mutantes n'ont pas de pathologies évidentes, on constate de subtiles modifications dans les propriétés électrophysiologiques des neurones de l'hippocampe. Lorsqu'on introduit à la fois les gènes APP et PS1 mutés chez la même souris, cela provoque des résultats spectaculaires (Holcomb *et al.*, 1998). Ces animaux développent rapidement des plaques amyloïdes caractéristiques

dans le cortex. Par ailleurs, ces animaux présentent des signes évidents de détériorations dans les comportements d'apprentissage.

Finalement, une autre étude a démontré une certaine part d'implication de PS1 au niveau de la régulation de l'apoptose (Wolozin, *et al.*, 1998).

1.1.2.3 Gène PS2

Le troisième gène impliqué dans la forme familiale de la MA de type présénile a été identifié en 1995 (Levy-Lahad *et al.*, 1995; RogaeV *et al.*, 1995; Sherrington *et al.*, 1995). Ce gène, situé sur le chromosome 1, code pour la préséniline 2, une protéine de 475 acides aminés qui présente 80% de similitude de séquence avec la préséniline 1. Une mutation dans ce gène est responsable des cas de MA présents dans un isolat ethnique particulier, celui des «Allemands de la Volga». Mis à part ce groupe, une seule autre famille, italienne, liée à une mutation de la préséniline 2 a été décrite à ce jour. Récemment, une étude a montré que la mutation N1411 du gène PS2 augmente, dans des cellules de neuroblastomes transfectées par du cDNA contenant la mutation, la sécrétion de β -amyloïde de 42 acides aminés (Tomita *et al.*, 1997). Les données paraissent donc très homogènes entre PS1 et PS2 et confirment une relation probable entre les mutations sur les deux gènes présénilines et le métabolisme du précurseur de la protéine amyloïde.

1.1.2.4 Apolipoprotéine E

Une première étude avait démontré qu'un gène, situé sur le bras long du chromosome 19 (19q13.2) était lié à la transmission de la MA dans certaines familles de type sénile (Pericak-Vance *et al.*, 1991). En 1993, on a démontré que le locus de cette liaison correspondait au gène codant pour la protéine apolipoprotéine E (apo E) (Poirier *et al.*, 1993, Saunders *et al.*, 1993). Dans la population, il existe 3 isoformes différentes du gène apo E appelées allèles e2, e3 et e4. Ces isoformes diffèrent par des substitutions concernant deux acides aminés dans la protéine. Initialement, il a été montré que la fréquence de l'allèle e4 était significativement plus élevée chez les patients atteints de MA de type sénile que chez les individus normaux appariés pour l'âge (Strittmatter *et al.*, 1993). Plusieurs études ont confirmé cette observation (Bétard *et al.*, 1994; Brousseau *et al.*, 1994) qui s'est étendue, par la suite, à la forme présénile de la MA (Pérez-Tur *et al.*, 1995; Chartier-Harlin *et al.*, 1994). En plus de l'effet délétère de l'allèle e4, il semble que l'allèle e2 ait un effet protecteur contre la MA (Corder *et al.*, 1994). Tout récemment, un autre polymorphisme de l'apo E a été associé à la MA. Cette fois, il s'agit d'une modification située à l'intérieur de la région promotrice du gène (-491) et qui serait associée à un risque élevé de MA. Cette modification du gène apo E aurait l'effet d'accroître le niveau d'expression de la protéine, et ce, indépendamment du statut de l'allèle e4 des sujets (Bullido *et al.*, 1998).

L'apo E est une glycoprotéine de 299 acides aminés, synthétisée par le foie, mais aussi par des cellules gliales : cellules de Schwann, astrocytes et oligodendrocytes. Elle joue un rôle de transporteur du cholestérol et elle semble impliquée dans les processus de reconstruction nerveuse post-lésionnelle (Mahley, 1988). La présence de l'allèle e4 favorise donc l'apparition de la maladie et est

considérée comme un facteur de risque important. De plus, la présence de 2 allèles e4 est caractérisée chez les patients Alzheimer par une perte de mémoire plus sévère et par un âge plus précoce de l'apparition des premiers symptômes de la maladie (Lehtovirta *et al.*, 1996). Récemment, on a également démontré que l'allèle e4 peut affecter l'activité cholinergique dans le cerveau des patients Alzheimer. Par conséquent, selon le génotype apo E des patients, on peut s'attendre à une réponse différente chez les patients qui suivent un traitement anti-cholinestérase (Poirier, 1999). Il y a donc lieu pour les cliniciens de vérifier le génotype apo E avant de prescrire certains médicaments aux patients.

1.1.2.5 Autres gènes

Certaines études ont récemment mis en évidence que d'autres gènes pourraient être impliqués dans l'étiologie de la MA. Un groupe japonais a détecté deux polymorphismes à l'intérieur d'un gène situé sur le chromosome 14 (Nakano *et al.*, 1997). Il s'agit du gène de la dihydroliponide succinyltransférase une enzyme présente dans le complexe protéique mitochondrial α -cétoglutarate déshydrogénase. Comparant 254 patients et 452 témoins, les chercheurs ont montré que l'allèle AC est, à l'état homozygote, plus fréquemment retrouvé chez les malades. La fréquence du génotype AC/AC est en effet de 14% chez les sujets atteints et seulement de 5% chez les témoins. Ce gène pourrait donc représenter un nouveau facteur de risque; cependant, son implication réelle dans la MA n'a pas encore été confirmée par d'autres études.

Une différence dans la fréquence d'un allèle du gène de la bléomycine hydrolase a également été observée entre patients (n=357) et témoins (n=320)

(Montoya *et al.*, 1998). Cette différence serait d'ailleurs plus élevée chez les individus non porteurs de l'allèle e4 de l'apo E.

Récemment, le groupe de Tanzi a détecté la présence d'une délétion de 5 nucléotides dans le gène α 2-macroglobuline (chromosome 12) chez des patients souffrant de la forme tardive de la MA (Blacker *et al.*, 1998). Cette délétion serait, selon eux, un facteur de risque important pour les individus qui développent la maladie après 70 ans.

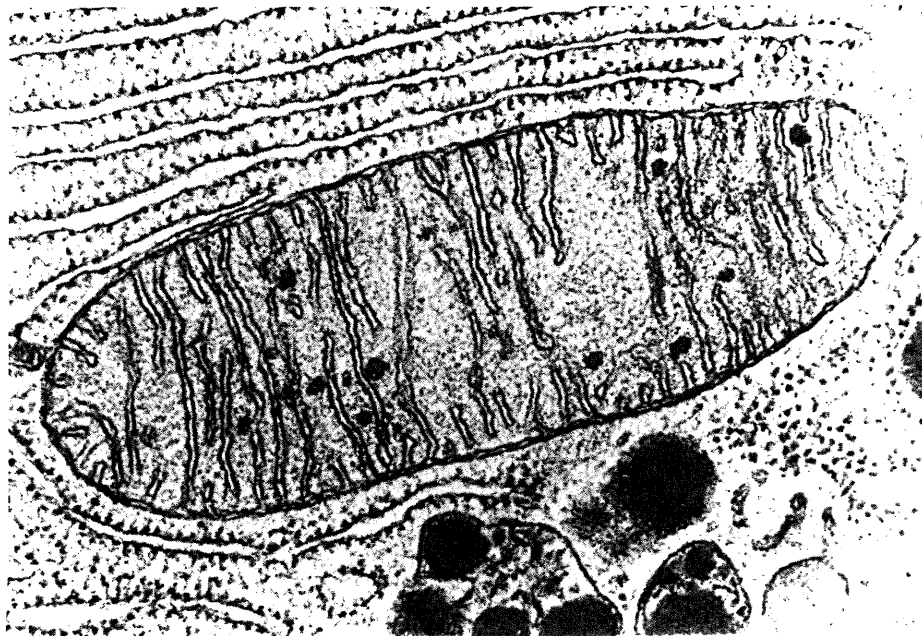
Finalement, une autre variation génomique a également été associée à la MA. Il s'agit du gène de l'apo A-IV (Csaszar *et al.*, 1997). Les auteurs de cette étude ont observé que la fréquence d'un polymorphisme de ce gène est de 20,6% chez des patients mais de seulement 7,0% chez des témoins. Leurs données suggèrent que ce polymorphisme pourrait conférer un risque supplémentaire de développer la MA.

Malgré l'abondance des connaissances sur la nature génétique de la MA, il y a encore un nombre très significatif de cas qui ne sont pas expliqués par l'un de ces gènes. Nous devons en conclure qu'il y a obligatoirement d'autres anomalies génétiques impliquées qui ne sont tout simplement pas encore identifiées. Comme nous l'avons déjà mentionné, l'ADNmt pourrait être l'un de ces facteurs. Afin de mieux comprendre le rôle que pourrait jouer ce génome dans la MA, nous allons consacrer la prochaine section à décrire le fonctionnement de la chaîne respiratoire ainsi que la structure et l'organisation unique du génome mitochondrial.

1.2 La mitochondrie

Les mitochondries sont des organites présents dans la plupart des cellules eucaryotes, dont le rôle essentiel est de mettre en réserve, sous forme d'adénosine triphosphate (ATP), l'énergie libérée par l'oxydation des molécules nutritives. Une mitochondrie normale a un diamètre d'environ $0,5 \mu\text{m}$ et une longueur variant entre 1 et $7 \mu\text{m}$. Observée en microscopie électronique, la structure d'une mitochondrie comprend un compartiment intérieur (matrice) entouré de deux membranes superposées (Figure 1). Ces deux membranes sont séparées par un espace intermembranaire d'une épaisseur d'environ 6 à 8 nm . La membrane interne forme des replis (crêtes) vers l'intérieur de façon à augmenter la superficie.

Figure 1. Morphologie d'une mitochondrie en microscopie électronique.



Sur le plan fonctionnel, la mitochondrie est la voie finale commune des réactions cataboliques des glucides, des lipides et des protéines et le siège de plusieurs centaines de réactions biochimiques (cycle de l'urée, bêta-oxydation, cycle de Krebs, chaîne respiratoire, etc.).

1.2.1 Bioénergétique cellulaire

Chez les êtres eucaryotes, les glucides et les acides gras sont oxydés complètement par la mitochondrie en CO_2 et H_2O . Ce processus biochimique libère une quantité importante d'énergie qui est récupérée pour la biosynthèse de molécules d'ATP. Ces molécules sont ensuite utilisées pour de multiples fonctions cellulaires (biosynthèses, transport actif, maintien des potentiels de membrane, sécrétion, mouvements cellulaires, etc). Il y a environ 36 molécules d'ATP synthétisées lors de l'oxydation d'une seule molécule de glucose.

La récupération d'énergie débute par la digestion partielle du glucose en pyruvate, une chaîne à trois atomes de carbone, grâce à des réactions intermédiaires (glycolyse) qui ont lieu sans l'intervention d'oxygène. Le pyruvate pénètre ensuite dans les mitochondries où il est oxydé par le cycle de Krebs, une séquence organisée de réactions d'oxydation dont le résultat est la formation de deux molécules de CO_2 , de 8 atomes d'hydrogène et de 8 électrons. Ces électrons possèdent un potentiel énergétique élevé et ils ne peuvent demeurer libres dans la cellule. Ils sont donc acceptés par des transporteurs, soit par le nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) ou le flavine adénine dinucléotide (FAD). Ces deux molécules ont pour fonction de transporter les électrons hautement énergétiques provenant du cycle de Krebs jusqu'à la chaîne respiratoire mitochondriale. C'est à

ce niveau que l'énergie contenue par chaque électron est récupérée pour la biosynthèse d'ATP.

1.2.2 La chaîne respiratoire mitochondriale

Les coenzymes réduits (NADH et FADH₂) qui proviennent du cycle de Krebs sont oxydés par la chaîne respiratoire, soit la voie métabolique finale incontournable et commune à l'oxydation de tous les substrats. La chaîne respiratoire est localisée sur la membrane interne de la mitochondrie et elle est composée de 4 différents complexes : le **complexe I** (NADH-ubiquinone réductase), le **complexe II** (succinate-ubiquinone réductase), le **complexe III** (ubiquinone-cytochrome c oxydoréductase) et le **complexe IV** (cytochrome oxydase). Ces 4 complexes sont intimement associés au **complexe V** (ATPase mitochondriale) qui est responsable de la phosphorylation de l'adénosine diphosphate (ADP) en ATP (Sherratt, 1991).

La chaîne respiratoire est constituée d'environ 70 sous-unités protéiques distinctes. Ces protéines sont codées par deux génomes différents : 57 proviennent du génome nucléaire et 13 protéines destinées aux complexes I, III, IV et V sont codées par l'ADN mitochondrial (Kadenbach *et al.*, 1991).

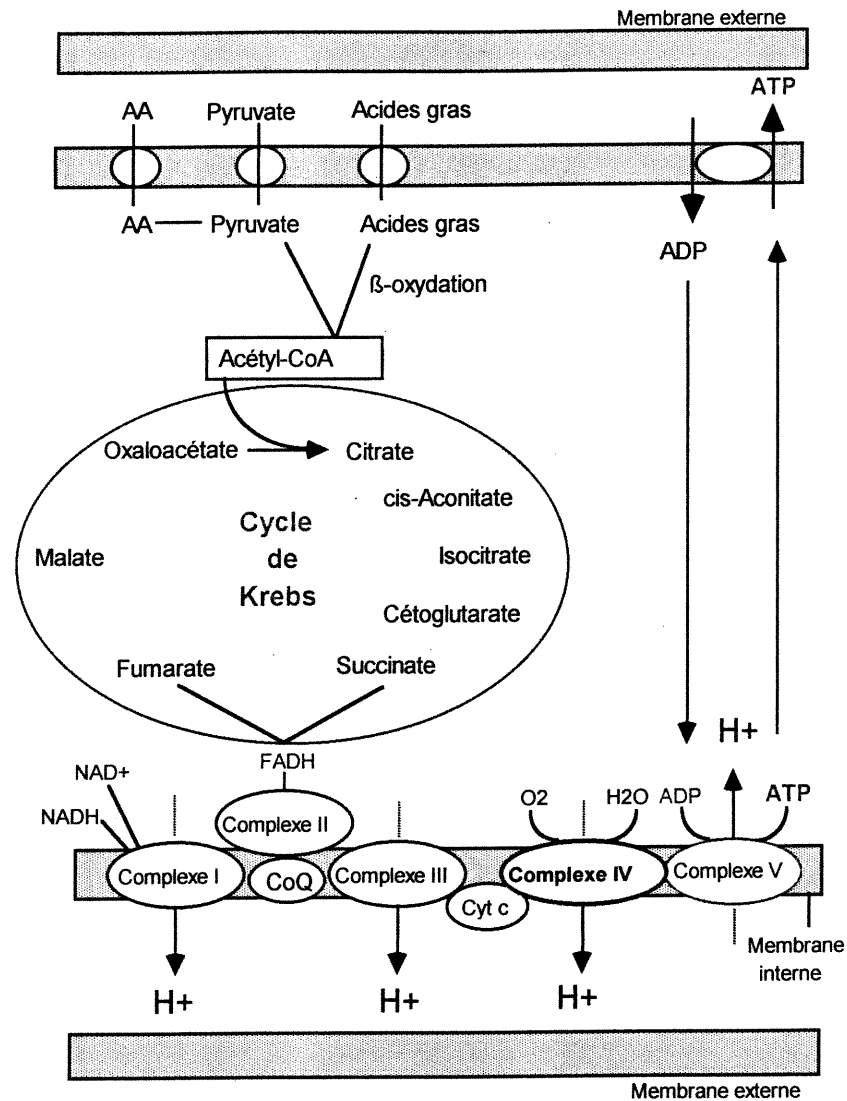
La chaîne respiratoire (Figure 2, p.27) est en fait un réseau de transporteurs agencés dans un ordre bien défini, le long duquel vont migrer les électrons jusqu'à leur accepteur final, l'oxygène. Ces transporteurs d'électrons sont agencés en quatre complexes rigides insolubles, enchâssés dans la membrane mitochondriale interne (complexe I à IV). Par ailleurs, on retrouve deux autres transporteurs

solubles, le coenzyme Q (CoQ) et le cytochrome c (Cyt c), qui connectent ces complexes entre eux. La position de chaque transporteur à l'intérieur de la chaîne respiratoire est déterminée par son potentiel d'oxydoréduction. Ainsi, le niveau d'énergie des électrons s'abaisse du NADH (ou du FADH), où il est très élevé, jusqu'à l'oxygène, où il s'annule.

Le passage de l'électron d'un transporteur à l'autre libère une quantité d'énergie égale à la différence de potentiel entre ces deux transporteurs. Ce processus permet donc de libérer de façon graduelle et contrôlée l'énergie contenue par chaque électron. Chaque transporteur passe de l'état réduit (gain d'un électron) à l'état oxydé (perte d'un électron), d'où l'appellation de réaction d'oxydoréduction. Une trentaine de sites réactionnels existe à l'intérieur des quatre complexes de la chaîne respiratoire.

Parallèlement au transport des électrons par la chaîne respiratoire, l'énergie libérée permet aux complexes I, III et IV de transporter des protons (H^+) depuis la matrice mitochondriale jusqu'à l'espace inter-membranaire. La conséquence est un abaissement du pH de la matrice. La membrane interne devient électro négative sur la face matricielle et électro positive sur l'autre face. Les protons cherchent à équilibrer cette différence de potentiel et retournent vers la matrice mitochondriale en traversant l'ATPase (complexe V). L'énergie engendrée par le passage des protons au travers du complexe V est utilisée par ce dernier pour la synthèse des molécules d'ATP. Ainsi, pour chaque NADH réoxydé, trois ATP ont été synthétisés alors que l'oxydation complète d'une molécule de glucose permet la synthèse d'environ 36 molécules d'ATP.

Figure 2. Schéma représentant la chaîne respiratoire et le cycle de Krebs à l'intérieur de la mitochondrie (explication dans le texte).



La chaîne respiratoire mérite bien son nom, puisque chaque maillon de la chaîne est indispensable à son fonctionnement. Si l'un de ces maillons est déficient, la cascade d'électrons est altérée ainsi que la production d'ATP. Tout déficit de la chaîne respiratoire peut donc avoir des conséquences pathologiques importantes sur la cellule. C'est le déficit d'un ou de plusieurs éléments de la chaîne respiratoire qui est la cause des cytopathies mitochondriales.

1.2.3 Le complexe cytochrome oxydase

Le complexe cytochrome oxydase forme la portion terminale de la chaîne respiratoire. Sa fonction principale est de catalyser le transfert des électrons du cytochrome *c* vers l'oxygène moléculaire. Il contient 2 hèmes (*a* et *a*₃) ainsi que deux atomes de cuivre (Cu_A et Cu_B) (Capaldi, 1990). Les électrons issus du cytochrome *c* transitent par le cytochrome *a* sur la face externe de la membrane interne, puis par les atomes de cuivre dans la membrane, par le cytochrome *a*₃ sur la face interne, et enfin sur l'oxygène. L'atome de fer de chaque cytochrome (*a* et *a*₃) passe de l'état oxydé (Fe⁺⁺⁺) à l'état réduit (Fe⁺⁺). Le cyanure, l'azide et le monoxyde de carbone inhibent l'activité CO et sont très toxiques (Tzagoloff et Wharton, 1965).

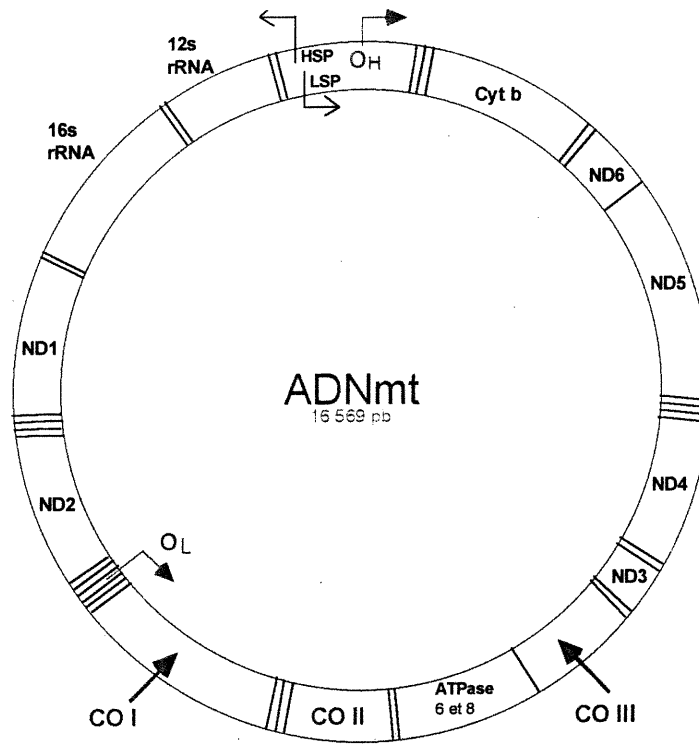
Le complexe CO est constitué de 13 sous-unités protéiques dont 3 sont codées par des gènes mitochondriaux (I, II et III) alors que les 10 autres (IV, Va, Vb, VIa, VIb, VIc, VIIa, VIIb VIIc et VIII, selon la nomenclature de Kadenbach *et al.*, 1987) sont codées par le génome nucléaire et synthétisées dans le cytoplasme. Les sous-unités I et II forment le coeur catalytique de l'enzyme. La sous-unité I renferme l'hème *a*, l'hème *a*₃ et le Cu_B alors que la sous-unité II contient le Cu_A et le site de liaison du cytochrome *c*. La sous-unité III et la plupart des sous-unités nucléaires sont essentielles à l'assemblage d'une enzyme catalytique fonctionnelle (Cooper *et al.*, 1991). Certaines sous-unités nucléaires sont présentes sous forme d'isoenzymes qui diffèrent d'un tissu à l'autre. Il existe peu de différence fonctionnelle entre les complexes enzymatiques composés d'isoenzymes différentes. Cependant, certaines sous-unités nucléaires, qui ne sont exprimées que dans certains tissus, ont peut-être un rôle de régulation à l'égard des exigences énergétiques propres à chaque tissu.

1.3 L'ADN mitochondrial

La découverte en 1963 de l'ADNmt a bouleversé nos connaissances sur la physiologie mitochondriale. La mitochondrie est la seule structure intracellulaire, mis à part le noyau, à contenir de l'ADN. Malgré la petite taille de ce génome (seulement 16 kb), il contient des gènes essentiels à la survie de la cellule. Le génome mitochondrial est présent en plusieurs centaines, voire plusieurs milliers d'exemplaires dans chaque cellule, et chaque mitochondrie contient 2 à 10 copies d'ADNmt (DiMauro et Wallace, 1993). Cette variabilité est le reflet de la demande énergétique des différents tissus.

L'ADNmt est composé de 16 569 paires de bases agencées en un double brin circulaire dont la séquence nucléotidique chez l'homme, est entièrement connue (Anderson *et al.*, 1981) (Figure 3, p.30). Il contient 37 gènes : 22 ARN de transfert (ARNt), 2 ARN ribosomiaux (ARNr 12S et 16S) et 13 gènes codant pour des polypeptides de la chaîne respiratoire (ARNm). La majorité des gènes (12 polypeptides, 2 ARNr et 14 ARNt) sont codés par le brin lourd de l'ADNmt (riche en guanine) alors que le brin léger (riche en cytosine) code pour les autres gènes (1 polypeptide et 8 ARNt). La caractéristique la plus frappante du génome mitochondrial humain concerne son extrême densité de gènes. Mis à part la région de régulation qui correspond à environ 5% du génome et qui contient de courtes séquences non codantes, le reste du génome mitochondrial est complètement saturé de gènes qui sont tous dépourvus d'introns.

Figure 3. Représentation schématique du génome mitochondrial humain.



1.3.1 Transmission maternelle

Le mode de transmission du génome mitochondrial est particulier. Tout l'ADNmt d'un individu est hérité de sa mère puisqu'à la formation du zygote le spermatozoïde, à la différence de l'ovocyte, n'apporte que son ADN nucléaire, mais aucune mitochondrie (Giles *et al.*, 1980). Cependant, des évidences plus récentes suggèrent que le père contribue également, mais à un niveau très faible, au patrimoine mitochondrial du zygote (Gyllensten *et al.*, 1991). Le fait que la mère contribue pour environ 99% du contenu des mitochondries de ses descendants explique le mode de transmission maternelle observée dans certaines cytopathies mitochondriales.

1.3.2 Hétéroplasmie et mutations somatiques de l'ADNmt

Chaque cellule contient plusieurs centaines ou même plusieurs milliers d'exemplaires de l'ADNmt. Au cours des divisions cellulaires, les mitochondries se répartissent de manière aléatoire dans les cellules filles (ségrégation mitotique). Ainsi, en cas d'anomalie du génome mitochondrial, deux types d'ADNmt peuvent cohabiter dans une même cellule. Ce phénomène génétique est dénommé hétéroplasmie. Une cellule mère portant deux populations de mitochondries peut donc engendrer trois types de cellules : celles ne contenant uniquement que des mitochondries à ADNmt normal (homoplasmie), celles contenant uniquement de l'ADN muté, enfin celles contenant un mélange de ces deux types de mitochondries (hétéroplasmie). Ceci explique en grande partie le polymorphisme clinique des cytopathies mitochondriales, où certains tissus sont entièrement normaux alors que d'autres sont affectés. Le système nerveux consomme une portion importante d'énergie; par conséquent, il est particulièrement vulnérable à l'accumulation d'erreurs du génome mitochondrial. De plus, la manifestation phénotypique d'une mutation de l'ADNmt n'est observable que lorsque la proportion d'ADNmt muté dépasse un certain seuil. Étant donné que chaque tissu possède des exigences énergétiques propres, ce seuil est variable d'un tissu à l'autre. Il a été démontré pour plusieurs cytopathies mitochondriales qu'il fallait un minimum de 80 à 85% de copies mutées de ce génome pour observer un phénotype pathologique (Sciaccio *et al.*, 1994; Boulet *et al.*, 1992; Chomyn *et al.*, 1992). Pour certaines délétions hétéroplasmiques, cette valeur diminue à 70%.

L'hétéroplasmie fait également référence à toutes les mutations somatiques de l'ADNmt qui s'accumulent au cours de la vie d'un individu. Il est maintenant bien reconnu que l'accumulation de ce type de modifications de l'ADNmt est un facteur

important dans le processus du vieillissement cellulaire (Lee and Wei, 1997). Un nombre important de publications indiquent que le taux de mutations somatiques de l'ADNmt augmente avec l'âge (Wallace *et al.*, 1995; Corral-Berinski *et al.*, 1992; Soong *et al.*, 1992; Cortopassi et Arnheim, 1990). Par extrapolation, Ozawa (1995) a démontré qu'à l'âge de 129 ans, 100% des copies de l'ADNmt d'un individu posséderaient une délétion de 7.4 kb; il conclut donc qu'il serait théoriquement impossible de vivre au-delà de cet âge. Le génome mitochondrial serait en quelque sorte une horloge biologique qui détermine le rythme du vieillissement d'un individu. Cette théorie du vieillissement mitochondrial suggère que l'ensemble des mutations somatiques ont un effet synergique perturbant le fonctionnement de la chaîne respiratoire. Il en découlerait une plus grande production de radicaux libres. Cette augmentation du stress oxydatif serait responsable en partie du vieillissement et possiblement de certaines maladies neurodégénératives à déclenchement tardif. Plusieurs facteurs expliquent la vulnérabilité du génome mitochondrial à l'accumulation d'erreurs. Premièrement, l'ADNmt est situé au niveau de la membrane interne de la mitochondrie, qui est le siège de la respiration cellulaire et le lieu de formation des radicaux libres (Miquel, 1991; Linnane *et al.*, 1990). Deuxièmement, ce génome corrige difficilement ses erreurs, car contrairement au génome nucléaire, son système de réparation est rudimentaire (Pettepher *et al.*, 1991; Tomkinson *et al.*, 1990; Fukunaga et Yielding, 1979; Clayton *et al.*, 1974). Troisièmement, l'ADNmt n'est pas protégé par des protéines histones, ce qui le rend très vulnérable, notamment à l'agression des radicaux libres. Quatrièmement, l'ADNmt contient une quantité particulièrement importante de séquences répétitives, lesquelles peuvent entraîner des délétions suite à des événements de recombinaison lors de la réplication (Schon *et al.*, 1989). Finalement, l'ADN polymérase mitochondriale gamma présente un taux

d'erreur relativement élevé comparé aux différentes ADN polymérases nucléaires (Kunkel and Loeb, 1981).

Les conséquences de cette accumulation d'erreurs sous forme hétéroplasmique dans le génome mitochondrial sont probablement nombreuses et doivent jouer un rôle important dans le processus du vieillissement. Même si cette situation est inévitable, il est possible que certains individus soient prédisposés à une accumulation plus rapide d'erreurs et donc plus à risque de développer des maladies dont l'incidence augmente avec l'âge. Un tel mécanisme de mutagenèse pourrait être impliqué dans le développement de la MA et serait, par ailleurs, l'un des seuls pouvant expliquer que cette maladie se développe uniquement à un âge avancé.

1.3.3 Code génétique

Le code génétique du génome mitochondrial diffère quelque peu de celui de tous les gènes nucléaires des procaryotes et des eucaryotes. Dans le système mitochondrial de traduction, UGA, qui est normalement un codon d'arrêt, code pour le tryptophane. De même, AGA et AGG, qui codent normalement pour l'arginine, servent de signaux d'arrêt dans les ARNm mitochondriaux des cellules humaines (Attardi *et al.*, 1981).

1.3.4 Expression du génome mitochondrial

L'expression du génome mitochondrial ne s'effectue pas de façon coordonnée avec le génome nucléaire. Il s'agit d'un système autonome dont la réplication peut avoir lieu à n'importe lesquelles des étapes du cycle cellulaire. Toutes les enzymes impliquées dans la régulation de la transcription et de la réplication de l'ADNmt sont codées par l'ADN nucléaire, et par conséquent, dépendantes de ce génome.

1.3.4.1 Transcription de l'ADN mitochondrial

La région régulatrice de l'ADNmt (D-loop) qui correspond à environ 5% du génome mitochondrial est le site de contrôle de la transcription. Chaque brin du génome mitochondrial humain y est transcrit à partir d'un seul promoteur. Il existe donc un promoteur pour la transcription du brin lourd (heavy strand promoter, HSP) et un autre pour le brin léger (light strand promoter, LSP). Les deux promoteurs sont localisés l'un près de l'autre et distancés par seulement 150 paires de base. Cependant, ils ne se chevauchent pas et sont complètement indépendants l'un de l'autre. Chaque promoteur fonctionne de façon unidirectionnelle chez l'humain (Clayton, 1992a). Par contre, chez le poulet, il n'existe qu'un seul promoteur qui fonctionne de façon bidirectionnelle (L'Abbé *et al.*, 1991).

Contrairement à la plupart des gènes eucaryotiques qui constituent chacun une unité de transcription indépendante, les deux brins du génome mitochondrial tout entier sont transcrits chacun en une seule chaîne d'ARN qui contient tous les

gènes du brin codant (Murphy *et al.*, 1975). La transcription est effectuée par une ARN polymérase mitochondriale particulière (codée par l'ADN nucléaire). Suite à la transcription, chaque ARN est libéré par clivage du transcrit primaire aux jonctions séparant deux gènes par une ribonucléase.

Pour la transcription du brin lourd, il semble exister deux sites d'initiation (Montoya *et al.*, 1983): un plus actif qui sert à la transcription des ARNr 16S et 12S uniquement (il y a un site de terminaison de la transcription à la jonction de l'ARNr 16S et de l'ARNt^{Leu}), et un autre moins actif qui déclenche la synthèse d'un ARN polycistronique couvrant tout le brin lourd. Il a été démontré que les ARNr sont transcrits à un taux de 15 à 60 fois plus élevé que la transcription complète du brin lourd (Gelfand et Attardi, 1981). L'abondance du transcrit court permet une accumulation rapide des ARNr.

Bien que le promoteur du brin léger ne contrôle la transcription que d'un petit nombre de gènes, il est d'une importance cruciale puisqu'il joue également un rôle dans l'initiation de la réplication. Certains transcrits sont clivés dans une région située à environ 200 nucléotides du site d'initiation de transcription. Ces ARN courts servent alors d'amorces pour la réplication de l'ADN. Un mauvais fonctionnement de ce promoteur pourrait donc avoir comme conséquence l'arrêt de la transcription du brin léger, mais également un arrêt complet de la réplication de l'ADNmt (Clayton, 1992a).

1.3.4.2 Réplication de l'ADN mitochondrial

L'ADNmt chez l'être humain possède deux origines de réplication qui sont séparées et distinctes. L'origine du brin lourd (OH) est localisée à l'intérieur de la région régulatrice alors que l'origine du brin léger (OL) est située plus loin, dans une région du génome mitochondrial formée de 5 gènes codant pour des ARNt. L'initiation de la réplication débute toujours au niveau de l'origine OH et se poursuit sur toute la longueur du génome. Lorsque le site de réplication du brin léger est exposé sous forme monocaténaire par le passage de la réplication du brin lourd, il y a initiation de la synthèse du brin léger. Dans ce système, le site OH est donc l'élément dominant dans l'initiation de la réplication, alors que l'origine du brin léger joue un rôle essentiel mais secondaire (Clayton, 1992b).

1.3.4.3 Régulation de l'expression du génome mitochondrial

La régulation de la synthèse de la chaîne respiratoire présente un aspect particulier en ce sens qu'elle requiert la participation de deux génomes. Le premier, le génome nucléaire, code pour la grande majorité des sous-unités protéiques alors que le second, le génome mitochondrial, contribue pour 13 des 70 sous-unités de la chaîne respiratoire. Pour que la synthèse soit bien coordonnée, il y a des systèmes communs de régulation qui font en sorte que les gènes localisés dans le noyau et ceux localisés dans la mitochondrie sont exprimés de façon coordonnée. Du point de vue fonctionnel, c'est le génome nucléaire qui dirige et contrôle la synthèse de la chaîne respiratoire. Il code notamment pour toutes les enzymes nécessaires à la transcription et à la réplication des gènes codés par l'ADNmt.

La transcription du génome mitochondrial débute par l'activation d'un ou des deux promoteurs (LSP et HSP) qui sont sous le contrôle d'un seul facteur de transcription (mtTFA), une protéine de 25 kDa codée par le génome nucléaire (Jaehning, 1993). Lorsque mtTFA est fixé au promoteur, la transcription par la polymérase est grandement stimulée (Parisi et Clayton, 1991). Bien que le mécanisme exact par lequel mtTFA stimule la transcription demeure inconnu, sa liaison à la région promotrice est essentielle. Le facteur mtTFA se lie aux promoteurs dans la région située entre la position -12 et -39 de chaque site d'initiation de la transcription (Shadel et Clayton, 1993). Cette protéine est composée de 204 acides aminés et comprend deux domaines caractéristiques des HMG (high-mobility group proteins) (Fisher *et al.*, 1992). Ces domaines seraient impliqués directement dans la liaison à l'ADN et, par conséquent, à la stimulation de la transcription.

Il semble que l'expression de mtTFA soit sous le contrôle de certains facteurs de transcription également impliqués dans la régulation de certaines sous-unités nucléaires de la chaîne respiratoire (Virbasius et Scarpulla, 1994). Ce mécanisme serait à la base de la coordination de l'expression simultanée des gènes mitochondriaux et nucléaires impliqués dans la synthèse de la chaîne respiratoire.

1.4 Les cytopathies mitochondriales

Les cytopathies mitochondriales représentent un ensemble de maladies d'expression clinique très diverse mais qui partagent un mécanisme commun : le

déficit de la chaîne respiratoire mitochondriale. Ce déficit peut donner lieu à plusieurs symptômes différents touchant préférentiellement le système nerveux et le système musculaire. Le diagnostic d'une cytopathie mitochondriale comporte un ensemble d'étapes hiérarchisées comprenant plusieurs niveaux. Cependant, c'est le déficit enzymatique d'un des complexes de la chaîne respiratoire et/ou d'une mutation (ou délétion) de l'ADNmt qui confirme le diagnostic. Dans les cas où la mutation du génome mitochondrial est hétéroplasmique, on estime qu'il faut au moins 85% des molécules d'ADNmt mutantes pour observer cliniquement des modifications phénotypiques importantes (Shoffner et Wallace, 1992).

Plusieurs études ont fait une description détaillée des cytopathies mitochondriales (Wallace *et al.*, 1995; Wallace, 1994; Brown et Wallace, 1994; Schon *et al.*, 1994; Schapira, 1993; Wallace, 1992a, b). Du point de vue clinique, les premières manifestations des cytopathies mitochondriales peuvent apparaître à tout âge, de la période néonatale à l'âge adulte. Les manifestations neurologiques fréquentes peuvent revêtir plusieurs aspects : encéphalopathie progressive, syndrome cérébelleux, pyramidal ou extrapyramidal, paralysie oculomotrice, surdité de perception, cécité corticale, aphasie, épilepsie et finalement, des signes neurologiques évocateurs d'accidents vasculaires cérébraux. Les manifestations musculaires sont présentes sous forme de myopathie (faiblesse musculaire, fatigabilité, hypotonie) parfois prédominante dans un territoire. Les signes cardiaques réalisent soit un tableau de myocardiopathie ou de troubles du rythme cardiaque (bloc auriculo-ventriculaire en particulier). En plus de ces manifestations fréquentes peuvent s'ajouter des troubles rénaux, hématologiques, pancréatiques, hépatiques, cutanés et métaboliques.

Ces signes pathologiques sont peu spécifiques en soi, mais les associations de plusieurs d'entre eux peuvent faire évoquer une maladie mitochondriale. En fait, la plupart des cytopathies mitochondriales sont en réalité des syndromes. Bien que théoriquement toutes les associations pathologiques soient possibles, certaines semblent plus fréquentes et ont été à l'origine de la description de plusieurs syndromes. Les plus fréquemment observés sont le syndrome MELAS (Mitochondrial Encephalomyopathy with Lactic Acidosis and Stroke-like episodes), le syndrome MERRF (Myoclonus Epilepsy with Ragged-Red Fibers), le syndrome de Kearns-Sayre et l'atrophie optique de Leber (LHON).

Pour l'ensemble des cytopathies mitochondriales, le point commun est un déficit de la chaîne respiratoire. Il est donc extrêmement tentant d'attribuer au déficit de chacun de ces complexes, un tableau clinique particulier. Malheureusement, on observe qu'il y a très peu de corrélation entre le type d'anomalie enzymatique et la symptomatologie clinique. Ce phénomène concerne également les mutations de l'ADNmt, qui sont fréquemment associées à plusieurs types particuliers de cytopathies (Morgan-Hughes *et al.*, 1995). L'expression phénotypique du déficit enzymatique d'un des complexes de la chaîne respiratoire est donc déterminée, avant tout, par la distribution et la sévérité du déficit et par sa localisation au sein de différents tissus.

On peut classer les déficits de la chaîne respiratoire selon leur sévérité. Certains, très délétères, occasionnent des problèmes métaboliques dès la naissance alors que d'autres, moins sévères, se manifestent vers l'adolescence ou encore à l'âge adulte. Il est donc concevable que certaines mutations du génome mitochondrial, très peu délétères, puissent induire des manifestations phénotypiques seulement à un âge avancé. D'ailleurs, l'accumulation d'erreurs

dans le génome mitochondrial joue sans doute un rôle important dans le processus du vieillissement cellulaire (Wallace *et al.*, 1995). Ainsi, certaines mutations qui n'ont aucune conséquence durant l'enfance et à l'âge adulte se manifestent peut-être suite au déclin inévitable des fonctions mitochondriales avec l'âge. Ce type de mutations pourrait être impliqué dans les maladies liées au vieillissement, comme dans la maladie de Parkinson et la MA.

1.5 Modifications des fonctions mitochondriales dans la maladie d'Alzheimer

Plusieurs manifestations physiopathologiques laissent croire que la MA pourrait, dans certains cas, être une forme de maladie mitochondriale. D'abord, l'observation des mitochondries par microscopie électronique du cortex cérébral de sujets Alzheimer a révélé des mitochondries de formes anormales avec une augmentation de la densité de la matrice ainsi que la présence d'inclusions paracrystallines dans l'espace matriciel (Saraiva, 1985). Cette dernière observation présente un certain intérêt, puisque la présence d'inclusions dans la mitochondrie est généralement observée dans les cytopathies mitochondriales. Une autre étude mentionne également qu'une accumulation de mitochondries anormales précède la formation de plaques séniles (Terry et Wisniewski, 1972).

La production d'ATP est également altérée. On observe une diminution d'environ 7% dans le cortex cérébral des sujets Alzheimer préséniles et 20% dans les cas de MA de type sénile. Dans les cas très sévères, on peut observer une baisse de la production d'ATP allant de 35 à 50% (Hoyer, 1992). L'auteur de cette

étude mentionne qu'un tel déficit énergétique peut avoir des conséquences drastiques sur les fonctions cérébrales.

Une étude très intéressante démontre que le traitement de fibroblastes humains cultivés dans un milieu en présence d'un découpleur de la phosphorylation oxydative mitochondriale, le CCCP (Carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone), induit une augmentation de la réactivité immunohistochimique de plusieurs anticorps spécifiques des DNF (anticorps monoclonal et polyclonal contre les DNF ainsi que l'anticorps monoclonal Alz-50) (Blass et Gibson, 1991; Blass *et al.*, 1990). Ceci démontre que lorsque la chaîne respiratoire est inhibée, certaines réactions intracellulaires favorisent la formation de ce type de lésions neuropathologiques.

1.5.1 Déficit de l'activité CO

C'est en 1990 qu'on a observé pour la première fois un déficit de l'activité CO chez des patients souffrant de la MA. Parker *et al.* (1990) ont rapporté que 5 patients Alzheimer sur 6 présentaient un déficit significatif de l'activité CO dans les plaquettes sanguines (moyenne = $52,7 \pm 37,3$ nmol/min/mg) comparativement à des sujets témoins (moyenne = $167,1 \pm 36,2$ nmol/min/mg; $n=8$; $p=0,0002$), alors que les autres complexes de la chaîne respiratoire ne montraient pas de diminution significative. Parker mentionne que la baisse de l'activité CO concorde avec l'augmentation de CO₂ produit par l'oxydation du glucose dans le cortex des sujets Alzheimer (Sims *et al.*, 1983 et 1985). Le déficit de la phosphorylation oxydative implique un influx de carbone plus important pour maintenir les capacités énergétiques de la cellule et pourrait donc être la cause de cette augmentation de

CO₂. Par ailleurs, les plaquettes sanguines ne sont pas connues pour être une cible de la MA, ce qui appuie la thèse que le déficit CO observé dans ces cellules n'est pas un effet secondaire de la destruction des neurones au niveau cérébral. De plus, comme le déficit est limité au complexe IV, ceci suggère que cette situation n'est pas la conséquence uniquement d'une diminution diffuse de l'activité générale de la mitochondrie.

Toutefois, une autre étude n'a pas montré une telle diminution de l'activité CO dans les plaquettes sanguines de sujets Alzheimer (Van Zuylen *et al.*, 1992). Les auteurs mentionnent que dans ces conditions, l'activité CO des plaquettes ne peut être utilisée comme outil diagnostique pour la MA.

Afin de déterminer si la réduction de l'activité CO était également présente au niveau cérébral, Kish *et al.* (1992) ont mesuré l'activité de cette enzyme dans plusieurs régions du cerveau. Ils ont observé un déficit significatif dans le cortex frontal (-26%; $p < 0,01$) et dans le cortex temporal (-17%; $p < 0,05$) de patients Alzheimer comparativement à des sujets témoins du même âge. Dans le cortex pariétal, l'activité était diminuée mais de façon non significative (-17%; $p < 0,055$), alors que l'activité semblait normale dans le cortex occipital et dans le putamen. À titre de contrôle interne, ils ont également évalué l'activité de deux autres enzymes mitochondriales, la glutamate déshydrogénase et la citrate synthase. L'activité de ces deux enzymes était normale dans chacune des régions étudiées. Ceci indique que la réduction de l'activité CO n'est pas la conséquence d'une perte neuronale ou d'une diminution du nombre de mitochondries dans le cortex des sujets Alzheimer.

Récemment, Parker *et al.* (1994) ont évalué l'activité des 4 complexes de la chaîne respiratoire à partir de mitochondries isolées d'un hémisphère cérébral entier de patients Alzheimer (n=9) et de sujets témoins (n=8). Ils ont rapporté une faible réduction (non-significative) de l'activité des complexes I, II et III et une diminution sévère de l'activité du complexe IV ($p < 0,001$). Comme leurs mesures étaient effectuées à partir de mitochondries isolées, la réduction qu'ils ont observée ne peut donc pas être une simple conséquence d'une perte cellulaire dans le cortex cérébral de sujets Alzheimer. Une autre étude a également évalué l'activité enzymatique des 4 complexes de la chaîne respiratoire (Mutisya *et al.*, 1994). Leurs résultats corroborent ceux de Parker *et al.* (1994), puisqu'ils n'ont observé aucun déficit de l'activité des complexes I, II et III dans le cortex cérébral, alors que l'activité CO était réduite d'environ 30% chez des sujets Alzheimer en comparaison de sujets témoins, pour 4 régions corticales.

Finalement, une étude différente a démontré que le nombre de complexes CO par mitochondrie était le même entre des sujets Alzheimer et des individus témoins (Parker et Parks, 1995). Le complexe enzymatique est donc présent physiquement de façon normale, mais son activité catalytique semble être altérée. Les auteurs de cette étude mentionnent que le déficit de l'activité CO observé dans la MA ne provient donc pas d'une diminution du nombre de copies du complexe CO, mais probablement d'une modification de sa structure. Les auteurs mentionnent qu'une mutation du génome mitochondrial pourrait être un des facteurs impliqués dans la modification de la structure du complexe CO, et par conséquent, être une des raisons expliquant le déficit observé dans la MA.

Finalement, l'activité CO a également été mesurée dans le cerveau de patients et de témoins selon une méthode histochimique. En effet, Simonian et

Hyman (1993) ont rapporté une diminution de l'activité CO dans toute la région hippocampique de patients Alzheimer alors que dans le cortex visuel, qui est une région épargnée par la MA, l'activité CO était normale comparée à des témoins.

1.5.2 Augmentation du stress oxydatif

Le stress oxydatif est causé par la présence de radicaux libres qui sont des molécules dont un ou plusieurs électrons sont célibataires sur l'orbitale externe d'un ou plusieurs de ses atomes. Normalement, les électrons de la dernière orbitale s'agencent de manière à former des couples. Si le nombre d'électrons est impair, il se créera alors des liaisons entre atomes, car les radicaux libres tenteront d'aller chercher un électron pour former une nouvelle molécule. Les radicaux ont pour propriété d'être très réactifs et très instables, donc potentiellement pathologique (Halliwell, 1987; Cross *et al.*, 1987). Il se forme, tout à fait normalement, dans notre organisme, des radicaux libres. Ces derniers sont cependant rigoureusement contrôlés par des antioxydants. Quand ce précaire équilibre est rompu, en faveur des radicaux libres, il survient un stress oxydatif. Ce stress est donc causé soit par une baisse de l'activité antioxydante, soit par une augmentation de la production de radicaux libres. Lors d'un stress oxydatif, les radicaux libres endommagent les protéines (Smith *et al.*, 1991), les lipides (Schafer et Thorling, 1990) et l'ADN (Dizdaroglu 1991; Shigenaga et Ames, 1991; Devasagayam *et al.*, 1991). Les conséquences de ce stress entraînent une perte de fonctions et d'intégrité, voire la mort cellulaire.

Les radicaux libres sont représentés dans la cellule par une multitude de molécules différentes. On retrouve entre autres, et de façon abondante, les

superoxydes (O_2^-) qui sont des molécules formées de deux atomes d'oxygène mais avec un électron supplémentaire. L'action oxydative de cette molécule est plutôt faible, mais elle peut générer des radicaux très réactionnels. On retrouve également les radicaux hydroxyles (OH^\cdot) qui sont très réactifs ainsi que les radicaux peroxydes (H_2O_2) et l'oxyde nitrique (NO^\cdot). La chaîne respiratoire mitochondriale est le site le plus important de production des radicaux libres superoxydes à l'intérieur de la cellule (Boveris et Chance, 1973). Ils sont formés lors de mauvais transferts d'électrons entre deux complexes. Advenant un mauvais fonctionnement de l'un des complexes de la chaîne respiratoire, on observe une plus grande production de radicaux libres superoxydes (Partridge *et al.*, 1994).

Il est reconnu que l'effet global du stress oxydatif joue un rôle très important dans le processus du vieillissement (Miquel, 1998). Lorsque l'on compare le niveau des dommages oxydatifs de plusieurs individus d'âges différents, on remarque que ce niveau augmente de façon proportionnelle avec l'âge des sujets (Mecocci *et al.*, 1993). L'ADNmt est d'ailleurs particulièrement affecté par l'effet de ces radicaux libres.

Le stress oxydatif est également impliqué dans le développement de certaines maladies neurodégénératives, incluant la maladie de Parkinson, la sclérose latérale amyotrophique, la chorée de Huntington et la MA (Wei, 1998; Simonian et Coyle, 1996, Bowling et Beal, 1995). Toutes ces maladies portent les stigmates d'une détérioration causée par les radicaux libres. Le fait qu'elles se développent de façon progressive et que leurs incidences augmentent avec l'âge correspond également au mode d'action des radicaux libres dont les effets sont cumulatifs et plus importants avec le vieillissement. Dans la maladie de Parkinson on rapporte une peroxydation importante des lipides dans la substance noire

(région cérébrale très affectée par cette maladie) qui serait causée par l'effet des radicaux libres (Jenner *et al.*, 1992). Dans la sclérose latérale amyotrophique, certains cas sont causés par une défectuosité de l'une des composantes du système antioxydant, la superoxyde dismutase (Rouleau *et al.*, 1996). Pour ce qui est de la Chorée de Huntington, on a découvert récemment le gène défectueux qui en est la cause, cependant le mécanisme précis qui conduit à la neurodégénérescence est encore une énigme. Plusieurs processus pathologiques sont probablement impliqués et quelques évidences, autant chez l'homme que chez des modèles animaux, suggèrent une défectuosité du métabolisme énergétique et une augmentation du stress oxydatif (voir Brown *et al.*, 1999).

Dans le cas de la MA, on détecte dans le cortex cérébral des patients que le niveau de stress oxydatif atteint des valeurs dramatiquement élevées (Zhou *et al.*, 1995; Mecocci *et al.*, 1994). Par exemple, Mecocci *et al.* (1994) observent que le niveau de OH₈dG (8-hydroxy-2'-desoxyguanosine), qui est un biomarqueur des dommages oxydatifs causés à l'ADN, par µg d'ADNmt est de 452,4 ± 96.1 fmol chez des patients Alzheimer (n=13), mais de seulement 139,8 ± 61,6 fmol chez des individus normaux (n=13) (p < 0.01). Les auteurs de cette étude pensent que la hausse importante du stress oxydatif chez les patients Alzheimer serait causée par un mauvais fonctionnement de la chaîne respiratoire. Zhou *et al.* (1995) ont quant à eux évalué le niveau général de radicaux libres à l'aide de la spectroscopie par résonance paramagnétique. Ils ont également observé une différence significative entre 5 patients et 6 témoins (p < 0.01).

Le stress oxydatif provenant de la mitochondrie pourrait jouer un rôle important dans la formation des plaques séniles. En effet, les superoxydes ont la capacité de se fixer sur la partie C-terminale du précurseur de la protéine β-

amyloïde (Benzi et Moretti, 1995) et semblent impliqués dans le processus d'agrégation de cette protéine dans les plaques séniles. De plus, la toxicité du peptide β -amyloïde est accrue considérablement en présence de ceux-ci (Hensley *et al.*, 1996; Manelli et Puttfarcken, 1995). On peut supposer que ce peptide s'accumule normalement lors du vieillissement, mais que la présence de radicaux libres induit une toxicité supplémentaire favorisant le développement de la MA. Ainsi, malgré l'accumulation presque inévitable de cette protéine, le stress oxydatif pourrait être l'un des éléments différenciant les personnes qui développent la MA de ceux qui ne la développent pas.

Pour contrer l'effet néfaste du stress oxydatif, il existe à l'intérieur de la cellule plusieurs systèmes de défense contre les radicaux libres. Un des systèmes majeurs de protection est représenté par une enzyme, la superoxyde dismutase (SOD), qui catalyse la dismutation des radicaux superoxydes en oxygène et en peroxyde d'hydrogène. Ce dernier est ensuite transformé en molécules d'eau par les enzymes catalase et peroxydase (voir Smith *et al.*, 1995). On observe dans la MA que le niveau de la SOD est plus élevé dans le cortex cérébral de patients comparativement à des sujets normaux (Urakami *et al.*, 1995; Lovell *et al.*, 1995). Il s'agit vraisemblablement d'un phénomène compensatoire, en réponse à la formation accrue de radicaux libres. Une autre étude mentionne que le niveau d'activité de la SOD est normal chez les patients Alzheimer (Gsell *et al.*, 1995). Le niveau d'activité de la catalase et de la peroxydase est également normale (Chen *et al.*, 1994). Ces résultats démontrent que la hausse du niveau de stress oxydatif n'est pas causée par une déficience des systèmes de défense mais par une production plus élevée à la base.

Par ailleurs, l'effet des antioxydants appuie fortement l'hypothèse du stress oxydatif dans la MA. Certaines études récentes démontrent que l'administration d'antioxydants à des patients atteints de MA atténue significativement la progression de la maladie. En effet, une étude effectuée sur une période de 2 ans et portant sur 341 patients a démontré que ceux ayant reçu de la vitamine E (antioxydant) ont un taux de progression de maladie significativement plus lent que ceux ayant reçu un placebo (Sano *et al.*, 1997). La progression de la maladie a été évaluée par l'un ou l'autre des événements suivants: décès, institutionnalisation, perte d'aptitude à accomplir les activités de la vie quotidienne.

1.5.3 Modifications du génome mitochondrial

Suite à l'observation du déficit de l'activité CO et de l'augmentation du stress oxydatif chez les sujets Alzheimer, plusieurs études portant sur la recherche d'anomalies du génome mitochondrial en relation avec cette maladie ont été effectuées. Par ailleurs, une augmentation de la transmission maternelle de la MA a été démontrée, ce qui suggère que le génome mitochondrial, dont la transmission est exclusivement maternelle, pourrait être responsable de cette forme d'hérédité (Edland *et al.*, 1996).

Lin *et al.* (1992) ont été les premiers à rapporter la présence d'une anomalie de l'ADNmt chez un groupe de patients. Ils ont détecté une modification ponctuelle à la position 5460 du gène mitochondrial de la NADH déshydrogénase sous-unité 2 (ND2) chez 10 de 19 patients Alzheimer, mais chez aucun de 11 sujets témoins. Deux types de variations ont été retrouvés à cette même position. Une transition d'un G pour un A convertissant l'acide aminé alanine (GCC) pour une thréonine

(ACC) a été identifiée chez 3 des 10 patients porteurs alors que 5 autres patients portaient une transition d'un G pour un T modifiant l'acide aminé alanine (GCC) pour une sérine (TCC). Les deux autres patients étaient également porteurs des deux modifications mais sous forme hétéroplasmiques. Les auteurs suggèrent que cette variation ponctuelle à la position 5460 de l'ADNmt pourrait être un facteur de risque important dans le développement de la MA. Cependant, Petruzzella *et al.* (1992) ont tenté de mettre en évidence cette même modification (5460) dans une autre population. Ils n'ont observé aucune variation à la position 5460 chez les 15 patients Alzheimer étudiés. Ils mentionnent que cette variation est située dans une région peu conservée au cours de l'évolution et qu'elle n'a probablement aucun effet pathologique. De plus, une autre étude portant sur un plus grand nombre de patients mentionne que la variation d'un G pour un A à la position 5460 était présente chez 4,4% (3/68) de patients Alzheimer, mais également chez 8,6% (3/35) d'un groupe témoin. La transition d'un G pour un T n'a été retrouvée chez aucun des sujets étudiés (Shoffner *et al.*, 1993). Les auteurs de cette étude concluent que la variation d'un G pour un A à la position 5460 de l'ADNmt est un polymorphisme de population non relié à la MA.

Shoffner *et al.* (1993) ont également étudié 71 patients (33 Alzheimer, 30 avec Alzheimer et Parkinson et 8 Parkinson) dans le but d'identifier de nouveaux polymorphismes de l'ADNmt associés à l'une de ces maladies. Les modifications intéressantes ont été, par la suite, testés sur un plus grand nombre de patients et de sujets témoins. Une variation à la position 4336 (tRNA^{GLN}) modifiant un nucléotide modérément conservé a été observée chez 5,2% (9/173) des patients, mais seulement chez 0,7% d'un groupe témoin (12/1691). Une autre variation à la position 3397 (ND1) modifiant un nucléotide hautement conservé (méthionine pour une valine) a été observée chez 2,7% (2/73) des patients mais non chez des sujets

témoins (0/248). Les auteurs mentionnent que ces deux modifications sont peut-être des facteurs de risque pour la MA ou de Parkinson.

Dans le but de confirmer l'association entre la variation 4336 et la MA, Hutchin et Cortopassi (1995) ont étudié cette région du génome mitochondrial chez 72 sujets Alzheimer de type sénile et chez 296 témoins appariés pour l'âge. Ils ont observé que la modification 4336, à l'état homoplasmique, était significativement plus fréquente chez les patients (8,3%) que chez le groupe témoin (0,34%). Hutchin et Cortopassi (1995) estiment que 1,5 millions d'individus aux États-Unis sont porteurs de cette variation et qu'ils ont, par conséquent, 27 fois plus de chances de développer la MA que les individus non-porteurs. Récemment, une étude a mis en doute l'association de cette variation avec la MA, puisqu'ils rapportent que seulement un patient sur 155 individus Alzheimer en était porteur (Wragg *et al.*, 1995).

En 1997, le groupe américain MitoKor a publié les résultats d'une étude dont les conclusions sont spectaculaires (Davis *et al.*, 1997). Ils rapportent la présence de 5 différentes variations (positions : 6366, 6483, 7146, 7650 et 8021) dont la fréquence hétéroplasmique est nettement plus élevée chez des patients comparativement à des témoins ($p < 0.001$). La différence la plus importante concerne la variation 7650 qui est détectée à une fréquence de 25% chez les patients et de 15% chez les témoins. Les auteurs suggèrent que ces modifications de l'ADNmt sont la cause de la réduction d'activité du complexe CO que l'on observe chez les patients atteints de la MA. De plus, selon la même étude, des lignés cellulaires hybrides exprimant ces modifications du génome mitochondrial exhibent un déficit de l'activité CO ainsi qu'une augmentation de la production de radicaux libres superoxydes. Ces résultats démontrent selon eux que le génome

mitochondrial doit être considéré comme un facteur de risque pour le développement de la MA. Cependant, cette étude a fait l'objet récemment de contestations très sévères de plusieurs autres groupes de recherche qui considèrent que la méthode d'isolement de l'ADN mitochondrial utilisée par Davis et ses collaborateurs libère plus d'ADN nucléaire que d'ADN provenant de la mitochondrie (Hirano *et al.*, 1997; Wallace *et al.*, 1997). Selon ces deux études, les modifications en question sont situées à l'intérieur de pseudogènes nucléaires et ils n'ont rien à voir avec le génome mitochondrial. Dernièrement, un des chercheurs de MitoKor a publié un article admettant que les 5 modifications détectées chez des patients Alzheimer proviennent en réalité d'un artefact du PCR (Davis et Parker, 1998). Ils auraient amplifié des pseudogènes cytochrome oxydase intégrés, au cours de l'évolution, au génome nucléaire. Ces variations ne seraient, selon eux, aucunement impliquées dans la MA.

En dehors de la présence des modifications ponctuelles affectant un seul nucléotide, certains groupes de recherche ont tenté de déterminer si la fréquence de délétions à l'intérieur du génome mitochondrial était augmentée dans la MA. Il est reconnu que plusieurs délétions qui ne sont pas présentes en bas âge, s'accumulent durant la vie, pour atteindre des valeurs critiques vers l'âge de 90 ans (Lee *et al.*, 1994; Arnheim et Cortopassi, 1992; Simonetti *et al.*, 1992). La plus commune de ces délétions concerne un fragment de 4977 pb situé entre la position 8470 et 13447 de l'ADNmt (Schon *et al.*, 1989). Blanchard *et al.* (1993) ont observé que la fréquence de cette délétion était similaire entre un groupe de patients Alzheimer et un groupe d'individus témoins. Cependant, Corral-Debrinski *et al.* (1994) mentionnent qu'il y a une augmentation importante de cette délétion (15 fois) chez les patients Alzheimer âgés de moins de 75 ans. Par contre, après cet âge, le niveau de la délétion redescend au même niveau que celui observé

chez les témoins. Il est possible que l'augmentation du stress oxydatif favorise le développement de cette délétion mais, qu'après un certain temps, les cellules concernées meurent et les délétions s'éliminent. Ceci expliquerait qu'après l'âge de 75 ans, le niveau de délétions devient comparable à celui des témoins.

Finalement, une étude mentionne que le niveau d'ARNm du gène codant pour la sous-unité COII est diminué dans la région hippocampique de patients Alzheimer comparativement à des sujets témoins (Simonian et Hyman, 1994). Les auteurs mentionnent que cette baisse d'expression est peut-être responsable de la réduction de l'activité CO observée dans la MA. Une étude plus récente rapporte également une diminution de l'expression de certains gènes mitochondriaux (CO I et CO III) dans le cortex cérébral de patients Alzheimer, mais également du gène CO IV qui est codé par le génome nucléaire (Chandrasekaran *et al.*, 1997). Ces résultats suggèrent cette fois-ci que la diminution coordonnée des gènes mitochondriaux et nucléaires du complexe CO serait une conséquence de la réduction de l'activité neuronale dans le cortex des patients Alzheimer. Selon les auteurs, l'effet provoqué par cette baisse d'activité cérébrale provoquerait donc une régulation à la baisse de la machinerie oxydative mitochondriale.

1.6 Hypothèses de travail

Comme nous venons de le voir, certains indices suggèrent que le génome mitochondrial pourrait être un des facteurs impliqués dans l'étiologie de la MA. Cependant, les données de la littérature scientifique demeurent contradictoires, de sorte que le rôle exact de ce génome dans la MA est très nébuleux. En effet, les quelques études concernant l'ADNmt et la MA comportent des failles importantes,

soit que le nombre de sujets est très limité ou que la portion du génome mitochondrial étudiée est très petite. Une seule étude a analysé les 16 kb du génome mitochondrial chez des sujets Alzheimer (Brown *et al.*, 1996), mais elle ne portait que sur 4 patients et aucun témoin. Par conséquent, toutes ces études, très préliminaires, n'ont pas réussi à déterminer si le déficit CO est réellement impliqué dans le développement de la MA, s'il est causé par une anomalie du génome mitochondrial ou s'il ne s'agit que d'une conséquence distante du processus dégénératif.

Génétiquement, le déficit CO, s'il est impliqué dans la MA, pourrait s'expliquer de plusieurs façons. Trois hypothèses génétiques peuvent être retenues. **1)** le déficit CO serait causé par une ou plusieurs mutations ponctuelles homoplasmiques de l'ADNmt présentes chez un nombre substantiel de patients mais non chez des témoins; **2)** le déficit enzymatique serait causé par une accumulation de plusieurs mutations somatiques aléatoires (hétéroplasmie) réparties sporadiquement sur l'ensemble du génome mitochondrial et dont l'effet combiné causerait le déficit CO; **3)** le déficit CO serait causé par la présence d'une mutation du génome nucléaire qui code, rappelons-le, pour 10 sous-unités secondaires du complexe CO ainsi que pour un grand nombre de protéines impliquées dans le transport, l'assemblage et le fonctionnement du complexe. Dans le cadre de cette étude, nous allons chercher à vérifier les deux premières hypothèses. Bien que nous ne rejetions pas la possibilité que le génome nucléaire puisse être la cause du déficit CO, nous allons concentrer nos efforts uniquement sur le génome mitochondrial.

Pour vérifier ces deux hypothèses, il est nécessaire d'effectuer une étude beaucoup plus complète que celles déjà existantes. D'abord, le nombre de patients

et de témoins devrait être suffisamment élevé et, deuxièmement, toutes les régions du génome mitochondrial pouvant influencer l'activité CO devraient être analysées (les trois gènes CO ainsi que les 22 ARNt). C'est précisément ce que nous avons fait dans ce projet de recherche, c'est-à-dire analyser par séquençage les trois gènes CO ainsi que les 22 ARN de transfert de l'ADNmt de 69 patients Alzheimer et de 65 témoins appariés pour l'âge et le sexe. Tous ces individus proviennent de la même population fondatrice (Saguenay-Lac-St-Jean, Québec), ce qui évite de confondre polymorphismes de population et modifications associées à la maladie. L'ADNmt de 18 témoins provenant de la région de Montréal a également été analysé, Les résultats de cette étude génétique vont nous permettre d'éclaircir substantiellement le rôle de l'ADNmt dans la MA et de déterminer si le déficit CO est causé par une anomalie de ce génome.

Avant de nous lancer dans ce projet de séquençage de grande envergure, qui correspond à plus d'un million de paires de bases, nous avons, dans un premier temps, vérifié s'il y avait effectivement une réduction de l'activité du complexe CO chez quelques-uns de nos patients Alzheimer. Advenant le cas où les mesures d'activité CO des patients aient été normales, il aurait été illogique d'impliquer le génome mitochondrial dans la MA et le projet aurait été tout simplement injustifiable.

La dernière partie de ce travail concerne l'étude de l'accumulation des mutations somatiques dans le génome mitochondrial des patients Alzheimer. Sachant que ces mutations somatiques s'accumulent durant la vie d'un individu et qu'elles sont la base de la théorie du vieillissement mitochondrial, il est possible que cette accumulation d'erreurs dans l'ADNmt ait un effet direct ou indirect sur les maladies qui se développent à un âge avancé. Par ailleurs, comme ces mutations

s'accumulent préférentiellement dans les cellules post-mitotiques, comme les neurones, elles pourraient participer au développement de certaines maladies neurodégénératives du vieillissement (voir Kadenbach *et al.*, 1995). Nous cherchons à savoir si ce type de mutations est plus fréquent dans les cerveaux de patients Alzheimer que chez des individus normaux du même âge. Cette étude servira également d'analyse fonctionnelle afin de déterminer le caractère pathogénique de certaines modifications homoplasmiques de l'ADNmt. Notre hypothèse était la suivante : plus une modification homoplasmique est délétère, plus le déficit de la chaîne respiratoire est important et plus le niveau de stress oxydatif est élevé. En conséquence, le nombre de mutations somatiques devrait lui aussi être plus élevé. Ce principe nous permettra de déterminer si certaines modifications homoplasmiques détectées chez des patients Alzheimer sont associées à un taux plus élevé de mutations somatiques, révélant par le fait même leur nature pathologique.

2 - RÉSULTATS

2.1 Article publié dans la revue NeuroReport 6 : 711-715 (1995)

Distribution of brain cytochrome oxidase activity in various neurodegenerative diseases.

Pierre Chagnon, Christine Bétard, Yves Robitaille,
Andrée Cholette et Denis Gauvreau

Abstract

Cytochrome oxidase (CO) is the terminal complex of the mitochondrial respiratory chain which generates ATP by oxidative phosphorylation. We have measured CO activity in six different brain regions of patients with senile dementia of Alzheimer type (SDAT, N=10), presenile dementia of Alzheimer type (PDAT, N=10), Lewy body dementia with SDAT (LBD, N=5), cerebrovascular dementia (CVD, N=10), Parkinson dementia (PD, N=5), and in controls (N=8), as all confirmed by neuropathological evaluation. CO activity was lower in the frontal and parietal cortex of SDAT patients as compared to controls. Patients with PDAT, LBD, CVD or PD showed no significant reduction of the enzymatic activity in the six regions studied. Our results show that reduced CO activity might play a role in the physiopathology of senile dementia of Alzheimer type.

Key words : Alzheimer disease, Parkinson disease, cytochrome oxidase, cerebrovascular dementia, Lewy body dementia.

Introduction

The electron transport chain which generates ATP by oxidative phosphorylation is located in the mitochondrial inner membrane. This pathway is composed of five complexes (1). Cytochrome oxidase (CO, complex IV), the terminal step in the respiratory chain, transfers electrons from cytochrome C into oxygen to produce water. The energy produced by the electron transfer from one complex to another is used to generate a proton gradient in the mitochondrial intermembrane space. Complex V then uses this gradient as an energy source to transform ADP into ATP. CO is an enzymatic complex composed of 13 subunits (2). Three of those subunits are encoded by mitochondrial DNA (mtDNA) whilst the others are encoded by nuclear DNA. CO is not uniformly distributed across the brain but has a very complex pattern of distribution both grossly and microscopically (3). In addition to their bioenergetic role, brain mitochondria are involved in the synthesis and degradation of neurotransmitters.

Neurons require for their functional activity high levels of energy. In normal neural tissue, the relative CO activity is an indicator of local metabolic capacity and it isn't uniform across the tissue. Regions of high CO total activity in the brain can be attributable to larger concentrations of CO or to a higher turnover of the same number of molecules (3); the total activity of CO is a result of the contribution of these two components.

Recent investigations have suggested that a defect in mitochondrial energy metabolism may play a part in the pathogenesis of Alzheimer disease (AD) and Parkinson disease (PD) (4,5). Furthermore, dysfunction of mitochondria might play a key role in aging by contributing to brain cell degeneration (6,7). Deficiencies in complex I have been measured in mitochondria of the PD brain (8), platelet (9) and muscle (10). Parker *et al.* (11) have reported a reduction of CO activity in platelets from five out of 6 AD patients as compared to 8 controls. They suggested that reduction of CO activity might have diagnostic value as a marker of AD. Kish *et al.* (12) have noted reduced CO

activity in the frontal and temporal cortex of Alzheimer brains. Recently, Parker *et al.* (13) evaluated electron transport chain activities (complex I, II, III and IV) in mitochondria isolated from autopsied-brain samples from AD patients (n=9) and from controls (n=8). They reported a generalized reduction of activity of all electron transport chain complexes, although it was most marked in CO activity. Their assays on isolated mitochondria suggest that decreases of CO activity do not reflect as such a loss of mitochondria in the degenerating brain tissue of AD patients. Bennett *et al.* (14) have shown that inhibition of CO activity in rats by chronic infusion of azide sodium resulted in decreased performance in several learning tasks and in inhibition of hippocampal long-term potentiation, a mechanism involved in learning and memory.

The objective of the work reported herein was to determine the distribution of CO activity in different regions of brains in a series of neurodegenerative diseases. We studied senile dementia of Alzheimer type (SDAT), presenile dementia of Alzheimer type (PDAT), Lewy body dementia with SDAT (LBD), cerebrovascular dementia (CVD), Parkinson disease (PD), and controls. The different regions investigated are known to be affected in these neurodegenerative diseases; i.e. frontal cortex, parietal cortex, parahippocampal gyrus, hippocampus, substantia nigra as well as cerebellum. In this study, we report on correlations between CO activity and age, duration of the disease, brain weight, Apo E genotypes, as well as counts of neurofibrillary tangles and senile plaques.

Materials and Methods

Subjects : All research procedures, including brain donations, were conducted with the full understanding and consent of the subjects and/or his/her surrogate. Brains were collected as soon as possible after death and each brain was weighed. One hemisphere was snap-frozen (-80°C) whilst the other was preserved in formalin. We studied the brains of autopsied patients with SDAT,

onset \geq 65 years-old (N=10, 80.0 ± 3.8 years), with PDAT, onset < 65 years-old (N=10, 71.2 ± 5.6 years), LBD with SDAT (N=5, 82.2 ± 6.6 years), CVD (N=6, 80.8 ± 5.6 years) and PD (N=5, 79.2 ± 4.8 years), as diagnosed by clinical exams and extensive chart reviews as well as by neuropathological evaluation. Individuals without a past history of neurological diseases and free of brain pathology were included in the control group (N=8, 76.4 ± 4.2 years). Definite diagnosis of presenile and senile AD was based on the following criteria : fulfillment of the NINCDS-ADRDA criteria for probable or possible AD (15), exclusion of other dementing disorders, as well as histopathological confirmation of AD. The neuropathological protocol was based on a modified Khachaturian scale (16) which requires the presence of at least 20 neurofibrillary tangles/mm³ and 10 senile plaques/mm², irrespective of age, in at least two sections of the limbic lobe and lateral neocortex, after screening for areas richest in degenerative changes on modified Bielschowsky stains. The histopathological diagnosis of LBD was based on documentation of at least 3 cortical Lewy bodies/mm² associated with marked spongiosis, high senile plaque densities and low (or absent) cortical neurofibrillary tangles, as well as a marked degeneration of the substantia nigra and ventral tegmental area with abundant Lewy bodies. All the patients classified as LBD also carried the histopathological features of AD. Vascular dementia was defined by the occurrence of dementia in close association with cerebrovascular hallmarks as demonstrated by clinical data and neuroimaging (CT or MRI), without morphometric evidence of AD. The clinical diagnosis of PD was based on the presence of the usual extra-pyramidal signs and histopathologically by the loss of pigmented cells in the substantia nigra and other pigmented nuclei, as well as by the presence of abundant Lewy bodies in the remaining cells.

Cytochrome oxidase activity : Quantification of CO activity was performed in five different regions of the brain : frontal cortex (FC) (Brodmann area 9), parietal cortex (PC) (Brodmann area 39), parahippocampal gyrus (PHG), hippocampus (H) and substantia nigra (SN). Cerebellum cortex (C) was also included as an internal control. CO activity was assayed using a protocol modified from Storrie and Madden (17). Approximately 100 mg of frozen brain tissue was collected from each region. Tissue samples were homogenized in 5 volumes of ice-cold isolation buffer (0.25 M

sucrose, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl [pH 7.4]). Total proteins were quantified following the method of Macart and Gilbert (18) and the homogenates were adjusted to a concentration of 5 µg of protein per µl. Cytochrome C (Sigma C-7752) was reduced by dissolving 13.5 mg of enzyme in 5 ml of phosphate buffer (6.2 mM K₂HPO₄ / 33.8 mM KH₂PO₄) [pH 6.2] and by adding 60 µl of a sodium hydrosulfite solution (10 mg/ml) (Sigma S-1256). The homogenates (100 µl) were mixed with 0.9 ml of a potassium phosphate buffer containing 0.244% polyoxyethylene 9-lauryl ether (Sigma P-9641). Finally, 0.1 ml of reduced cytochrome C was added and the absorbance was assessed at 550nm (Milton Roy Spectronic 1001 plus) using a potassium phosphate buffer containing polyoxyethylene 9-lauryl ether as a control. Absorbance was measured every 15 seconds for 4 minutes.

Apo E genotyping : Apo E genotyping was carried out for all the subjects included in this study as previously described (19).

Statistical analyses : The data have been subjected to a one-way ANOVA analysis. In the presence of a significant overall effect, the Student-Newman-Kuels test was done with significance level at 0.05.

Results

ANOVA analysis showed a significant difference between groups of cases for the frontal cortex (-34%; $p < 0.05$) and the parietal cortex (-38%; $p < 0.05$). The Student-Newman-Kuels test indicated that in both cases the difference was due to a reduction of CO activity in the SDAT group as compared with controls. No reduction was observed in the parahippocampal gyrus, the hippocampus, substantia nigra and cerebellum (Figure 1). Moreover, no statistically-significant differences could be observed in PDAT, LBD, CVD and PD patients for all those latter regions (Figures 1a and 1b). However, LBD patients demonstrated a small reduction of CO activity in the

frontal and parietal cortex (Figure 1a). This small reduction of CO activity could be due to the presence of Alzheimer signs in these subjects. Interestingly, CO activity showed different patterns in SDAT and PDAT, with severe reductions in the former whilst in PDAT patients it was only very moderately reduced. Statistical analyses revealed a significant difference between these two groups for the frontal cortex and the parahippocampal gyrus.

CO activity in SDAT and PDAT was plotted according to age of onset for the frontal and parietal cortex. The results presented in Figure 2a reveal that age of onset is correlated with CO activity in all AD subjects ($r=-0.85$). This observation holds for both SDAT and PDAT. It seems that the later AD patients show their first symptoms, the lower the CO activity is in the frontal and parietal cortex. A similar correlation has been observed with the age at death (data not shown). To test whether or not the CO activity reduction wasn't simply a reflection of aging, we also plotted our results according to age in controls and CVD patients (Figure 2b). In these cases, we couldn't establish a correlation between CO activity and age for both frontal and parietal cortex.

In the substantia nigra, no significant differences in CO activity could be measured between PD, SDAT, PDAT, LBD and CVD as compared with controls. On average however, PD patients had slightly higher CO activity than that of controls for substantia nigra which might indicate that a reduction of CO activity in substantia nigra is not a key feature of Parkinsonian neurodegeneration. Total CO activity was drastically lowered in the cerebellum as compared with the other tested regions, but the cerebellum presented no significant differences in CO activity between all the subgroups studied and as compared with controls. This difference of CO activity in the cerebellum can probably be explained by the presence of a different CO isoform, since we know that the CO subunits are tissue-specific and developmentally-regulated (20).

Interestingly, we have shown that the duration of the disease correlates with CO activity (Figure 3). For shorter durations, CO activity was reduced substantially while longer durations (>10 years) brought CO activity to subnormal levels.

We observed rather important variations in CO activity for each region tested within a single group of samples. To explain this variation, we checked on the severity of neuropathological lesions, namely the counts of senile plaques and neurofibrillary tangles. No correlation was measured between CO activity and the number of senile plaques per mm^2 within each region. This was also true for CO activity and the number of neurofibrillary tangles per mm^3 (data not shown).

CO activity was also studied according to post mortem intervals. As we couldn't measure any correlation in this respect, it would appear that the CO enzymatic complex is stable and relatively resistant to proteases after death. Furthermore, the brain mass did not seem to affect CO activity because we found no correlation between these two variables.

Finally, each individual included in this study was genotyped for Apo E polymorphism. As expected we found an increase of e4 allele frequency in AD subgroups, namely SDAT, PDAT and LBD, but no increase in CVD and PD as compared with controls. No correlation was measured between CO activity and the presence of e4 allele in the subgroups.

Discussion

By virtue of the fact that cytochrome oxidase is absolutely essential in the oxidative phosphorylation process to generate the ATP that is required for energy-dependent neural functions, its levels of activity constitute an important parameter in assessing tissue damage. Thus, CO and other energy-related enzymes can be considered as indicators of the neural tissue's capacity to produce metabolic energy. It is also reasonable to suggest that a substantial reduction in cellular energetic yields affects the global metabolism of a cell and may be one of the key factors involved in neuronal degeneration. In SDAT patients, we observed a statistically significant reduction of CO activity as compared with controls for both frontal and parietal cortex. PDAT and

LBD subjects demonstrated a moderate decrease in CO activity in frontal cortex. As compared with controls, this reduction was not statistically significant. In contrast, demented patients without AD pathology, i.e. PD and CVD, showed no difference in CO activity as compared with controls.

In SDAT and PDAT the clinical outcome is rather similar in terms of cognitive and neurological impairments, as well as with respect to neuropathological features. Considering these two clinical entities as a single disease with only a difference in the age of onset might be an oversimplification of the pathological process. As revealed by the differences observed in this study for CO activity between SDAT and PDAT, the onset of the disease could be controlled by different factors. CO activity might be one of these factors with age as a cofactor.

In this work, we observed an intriguing correlation between the duration of the disease and the CO activity (Figure 3). The delay between onset and death was diminished with a CO activity dramatically lowered. This could suggest that CO is not involved in the onset per se of the disease, but that it can accelerate the process of degeneration and death in old subjects. Since individuals with shorter duration of the disease were not necessarily the oldest, it seems that this correlation is not due solely to aging processes.

The CO activity measurements were established for a standardized amount of proteins. As such, it might be argued that the reduction of CO activity reflects tissue degeneration in the AD patients. To test this hypothesis, it would be necessary to isolate mitochondria from each brain region, quantify the mitochondrial proteins and measure CO activity on these fractions. This approach was used by Parker *et al.* (13) to study the four mitochondrial complexes. They showed a reduction only in complex IV activity for 9 AD patients as compared with 8 controls. If the decrease of activity were directly related to neuronal loss, all the four complexes should have been affected. The results presented herein demonstrate clearly that CO is involved in AD physiopathology but it is by no means clear whether it acts as a cause or is simply an effect of the pathological processes.

We observed no statistical difference for CO activity in Parkinsonian patients as compared with controls in the six brain regions studied. Schapira *et al.* (8) tested 9 patients and 9 controls and reported a reduction of complex I in Parkinson disease. We conclude that CO is probably not implicated actively in PD physiopathology, although it is impossible to exclude other complexes of the respiratory chain.

Based on our results, the decrease in CO activity is accelerated in AD patients as compared with age-matched controls who have potentially a lowered CO activity. This might explain why we found a difference in CO activity between SDAT and PDAT patients. CO activity seems to be diminished in SDAT patients who happen to be the oldest, and accordingly who are at greater risk of accumulating mutations in genes coding for CO complex subunits. Three out of the ten CO subunits are encoded by mtDNA. It is possible that mutations in the mtDNA which is known to be particularly sensitive causes the observed reduction in CO activity of SDAT patients. Thus, a mutation in one of these three genes could lead to conformational modification of the corresponding CO subunits, affecting CO activity and ultimately lowering the energetic yield. The cellular metabolism would then be modified and below a threshold of ATP production, the processes of neurodegeneration would be initiated in the brain.

Conclusion

Even if it is generally acknowledged that different factors can initiate neuronal degeneration, it appears that we should consider CO activity as one of the hallmark neurochemical features in certain pathological conditions. Interestingly, the reduction of CO activity was specific to SDAT in the frontal and parietal cortex as compared with other dementing pathologies. The results presented in this report show that the regions not involved in neurodegeneration (such as the cerebellum), have levels of CO activity comparable to those of the controls, suggesting complex IV integrity in this tissue.

We found a correlation between CO activity and age of onset in SDAT and PDAT. This result suggests that aging phenomena contribute actively to the decrease of CO activity in Alzheimer and that they could possibly act as a cofactor. Unexpectedly, we observed a correlation between the duration of the disease and CO activity. We propose that CO activity might be implicated in the physiopathology of AD and accelerate the processes of degeneration leading to death. Although we still consider our results as preliminary, they warrant a larger comprehensive study, one which would include more patients in order to evaluate more precisely the role of CO activity in the neurodegenerative processes and duration of AD, as it is paramount to CO activity plays an active role in Alzheimer or if it's simply an effect of the neurodegeneration.

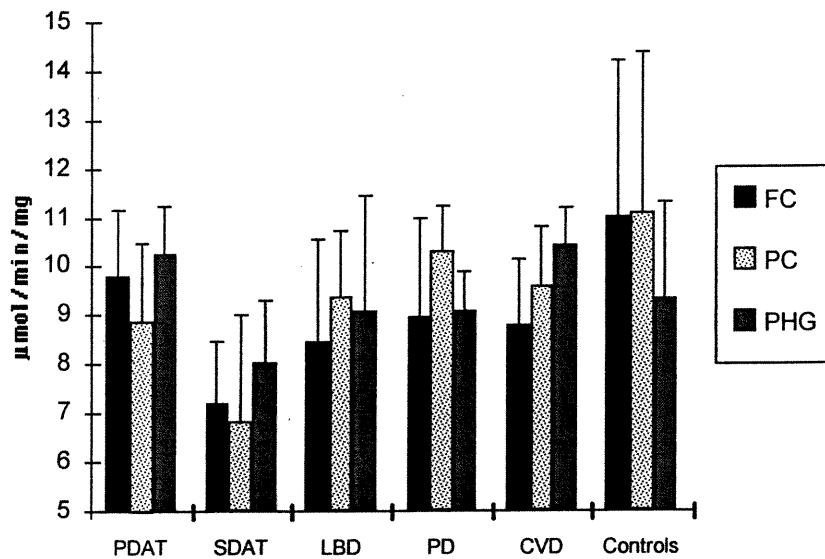
ACKNOWLEDGMENTS : We are especially grateful to the patients and the families who participated in this study. This research was supported by the Société d'exploitation Algène Biotechnologies Inc. and by the Centre Hospitalier Côte-des-Neiges. We thank Mr. Benoît Filion for assistance in measuring protein concentrations and Mr. Mark Gee for Apo E genotyping. Finally, we thank Drs. Paolo Caramelli and Patrice Roy for useful comments on this manuscript.

References

- 1 - Kadenbach B *et al.* *Rev. Neurol.* **147**, 436-442 (1991).
- 2 - Kadenbach B *et al.* *Annal Biochem.* **129**, 517-521 (1983).
- 3 - Hevner RF and Wong-Riley MTT. *J. Neurosci.* **9**, 3884-3898(1989).
- 4 - Wallace DC. *Ann. Rev. Biochem.* **61**, 1175-1212 (1992).
- 5 - Wallace DC. *Science* **256**, 628-632 (1992).
- 6 - Corral-Debrinski M. *Nature Genetics* **2**, 324-339 (1992).
- 7 - Blass JP. *Neurology* **43** (4), 525-538 (1993).
- 8 - Schapira AHV *et al.* *J. Neurochem.* **54**, 823- (1990).
- 9 - Parker WD *et al.* *Ann. Neurol.* **26**, 719- (1989).
- 10 - Bindoff *et al.* *J. Neurol. Sci.* **104**, 203 (1991).
- 11 - Parker WD *et al.* *Neurology* **40**, 1302-1303 (1990).
- 12 - Kish SJ *et al.* *J. Neurochem.* **59**, 776-779 (1992).
- 13 - Parker WD *et al.* *Neurology* **44**, 1090-1096 (1994).
- 14 - Bennett MC *et al.* *J. Geriatr. Psychiatry Neurol.* **5**, 93-101 (1992).
- 15 - McKham *et al.* *Neurology* **34** (7), 939-944 (1984).
- 16 - Tiberghien *et al.* In *Alzheimer's Disease: Advances in Clinical and Basic Research* 121-127 John Wiley & Sons Ltd (1993).
- 17 - Storrie B and Madden EA. *Methods in Enz.* **182**, 203-25 (1990).
- 18 - Macart M and Gilbert L. *Clin. Chim. Acta* **122**, 93-101 (1982).
- 19 - Bétard C *et al.* *Neuroreport* **5**, 1893-1896 (1994).
- 20 - Kadenbach B *et al.* *Curr. Top Bioenerg.* **15**, 114-161 (1987).

Figure 1. Cytochrome oxidase activity in presenile dementia of Alzheimer type (PDAT), senile dementia of Alzheimer type (SDAT), Lewy body dementia (LBD), Parkinson disease (PD), cerebrovascular disease (CVD) and controls. (**Figure 1a**) for frontal cortex (FC), parietal cortex (PC) and parahippocampal gyrus (PHG). (**Figure 1b**) for hippocampus (H), substantia nigra (SN) and cerebellum (C). Cytochrome oxidase activity is expressed in $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$.

1a.



1b.

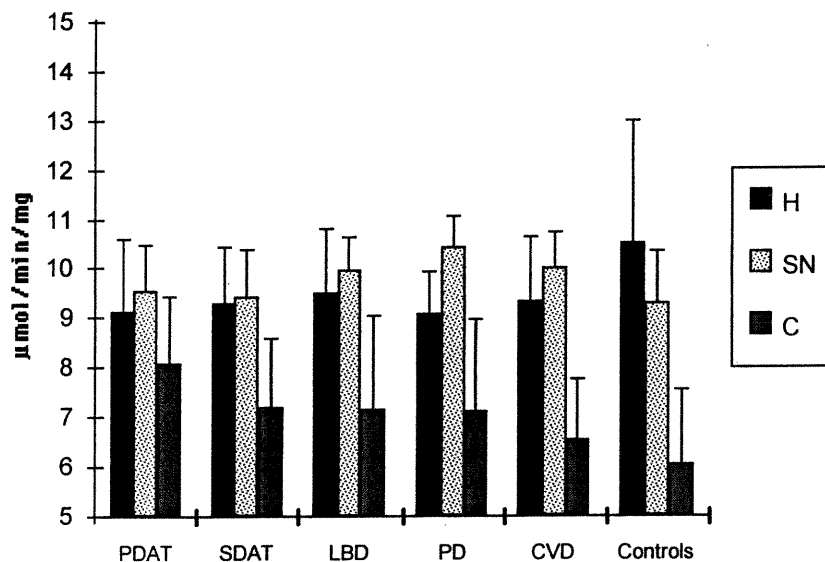
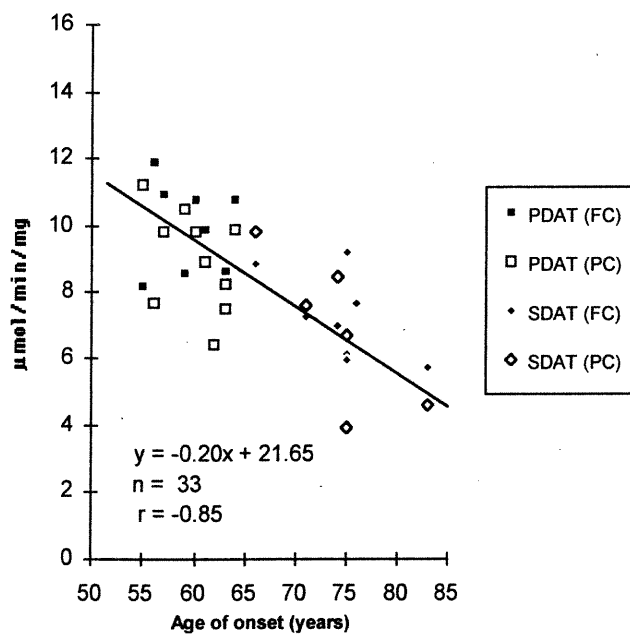


Figure 2. Cytochrome oxidase activity for frontal cortex (FC) and parietal cortex (PC) in presenile dementia of Alzheimer type (PDAT), and in senile dementia of Alzheimer type (SDAT) in relation with age of onset of the disease (**Figure 2a**), and in controls and in CVD patients in relation with age at death (**Figure 2b**).

2a.



2b.

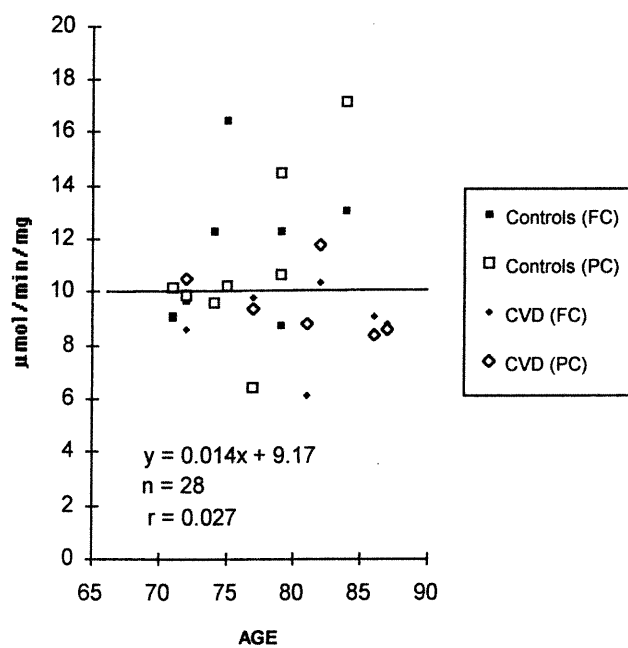
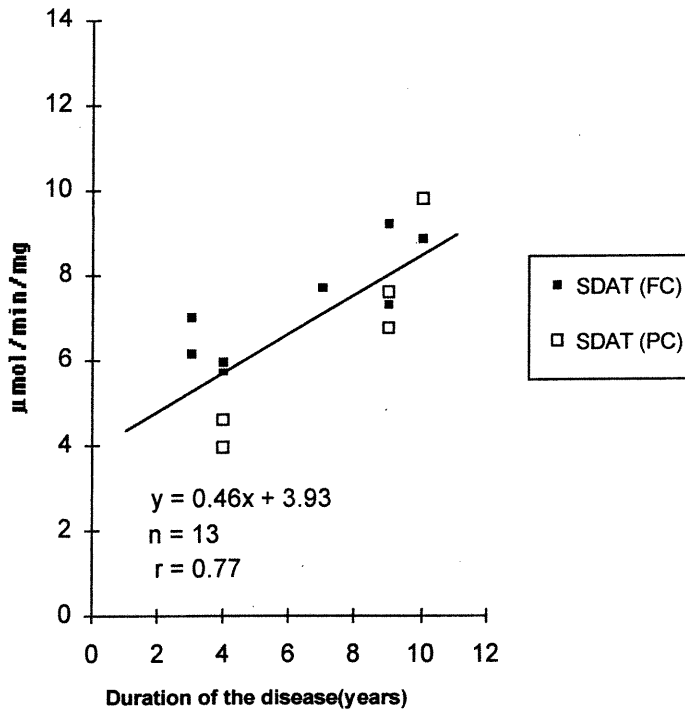


Figure 3. Cytochrome oxidase activity in senile dementia of Alzheimer type (SDAT) for frontal cortex (FC) and parietal cortex (PC) in relation with the duration of the disease.



2.2 Article publié dans la revue Alzheimer's Research
2 : 237-242 (1996)

Brain mitochondrial DNA polymorphism and cytochrome
oxidase activity in Alzheimer disease.

Pierre Chagnon, Yves Robitaille et Denis Gauvreau

Abstract

Cytochrome oxidase (CO) is the terminal complex of the mitochondrial respiratory chain which generates ATP by oxidative phosphorylation. We have already reported a significant reduction of CO activity in the frontal and parietal cortex of senile dementia of the Alzheimer type (SDAT) patients, as compared with controls and other neurodegenerative diseases. We also observed a correlation between CO activity and the disease duration. To further elucidate this reduction of activity, we used a restriction fragment length polymorphism method to analyze the region of mitochondrial DNA (mtDNA) which encompasses the CO genes. We tested 31 SDAT patients, 16 patients with presenile dementia of the Alzheimer type (PDAT), as well as 18 controls. Many polymorphisms were found at a higher frequency in Alzheimer patients (positions 3480, 4578, 5460, 6260, 7476 and 8251). The mutation at position 4336 (tRNA^Q) which has already been associated with an increased risk for Alzheimer disease was not found in any of our subjects. Our results suggest that some polymorphisms in mtDNA could be associated with Alzheimer disease.

Key words :

Alzheimer disease

Cytochrome oxidase

Disease duration

Mitochondrial DNA

Polymorphism

Introduction

Alzheimer disease (AD) is a neurodegenerative disorder characterized by progressive loss of memory and significant changes in cognitive functions. It is also the most common cause of dementia over the age of 60.

Biochemical and genetic data from various sources have suggested that a proportion of AD may be associated with mitochondrial dysfunction.¹⁻⁷ First, there is a significant increase of oxidative damage in mitochondrial DNA (mtDNA) in frontal and parietal cortex in AD patients as compared with controls.⁸ Second, Shoffner *et al.*¹ have reported that an A - G mutation of the mitochondrial tRNA^Q gene at position 4336 occurs at an increased frequency (5.2%) in Caucasian persons who have died of AD and/or Parkinson disease as compared with Caucasian controls (only 0.7%). Finally, another point mutation was also detected at position 5460 of the gene ND2 in 10 out of 19 Alzheimer brains but not in 11 normal brains.² However, this result was not corroborated by other groups.^{9,10}

Recently, we have showed that cytochrome oxidase (CO) activity was significantly reduced in the frontal and parietal cortex of senile dementia of the Alzheimer type (SDAT) patients as compared with controls and other patients with various other neurodegenerative diseases.¹¹ We also observed a correlation between CO activity and disease duration in SDAT patients.

Mitochondrial DNA mutations in CO genes could obviously be key factors explaining the reduction of CO activity in SDAT patients. In this report, we review the results of a restriction fragment length polymorphism analysis (RFLP) for the region of mtDNA which encompasses the three CO genes.

Materials and methods

Subjects

We investigated three groups of subjects: 31 patients (10 males and 21 females, 80.6 ± 6.5 years) with SDAT (onset > 65 year-old); 16 patients (3 males and 13 females, 68.0 ± 5.9 years) with presenile dementia of the Alzheimer type (PDAT, onset < 65 year-old); and 18 normal control brains (10 males and 8 females, 72.2 ± 7.1 years). All the patients included in this study died with severely impaired cognitive functions. The control cohort was validated by chart and autopsy protocol reviews to screen for cognitive defects and/or neuropsychiatric disorders.

All research procedures, including brain donations, were conducted with the full understanding and consent of the subjects and/or his/her surrogate. Brains were collected within 24 hours after death. One hemisphere was snap-frozen (-80°C) whilst the other was preserved in 10% buffered formalin. Definite diagnosis of AD was based on the following criteria : fulfillment of the NINCDS-ADRDA criteria for probable or possible AD,¹² exclusion of other dementing disorders, as well as histopathological confirmation of AD. The neuropathological protocol was based on a modified Khachaturian scale¹³ which requires the presence of at least 20 neurofibrillary tangles/ mm^3 and 10 senile plaques/ mm^2 , irrespective of age, in at least two sections of the limbic lobe and lateral neocortex, after screening for areas richest in degenerative changes on modified Bielschowsky stains.

Cytochrome Oxidase Activity

We quantified CO activity in the frontal cortex (Brodmann area 10) and parietal cortex (Brodmann area 39) of 31 autopsied SDAT patients and 7 controls. CO activity was determined by a spectrophotometric procedure as previously described.¹¹ Briefly, 100 mg of frozen brain tissue

from each region was homogenized in an ice-cold isolation buffer. After quantification of total proteins and adjustment of the homogenates to a concentration of 5 µg of protein per µl, 0.1 ml of reduced cytochrome C was added to 100 µl of the homogenates solution mixed in potassium phosphate buffer. The absorbance was assessed at 550 nm every 15 seconds for 4 minutes after a 30 second preincubation period.

Mitochondrial DNA Isolation

Mitochondrial DNA was extracted from 1 g of frontal cortex (Brodmann area 10) using the QIAGEN-tips method.¹⁴ This specific area was selected because of the significant reduction of CO activity that we had previously observed.

Polymerase Chain Reaction (PCR)

CO genes were polymerase-chain-reaction (PCR) amplified in 4 overlapping fragments which encompass the region between positions 3007 and 10088 according to Anderson *et al.*¹⁵ Segments of mtDNA were amplified from 1-10 ng of purified mitochondrial DNA in 100 µl of reaction mixture containing 200 µM of each dNTP, 20 pMol of each primer, 2.5 units of Taq DNA polymerase, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3) and 1.5 mM MgCl₂. The reactions were carried out for a total of 32 cycles. The cycle times were as follows : 94°C for 45 sec, 57°C for 45 sec and 72°C for 2 min.

Oligonucleotide Primers

Oligonucleotide primers were synthesized with an automatic DNA synthesizer (Applied Biosystems Model 394) and then purified on oligonucleotide purification cartridges according to the

manufacturer's instructions. The oligonucleotide primers used for PCR and their nucleotide positions were :

Fragment 1

(3007-3023, CCC.GAT.GGT.GCA.GCC.GC)

(5917-5898, CGG.TCG.GCG.AAC.ATC.AGT.GG)

Fragment 2

(5317-5333, CCA.CCA.TCA.CCC.TCC.TT)

(7608-7588, CCT.ACT.TGC.GCT.GCA.TGT.GCC)

Fragment 3

(7392-7410, GGA.TGC.CCC.CCA.CCC.TAC.C)

(8921-8902, CCT.TGT.GGT.AAG.AAG.TGG.GC)

Fragment 4

(8282-8305, CCC.CTC.TAG.AGC.CCA.CTG.TAA.AGC)

(10107-10088, TAG.TAA.GGC.TAG.GAG.GGT.G)

Restriction Analysis

20 µl of each PCR reaction was independently digested with the following 21 restriction endonucleases : Alu I, Ava II, Bbv I, Bcl I, BsaI, Bsr I, Dde I, Fnu4H I, Fok I, Hae III, Hinf I, Hph I, Mbo I, Mbo II, Mnl I, Mse I, Msp I, Nla III, Nla IV, Rsa I and Ssp I. The experimental conditions and buffers used were those recommended by the manufacturer. All enzymes were purchased from New England Biolabs. After a 16 h digestion at 37°C, the samples were heated at 65°C to inactivate the enzyme. The digested fragments were separated by electrophoresis on horizontal agarose gels (0.8-1.5%). The gels were then stained with ethidium bromide and photographed under UV light.

Statistical Analyses

Data on CO activity were analyzed using a two-factor ANOVA, adjusted for unequal group sample sizes, with the main factors of interest being disease duration and brain region. Multiple pairwise comparisons of group level means were based on the Tukey method.

Apolipoprotein E Genotyping

Apolipoprotein E genotyping was performed using a fluorescent PCR-RFLP assay¹⁷ according to a protocol modified from Wenhan *et al.*¹⁸ Briefly, a 208 bp segment from exon 4 of the apo E gene was amplified enzymatically from genomic DNA by fluorescent-based polymerase chain reaction. The amplified fragments were digested with 5 U of the restriction endonuclease *Cfo* I. The reaction were incubated for 3 h at 37°C followed by an enzyme inactivation step at 72°C for 20 min. The resulting pattern of digestion fragments was visualized on a 6% sequencing gel with an automatic model 373 DNA sequencer (Applied Biosystems).

Results

Two-way ANOVA analysis showed a significant difference among the four groups ($p < 0.0001$) but not between the two different brain areas (Figure 1). The Tukey test indicated a significantly lower CO activity in the AD patient with the shorter (3-5 years, $n=17$) and intermediate (6-10 years, $n=9$) disease duration compared to the control group ($n=8$). We also observed a significant difference between SDAT patients who had a shorter disease duration, as compared with patients who had a longer disease duration ($n=5$).

Apolipoprotein E genotyping revealed that CO activity is correlated with the presence of the allele $\epsilon 4$. The patients who had 2 $\epsilon 4$ alleles had reduced CO activity in parietal cortex (3.57 ± 0.59

$\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$), as compared with patients who didn't have e4 allele ($5.05 \pm 1.30 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$). The group of patients with only one e4 allele had intermediate mean CO activity levels ($4.37 \pm 1.42 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$), as compared with the two other groups.

The mtDNA sequence as defined by Anderson *et al.*¹⁵ was used as a standard from which the expected restriction pattern was inferred for each enzyme digestion and for each of the 4 PCR segments. The 21 restriction endonucleases used in this study screened approximately 12% of the region of mtDNA between positions 3007 and 10107.

No deviations in the cleavage patterns as predicted from the published sequences of mtDNA were seen with 13 of the 21 restriction endonucleases (Bbv I, Bcl I, BsaI, Bsr I, Dde I, Fnu4H I, Fok I, Hinf I, Mbo II, Mnl I, Mse I, Msp I, and Ssp I). The 8 other restriction endonucleases (Alu I, Ava II, Hae III, Hph I, Mbo I, Nla III, Nla IV and Rsa I) detected some polymorphisms, some of them have already been reported.

A total of 11 polymorphic sites were observed in this RFLP analysis. Table 1 summarizes all the observed polymorphisms (i.e. restriction endonuclease, gene and position) and their frequency in our 3 study groups (SDAT, PDAT and controls). Some subjects presented many mtDNA variants.

The tRNA^Q variant at position 4336 already associated with Alzheimer's and Parkinson diseases¹ was not detected by the digestion of fragment 1 with the enzyme Ava II in any of our study subjects (SDAT, PDAT and controls). It seems that we should have observed this mtDNA variant in 2 or 3 patients. However, our sample was maybe too small for detection of this variant or alternatively it is also possible that this variant is not present in the population of Quebec.

The ND2 variant at position 5460 which was associated with Alzheimer disease² was detected in this study by the digestion of fragment 2 with the enzyme Hph I in two of the 31 SDAT patients although not in the PDAT patients and the control group. Nucleotide sequences revealed a G to A substitution at position 5460. The result of this base substitution is a replacement of alanine by threonine. The two SDAT patients who presented this mutation had a severe decrease of CO activity in both frontal and parietal cortex (3.97 and 4.32 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$), as compared with the control group (6.35 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$).

A nucleotide change around position 3480 (ND1) or 3730 (ND1) created a restriction site for the enzyme Nla IV in fragment 1. This variant was observed in 6 of the 31 SDAT patients (19.4%), 2 of the 16 PDAT patients (12.5%), and in only 1 of the 18 controls (5.5%). We did not determine the exact position of this modification. However, an A to G substitution at position 3480 is known to create a Nla IV site.¹⁹ We presume that the modification that we have observed could be as a result of this substitution. Even though the mt DNA variant at position 3480 doesn't change an amino acid in the ND1 gene and can not be considered as a cause for the reduction of CO activity, it is noteworthy mentioning that the frequency of this modification is 3.5 times greater in the SDAT group as compared with the control group. Frontal cortex CO activity of the 6 SDAT patients with this variant (4.42 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$) was slightly under the average activity for all the patients (4.87 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$) and clearly under the average activity of the control group (6.35 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$). Moreover, 4 of those 6 patients had a short disease duration.

The mtDNA variant at position 4578 was observed after digestion of fragment 1 with the enzyme Nla III. This modification was found in 3 of the 31 SDAT patients, but not in the PDAT patients and control groups. This restriction polymorphism does not change an amino acid in the ND2 gene.

Another modification was detected by digestion of fragment 2 with the enzyme Hae III at position 6260 of the CO1 gene. This variant was observed in 2 of the 31 SDAT patients and also in 1 of the 16 PDAT patients but not in the control group.

The Alu I modification at 7476 (tRNA^S) was present in 2 of the 31 SDAT patients and in 1 of the 16 PDAT patients but not in the 18 control subjects. This point mutation was previously detected in only 1 of 113 subjects representing four broad geographic categories,²⁰ as well as in only 1 of 100 controls in a different study.²¹

We observed a modification at position 8251 created by the digestion of fragment 3 with the enzyme Hae III in 4 of our 31 SDAT patients (12.9%) and in 3 of the 16 PDAT patients (18.8%), but not in the 18 controls (0%) (Figure 2). Moreover, the seven patients who had this modification also harbored another polymorphism detected by the enzyme Alu I in fragment 4. It was impossible to determine the exact position of this modification, which could reflect the polymorphism (Alu I) already known at position 10028 in the gene tRNA^G²² or alternatively it could be a new mtDNA variant. Interestingly, we observed a severe decreased of CO activity in the 4 SDAT patients with those mutations (3.91 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$) as compared with the average activity for all the patients (4.87 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$) and the average activity of the control group (6.35 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$). Moreover, those 4 patients died rapidly (i.e., within 4 years) after the first symptoms of the disease.

A polymorphism was detected by the digestion of fragment 3 with the enzyme Mbo I at position 8616 of the ATPase gene. This variant was observed in 2 of the 31 SDAT patients but not in PDAT patient and in the control group.

Two different polymorphisms were detected by the digestion of fragment 4 with Rsa I and Hae III. Those two modification are the result of site gain and we were not able to determine the

exact position of the base substitution. Since the frequency of those polymorphisms is very low, we don't believe that they could have a role in Alzheimer disease.

Finally, a deletion of approximately 900 bp was observed after the amplification of fragment 3 in one of the SDAT patients (Figure 3). This subject presented a severe decrease of CO activity (3.26 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$) and died 3 years after the first symptoms of the disease.

Discussion

It is now more widely recognized that a reduction of CO activity is a characteristic feature of AD neuropathology. Previously, we had shown that CO activity was significantly reduced in the frontal and parietal cortex of SDAT patients as compared with controls and other neurodegenerative diseases.¹¹ We had also observed a correlation between CO activity and disease duration. However, that observation was considered as preliminary in view of our initial sample size, since CO activity had been measured in only 8 SDAT patients. In this report, we examined this correlation in a larger cohort composed of 31 SDAT patients selected on the basis of different disease durations.

The results reported herein have confirmed our preliminary results which established a correlation between disease duration and CO activity. Thus, we observed a significant reduction of CO activity in the parietal cortex of SDAT patients who presented a shorter disease duration (< 5 years) as compared with either SDAT patients who had a longer disease duration (> 10 years) (-32%, $p < 0.05$) or controls (-39%, $p < 0.01$). The correlation also holds for the frontal cortex.

Our data are consistent with the hypothesis that reduction of cortical CO activity regulates the pace of the degenerative processes in SDAT. This effect could be mediated through a down regulation of the respiratory chain, thereby resulting in a downward shift of ATP synthesis and an

increased release of free radicals. In fact, these are already considered as important factors in the pathophysiology of AD, and it is easy to imagine that a cell with altered energy capacities could be more vulnerable and prone to the disease development.

We believe that it is of clear interest to know whether the decrease in CO activity acts as a trigger of AD, or if it is simply another secondary intermediate step in the pathological processes. The findings by Parker and Parks⁵ showing that CO is physically present in normal concentrations in AD brains suggest that the decrease of CO activity might not be only a consequence of the loss of neurons in AD. In fact, their work suggests some structural problem with CO which might result from a mutation in mitochondrial DNA. Moreover, if the reduction of CO activity were just a consequence of the loss of neurons in AD, it seems likely that all four activities of the respiratory chain complexes should be decreased simultaneously. Yet, Parker *et al.*⁶ found that only the complex IV (CO) was decreased significantly in AD patients.

CO activity is obviously essential to neuronal activity in specific brain regions. It is quite possible that reductions in CO activity lead in the first instance to reduced regional cerebral activity and that beyond a certain threshold, this reduction accelerates neuron degeneration. The results presented in this paper would indicate that reduction in CO activity has to be considered as another pathological process that can accelerate the course of the disease and lead to cell death. Therefore, CO activity might in fact constitute a distinct susceptibility factor to SDAT even if it works possibly in conjunction with other genetic or environmental factors.

In order to investigate the reduction of CO activity, we used RFLP methods to analyze the mitochondrial genome region containing 3 genes which contribute to the formation of this complex. Many mtDNA variants were found at a higher frequency in AD subjects as compared with the control group (Table 1).

It is known that polymorphisms detected at positions 4578, 6260, 8012, 8251 and 8616 do not modify the amino acid sequence.¹⁹ Therefore, they cannot have a direct role in the pathology of AD. However, we have detected two other polymorphisms in fragment 1 (Nla IV) and in fragment 4 (Alu I). Although their exact position was not determined, it is possible that these are the two polymorphisms already reported at positions 3480 and 10028 and consequently we know that they do not change amino acids.

The patients harboring the mtDNA variant around position 10028 also possess a modification that eliminates the restriction site for Hae III at position 8251. These linked polymorphic sites define subjects who share a common ancestral origin and consequently those patients may share other genetic modifications that would play a part in the physiopathology of AD.

We also detected a mutation in the tRNA^S gene at position 7476 in 3 AD patients but not in the control group. Impaired mitochondrial protein synthesis resulting from a mutation in the tRNA genes could lead to a respiratory chain dysfunction as demonstrated by biochemical (complex 1 and IV deficiency) and morphological (CO deficient fibers) findings in the muscle.²⁴

Apart from these polymorphisms which are modification of a single nucleotide, we detected in one SDAT patient a deletion of about 900 bp in fragment 3. This deletion obviously impacts on an important part of the gene CO2 and could have a direct effect on its activity. In fact, this patient presented a severe reduction in CO activity and died only 3 years after the first symptoms of the illness. Obviously, it is possible that the reduction of CO activity that we observed in this patient was caused by the presence of this deletion.

Except for the modification at position 5460 which modifies the sequence of amino acids in the ND2 gene, probably none of the polymorphisms detected in this study modify amino acid identity. Therefore, it is unlikely that the observed polymorphisms can be considered as causal

factors in the reduction of CO activity in AD. However, the high frequency of certain polymorphisms is intriguing and may result from a genetic association to other mutations which influence CO activity. Many mtDNA variants are already known to be characteristic in certain human populations. The polymorphisms that we detected at a higher frequency in the AD subjects are possibly associated with a population of individuals who are more susceptible to develop AD.

Conclusion

The results reported in this paper show clearly that a reduction in CO activity has to be considered as a potentially factor acting on disease duration and the physiopathology of SDAT patients. To further elucidate this reduction of CO activity, we analyzed the three CO genes encoded by mitochondrial DNA. Interestingly, restriction polymorphisms identified were found at a higher frequency in the Alzheimer patients as compared with the control group. Two patients presented the modification already reported at position 5460 and one patient harbored a 900 bp deletion that could have a direct effect on CO activity. Two mtDNA variants were not located precisely. These could be neutral polymorphisms but alternatively, they could result in amino acid substitutions and be responsible for the reduction of CO activity. However, the other polymorphism detected in this study do not modify amino acid residues, and can not be considered as causal factor in the reduction of CO activity.

As this study covers only a small portion of the mitochondrial genome, undetected mutations in other positions could possibly have a critical role in the reduction of CO activity. Therefore, it may be necessary to sequence the mitochondrial genome to reveal other significant mutations directly involved in the reduction of CO activity, that we have observed in AD.

References

1. Shoffner JM, Brown MD, Torroni A *et al.* *Genomics* **17**, 171-184 (1993).
2. Lin F, Lin R, Wisniewski HM *et al.* *Biochem Biophys Res Commun* **182**, 238-246 (1992).
3. Hutchin T, Cortopassi G. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 6892-6895 (1995).
4. Corral-Debrinski M, Horton T, Lott MT *et al.* *Genomic* **23**, 471-476 (1994).
5. Parker WD, Parks JK. *Neurology* **45**, 482-486 (1995).
6. Parker WD, Parks J, Filley CM *et al.* *Neurology* **44**, 1090-1096 (1994).
7. Kish SJ, Bergeron C, Rajput A *et al.* *J Neurochem* **59**, 776-779 (1992).
8. Meccocci P, MacGarvey U, Beal F. *Ann Neurol* **36**, 747-751 (1994).
9. Kösel S, Egensperger R, Mehraein P *et al.* *Biochem Biophys Res Commun* **203**(2), 745 (1994).
10. Petruzzella V, Chen X, Schon EA. *Biochem Biophys Res Commun* **186**(1), 491-497 (1992).
11. Chagnon P, Bétard C, Robitaille Y *et al.* *NeuroReport* **6**, 711-715 (1995).
12. McKhann G, Drachman D, Folstein M *et al.* *Neurology* **34**, 939-944 (1984).

13. Tiberghien D *et al.* In: *Alzheimer's Disease: Advances in Clinical and Basic Research*. J Wiley & Sons Ltd, 1993: 121-127.
14. Olivero O, Kassim A. *Qiagen News* **3**, 12-13 (1994).
15. Anderson S, Bankier AT, Barrel BG *et al.* *Nature* **290**, 457-465 (1981).
17. Bétard C, Robitaille Y, Gee M *et al.* *NeuroReport* **5**, 1893-1896 (1994).
18. Wenham RW, Price WH, Blundell G. *Lancet* **337**, 1158-59 (1991).
19. Wallace DC, Lott MT, Brown MD *et al.* In Cuticchia AJ (ed) *Human gene mapping : a compendium*. Johns Hopkins University Press, Baltimore, 1995: 910-954.
20. Cann RL, Brown WM, Wilson AC. *Genetics* **106**, 479-99 (1984).
21. Houshmand M, Larsson NG, Holme E *et al.* *Bioch Biophys Acta* **1226**, 49-55 (1994).
22. Wallace DC. *J Bioenerg Biomembr* **26**(3), 241-250 (1994).
23. Lertrit P, Kapsa RM, Jean-Francois MJ *et al.* *Hum Mol Genet* **3**(11), 1973-1981 (1994).
24. Shoffner JM, Wallace DC. *Adv Hum Genet* **19**, 267-330 (1990).

Acknowledgments

We are especially grateful to the patients and the families who participated in this study. This research was supported by Algène Biotechnologies Corporation within the confines of the Centre Hospitalier Côte-des-Neiges. We are grateful to Ms Carole Brabant and Mr Jean-Pierre Le Cruguel for biostatistical analyses and Dr T. Leung from Institut de cardiologie de Montréal for contributing control brains.

Table 1. Location and nature of mtDNA variants in SDAT, PDAT and control groups

PCR Fragment	Restriction enzyme	Site gain (+) or loss (-)	Gene	Position	SDAT n = 31	PDAT n = 16	Controls n = 18
1	Nla IV	+	ND1	-	6	2	1
1	Ava II	+	tRNA ^Q	4336	0	0	0
1	Nla III	-	ND2	4578	3	0	0
2	Hph I	+	ND2	5460	2	0	0
2	Hae III	-	CO1	6260	2	1	0
2	Alu I	-	tRNA ^S	7476	2	1	0
3	Rsa I	-	CO2	8012	1	0	1
3	Hae III	-	CO2	8251	4	3	0
3	Mbo I	-	ATPase	8616	2	0	0
4	Alu I	+	-	-	4	3	0
4	Rsa I	+	CO3	-	1	0	0
4	Hae III	+	CO3	-	1	1	0

Figure 1. Cytochrome oxidase (CO) activity in 31 patients with senile dementia of the Alzheimer type (SDAT) in frontal cortex (FC) and in parietal cortex (PC) in relation with disease duration. CO activity of the control group is also represented.

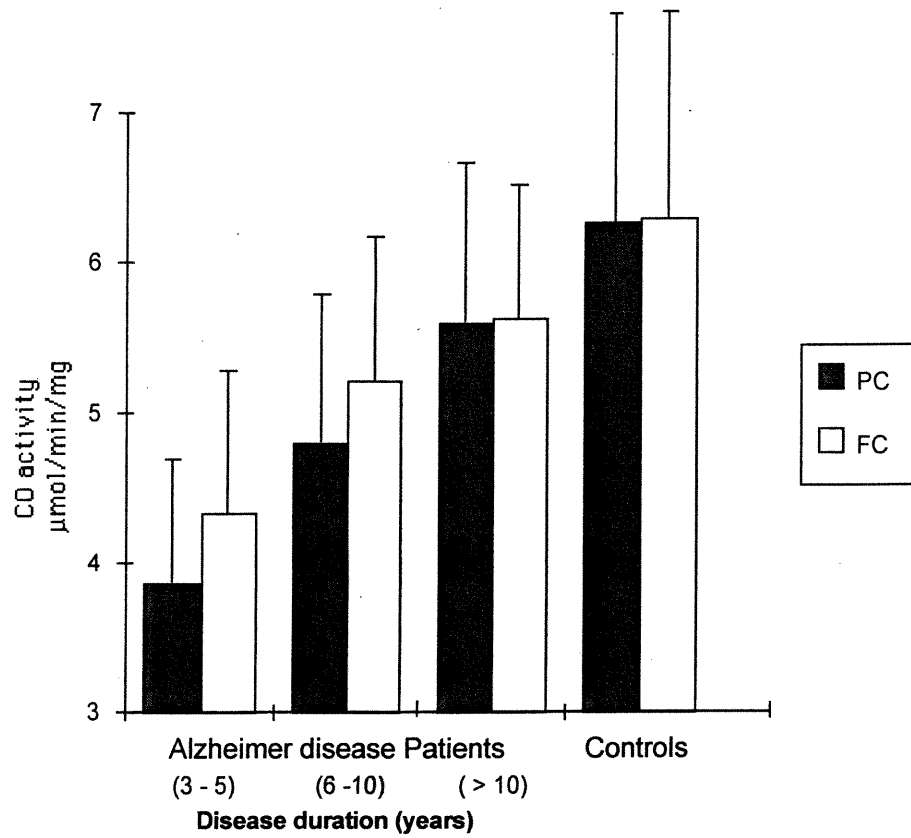


Figure 2. Restriction cleavage patterns of the fragment 3 by the enzyme Hae III for 6 AD patients and 6 controls. The creation of the 505 bp fragment represents the loss of a restriction site at the position 8251.

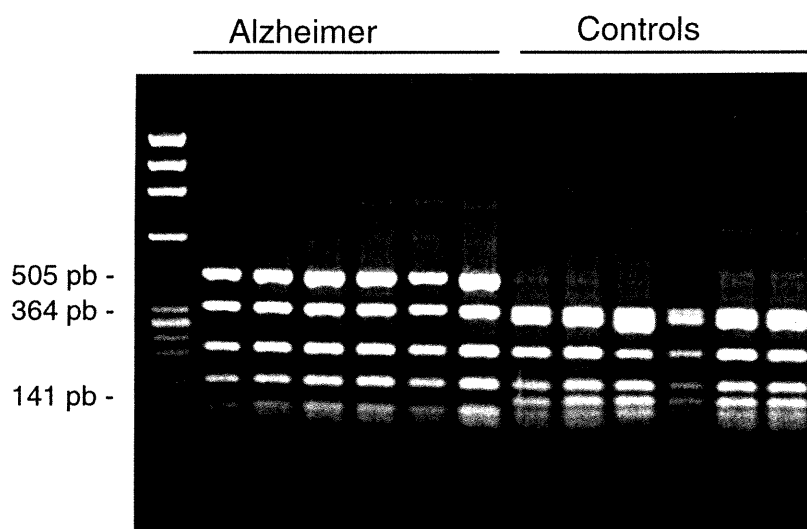
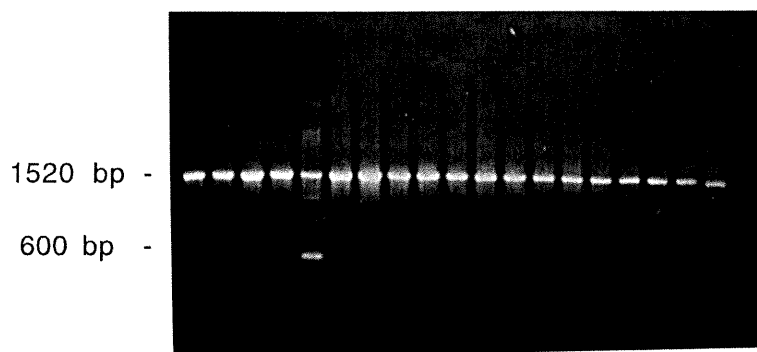


Figure 3. PCR amplification of fragment 3 and observation of 1 patient who present a second fragment which is an approximate 900 bp deletion.



2.3 Article publié dans la revue American Journal of Medical Genetics 85 : 20-30 (1999)

Phylogenetic analysis of the mitochondrial genome indicates some significant differences between patients with Alzheimer disease and controls in a French-Canadian founder population

Pierre Chagnon, Mark Gee, Mario Filion, Yves Robitaille,
Majid Belouchi et Denis Gauvreau

ABSTRACT

The activity of cytochrome oxidase (CO), the terminal enzyme of the mitochondrial electron transport chain, has been reported to be lower in the brains of Alzheimer disease (AD) patients. This suggests that a modification of mitochondrial DNA (mtDNA) may be responsible for this decrease of CO activity. Many mtDNA variants were found by different studies at a higher frequency in AD patients, suggesting that mtDNA variants could confer a genetic susceptibility to AD. In this study, we sequenced the entire mitochondrial genome region which encompasses the three CO genes and the 22 mitochondrial tRNA in 69 AD patients and 83 age-matched controls. We detected a total of 95 mtDNA variants. The allele frequencies of the majority of these variants were similar in patients and controls. However, a haplotype composed of 3 different modifications (positions: 5633, 7476 and 15812) was present in 3 of the 69 late-onset AD patients (4.3%) and also in 1 of 16 early-onset AD patients (6.2%) but not in control individuals. Given that one of these variants (15812) has already been shown to be associated with another neurodegenerative disease and that all 3 modifications are relatively conserved and their frequencies in the general population is only 0.1%, our data suggest that the presence of this haplotype may represent a risk factor for AD. We have also found a significant association ($p < 0.05$) of 2 other variants at positions 709 (rRNA 12S) and 15928 (tRNA^{Thr}). These 2 mtDNA variants are 3 times more frequent in control individuals compared to AD patients, suggesting that they may be protective against AD.

KEY WORDS : mitochondrial DNA sequence, Alzheimer disease, founder population, phylogenetic analysis

INTRODUCTION

Alzheimer disease (AD) is a neurodegenerative disorder characterized by a progressive loss of memory and cognitive functions, and it is the most common cause of dementia in people over the age of 60. Some rare forms of AD have been linked to genetic mutations in genes localized on chromosomes 1 (PS-2), 14 (PS-1) and 21 (APP) [Goate *et al.*, 1991, Levy-Lahad *et al.*, 1995; Sherrington *et al.*, 1995]. A significant association has also been observed between the apolipoprotein E allele e4 (on chromosome 19) and the risk for late-onset AD [Saunders *et al.*, 1993; Strittmatter *et al.*, 1993]. However, sporadic and familial AD cases are not explained only by these genetic factors, suggesting that other factors, genetic or environmental, are probably involved in the pathogenesis of the disorder. One of these factors may be a reduction in mitochondrial energy metabolism. According to the bioenergetic hypothesis for degenerative diseases and aging [Wallace *et al.*, 1995], individuals who inherit robust mitochondrial genotypes maintain adequate energetic capabilities until late in life and are protected against diseases. However, individuals who inherit mildly deleterious mutations have lowered energetic capabilities, and are more prone to develop late-onset diseases such as AD and Parkinson disease [Wallace, 1994].

In fact, various sources of biochemical and genetic data have suggested that a defect in mitochondrial functions might play a key role in the neuronal degeneration that occurs in AD. **First**, a reduction in glucose metabolism has been reported to precede onset of the first symptoms in AD [Horwitz *et al.*, 1987; Hoyer *et al.*, 1988; Hoyer, 1991; Rapoport *et al.*, 1991]. **Second**, an increase in the maternal transmission of AD has been observed suggesting that the mitochondrial genome, which is exclusively transmitted by the mother, is responsible for this pattern of inheritance [Edland *et al.*, 1996]. **Third**, the level of oxidative damage caused by the presence of free radicals is significantly increased in mitochondrial DNA (mtDNA) from AD patients compared to control individuals [Mecocci *et al.*, 1994]. **Fourth**, cytochrome oxidase (CO) activity, the terminal step in the mitochondrial respiratory chain, has been shown to be reduced in blood platelets [Parker *et al.*, 1990], cultured skin fibroblasts [Peterson and Goldman, 1995] and brains of AD patients [Kish *et al.*,

1992; Parker *et al.*, 1994; Chagnon *et al.*, 1995; Parker and Parks, 1995]. Recently, we reported a correlation between disease duration and CO activity in senile dementia of Alzheimer type patients [Chagnon *et al.*, 1996]. The CO enzymatic complex is composed of 13 subunits encoded by nuclear and mitochondrial genomes. Subunits I, II and III are encoded by mtDNA and they represent the catalytic core of the complex CO [Capaldi, 1990]. Thus, variation of the mtDNA may be key factors in the reduction of CO activity in SDAT patients. **Fifth**, several mtDNA variants have been observed in AD patients. Shoffner *et al.* [1993] have reported that an A-to-G variant of the mitochondrial tRNA^{Gln} gene at position 4336 occurs at an increased frequency (5.2%) in Caucasians who have died of AD and/or Parkinson disease as compared with controls (0.7%). Hutchin and Cortopassi [1995] have corroborated this result and reported that this variant was present in 8.3% of 72 AD patients but in only 0.34% of 296 age-matched controls. However, Wragg *et al.* [1995] found no association between this mitochondrial tRNA glutamine gene variant and Alzheimer patients. Another variant was also detected at position 5460 of the ND2 gene in 10 out of 19 AD patients but not in 11 normal brains [Lin *et al.*, 1992]. This observation was not corroborated by other groups [Petruzzella *et al.*, 1992; Kösel *et al.*, 1994]. Collectively, these results are contradictory. Each genetic association found between mtDNA variants and AD patients was not confirmed by other groups. Thus, the involvement of the mitochondrial genome in AD is as yet unclear. Recently, Brown *et al.*, [1996] have sequenced the entire mtDNA sequence of four Alzheimer's and Parkinson's disease patients and found several nucleotide substitutions. However, since they tested a small number of patients and no controls, they could not conclude that a particular mtDNA variant played a causal role in either neurodegenerative disease.

In this study, we have analyzed the sequence information in the mitochondrial genome of a large number of AD patients (n=69) and controls (n=83) in an attempt to clarify the role of the mtDNA in the development of AD. Our objective was to detect all variants present within the 3 genes encoding the CO complex as well as within the 22 tRNA of the mtDNA. Allele frequency of each variant was compared between cases and controls using the Fisher Exact Test. A phylogenetic analysis was also effected using mtDNA sequences from all study individuals.

MATERIALS AND METHODS

Subjects. Three independent populations were investigated in this study. The first study population consisted of a group of 69 autopsied cases with senile dementia of Alzheimer type (SDAT, 45 women and 24 men, 79.9 ± 4.9 years). The second study population included 18 autopsied control brains (9 women and 9 men, 68.3 ± 9.9 years) and the third study sample was the control population which consisted of 65 blood samples from 42 women and 23 men (85.5 ± 5.0). All SDAT patients and the control population were recruited from the same geographic area, namely the Saguenay-Lac Saint-Jean (SLSJ) region of the province of Quebec (Canada). The 18 control brains were recruited from the Montreal region (Quebec, Canada). The SDAT patients included in this study had severely impaired cognitive functions at the time of their death. Definite diagnosis of AD was based on the following criteria: fulfillment of the NINCDS-ADRDA criteria for probable or possible AD [McKhann *et al.*, 1994], exclusion of other dementing disorders, as well as histopathological confirmation of AD. The neuropathological protocol was based on a modified Khachaturian scale [Khachaturian, 1985] which requires the presence of at least 20 neurofibrillary tangles/mm³ and 10 senile plaques/mm², irrespective of age, in at least two sections of limbic lobe and associative neocortex, after screening for areas richest in degenerative changes on modified Bielschowsky stains [Tiberghien *et al.*, 1993]. The 18 control brains cohort was validated by chart and autopsy protocol reviews to screen for cognitive defects and/or neuropsychiatric disorders. The cohort comprising 65 control individuals was selected on the basis of normal cognitive function as assessed by the 3MS (Modified Mini-Mental State) test.

DNA isolation. High molecular weight DNA was extracted from isolated lymphocytes of the control population by automated DNA extraction (NA-1000, AutoGen). Genomic DNA was extracted from brain tissue (frontal cortex) from all SDAT patients and the 18 controls following standard protocols. Briefly, tissue was homogenized in the presence of lysis buffer (0.5% SDS), digested with proteinase K at 55°C overnight and DNA isolated from other matter using phenol/chloroform and chloroform/isoamyl alcohol separation.

Oligonucleotide primers. The oligonucleotide primers used for PCR and sequencing are presented in **Table I**. They were designed with the program OLIGO 4.0 for Macintosh. The strategy used for sequencing the three CO genes is presented in **Figure 1**. Each forward primer possessed the M13mp18 universal sequence of 18 nucleotides (5'-TGTAACGACGGCCAGT-3') on the 5' side and a sequence of 20 nucleotides specific for the L strand of mtDNA.

PCR reaction. The mtDNA was amplified from 100 ng of genomic DNA in 50 μ l of reaction mixture containing 200 μ M of each dNTP, 50 ng of each primer, 1.25 units of Taq DNA polymerase, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3) and 1.5 mM MgCl₂. The reactions were carried out for a total of 35 cycles. The cycle times were as follows : 94°C for 45 sec, 53-57°C for 45 sec and 72°C for 1 min.

Purification of PCR reactions. The PCR products were gel-purified from 1% agarose gel using a QIAEX II gel extraction kit (Qiagen, Chatsworth, CA).

Fluorescence-based direct sequencing. The sequences of mtDNA were determined by a fluorescence-based automated direct sequencing technique using a model 377 DNA sequencer (Perkin-Elmer). The dye primer cycle sequencing ready reaction-21M13 kit using amplitaq DNA polymerase FS was obtained from Perkin-Elmer. Amplifications were performed in a geneAmp PCR System 9700 (Perkin-Elmer).

Statistical analysis. Allele frequencies of mtDNA variants were statistically compared among controls and AD patients by using the Fisher's Exact Test (two-tailed).

Phylogenetic analysis. The evolutionary relationship among 69 Alzheimer patients and 83 controls was inferred using UPGMA analysis with the computer program MEGA [Kumar, Tamura and Nei, 1993].

RESULTS

The first step of our study was to detect the largest possible number of potentially pathogenic variants in the mitochondrial genome of 50 AD patients and 18 control individuals. We entirely sequenced the 3 CO genes and the regions encoding the 22 tRNA using 17 different sequencing reactions (Fig. 1). Subsequently, all variants harboring an amino acid change in mitochondrial proteins or nucleotide changes in the coding region of tRNAs and rRNAs were further analyzed in 19 additional AD patients and 65 other control individuals. Certain silent variants were also analyzed.

In order to determine the limits of detection for heteroplasmy using our assay system, we combined DNA from 2 individuals, one of whom was a carrier of a known mtDNA variant. Different concentrations of the heteroplasmic variants were prepared in which the frequency varied from 0 to 100% (e.g. 10, 20, 30, 40...100%). This experiment was repeated several times using different variants and shows that we could unambiguously detect the presence of a heteroplasmic variant at a threshold greater than 40-50%.

Sequence comparison of the 50 SDAT patients and the 18 controls with previously-published mitochondrial genomic sequence [Anderson *et al.*, 1981], shows a total of 95 different mtDNA variants (positions: 456, 462, 477, 482, 489, 497, 498, 499, 508, 514, 573, 593, 678, 709, 750, 801, 1536, 1646, 1719, 1809, 1811, 1888, 3480, 4216, 4336, 4529, 4561, 4580, 4596, 4646, 5390, 5426, 5442, 5460, 5471, 5633, 5911, 5913, 5999, 6045, 6047, 6152, 6221, 6260, 6296, 6518, 6644, 6734, 6776, 7028, 7476, 7705, 8251, 9115, 9123, 9254, 9266, 9293, 9300, 9389, 9477, 9615, 10034, 10398, 10463, 10506, 10550, 10619, 12308, 12310, 12372, 12406, 12414, 12501, 14470, 14569, 14587, 14620, 14766, 14793, 14798, 14870, 15812, 15833, 15884, 15904, 15907, 15924, 15928, 15940, 15946, 16069, 16093, 16126, 16129). Of these variants, 52 were silent mutation (did not provoke an amino acid change), 19 results in an amino acid sequence change in mitochondrial proteins, 15 were located within a tRNA sequence and 9 within rRNA 12S

and 16S. All variants were homoplasmic, except those at positions 9300, 12372, 12501, 16093 and 16129, which were heteroplasmic.

Of the 95 detected variants, most (90.5%) were transitions (G-A or C-T) while the remaining were transversions located at positions 593, 4529, 9293, 14470. At one site (position 16129), both types of variation were observed: a G-A transition in 7 AD patients and a G-C transversion in a single control individual. A one-nucleotide deletion was found at position 498 and 2 insertions of one or more nucleotides were detected at positions 573 and 12310. A CA-repeat sequence was found (positions 514-523) numbering 4, 5, 6 and 7 tandem repeats. The most frequent repeat allele was the 5 CA-repeats (77% in Alzheimer patients and 78% in controls).

Comparison of our variants collection using the MITOMAP database (<http://www.gen.emory.edu/mitomap.html>) showed that 34 of our mtDNA modifications were novel in that they had not previously been identified (positions : 482, 498, 573, 593, 678, 801, 1646, 1809, 4561, 5390, 5426, 5911, 5913, 5999, 6045, 6047, 6152, 6518, 6734, 7705, 9115, 9254, 9293, 9300, 9389, 9615, 10619, 12310, 12414, 14470, 14587, 14793, 14870, 15940). Moreover, 6 of our variants had been previously associated with other pathologies, including Leber hereditary optic neuropathy (LHON) at positions 4216 and 15812, AD at positions 4336 and 5460, progressive external ophthalmoplegia (CPEO) at position 12308, and lethal infantile mitochondrial myopathy (LIMM) at position 15924. However, it is noteworthy mentioning that these associations are tenuous since some studies have failed to detect them, thus not corroborating the pathological role of these base substitutions.

All non-silent, and a portion of silent, coding region variants are presented in Table II for the 69 AD patients and in Table III for the 83 control individuals. Comparison of allele frequencies between individual mtDNA variants in AD cases and control individuals using the Fisher test demonstrated that only 2 variants showed a significant difference (Table IV). These two G to A variant at positions 709 (rRNA 12S) and 15928 (tRNA^{Thr}) were 3 times over-represented in controls

compared to cases ($p < 0.05$). No mtDNA variants were found to be significantly increased in cases compared to controls. However, an haplotype formed by variants located at positions 5633 (tRNA^{Ala}), 7476 (tRNA^{Ser}) and 15812 (Cyt. B) were detected in three AD cases (4.3%) but not in controls (0%) ($p = 0.09$). Another mtDNA variant, at position 10506 (ND4, complex I), was detected in two AD cases but not in controls. Finally three variants, at positions 593 (tRNA^{Phe}), 4596 (ND2) and 12310 (tRNA^{Leu}) were present in one AD case (1.5%) but not in controls (0%).

The mtDNA variants collection was used to deduce a phylogenetic tree (Fig. 2) for all 69 AD cases and 83 controls [software MEGA; Kumar, Tamura et Nei, 1993]. Our results show that most individuals can be divided into 4 major groups with respect to being carriers of different variants (group A, B, C and D). From those 4 groups only the group B differs between cases and controls. In this group, an haplotype including variants at positions 5633, 7476 and 15812 was found exclusively in 3 AD cases while the rest of the lineage is largely dominated by the presence of controls (16 controls vs. 4 cases). This difference is attributable to the 15928 and 709 variants which are 3 times more frequent in control compared to AD patients ($p < 0.05$).

The group A and C do not display significant differences between AD cases and controls. However, the group C contains a lineage, whose base is the 709 variant, which is significantly more frequent in controls ($n=6$) compared to AD cases ($n=0$) ($p < 0.05$). Finally, in the group D there are 3 subjects for which no base substitutions were detected and sequences were identical to the known sequence (Anderson *et al.*, 1981).

DISCUSSION

We showed previously that CO activity is significantly reduced in the frontal and parietal associative cortex of SDAT patients as compared with controls and cases of other neurodegenerative diseases [Chagnon *et al.*, 1995; Chagnon *et al.*, 1996]. Other studies have also measured a significant difference of CO activity in AD patients as compared with controls [Kish *et al.*, 1992; Parker *et al.*, 1994; Parker and Parks, 1995]. Even if this observation of an enzymatic deficit in the brains of AD patients appears consistent across different studies, it has not been firmly established whether this deficit is actively involved in the development of the disease or is an adaptation response to neurodegeneration. Given that the level of CO activity is in a way a reflection of cellular activity [Wong-Riley, 1989], one may argue that the decrease in activity of this enzyme is simply a consequence of a significant decrease in neuronal activity. On the other hand, it is also possible that this decrease in activity is caused by a pathological modification of the respiratory chain and that the latter induces a greater susceptibility in individuals to develop AD. The discovery of a mtDNA variant strongly associated with the disease indicates that the decrease in CO activity plays a role in the pathogenesis of AD. In order to investigate this possibility in further detail, we analysed the 3 mtDNA genes that contribute to the formation of this complex and the 22 mitochondrial tRNA in 69 SDAT patients and 83 controls. A significant advantage of the present study is in the use of Alzheimer patients and controls derived from a SLSJ founder population (Québec, Canada). All these study individuals are related back 8-10 generations. Consequently, this increases the likelihood that significant variant allele differences existing between cases and controls are attributable to the disease as opposed to ethnic variations.

Comparison between cases and controls using the Fisher Test (Table IV) indicates in general no difference in allele frequencies. However, two mtDNA variants were 3 times over-represented in controls compared to patients. The first of these modifications is situated at position 709 and is part of the 12S subunit of the mitochondrial ribosomal RNA (22.3% Vs. 7.2%, $p = 0.01$). The second variant is situated at position 15928 within tRNA^{Thr} (16.9% Vs. 5.8%, $p = 0.04$).

Additionally, another modification at position 15884 (Cyt. B) was found exclusively in 5 controls but not in patients ($p = 0.06$). One possible explanation of the elevated frequencies for these mtDNA variants in controls is that they may have a protective effect against AD since they have segregated within individuals from the SLSJ founder population which do not develop the disease. However, further genotyping in other founder populations will be required to clarify this hypothesis.

The variant located at position 4336 (tRNA^{Gln}) had previously been associated with AD [Shoffner *et al.*, 1993; Hutchin and Cortopassi, 1995]. We detected this variant in 2 AD cases (2.9%) but also in 2 control individuals (2.4%). Our data suggest that this variant does not increase the risk of developing AD, at least not in this specific study population. An other variant reported by an another group to be associated with AD [position 5460, gene ND2; Lin *et al.*, 1992] was more frequent in our controls ($8/83 = 9.6\%$) than in our cases ($3/69 = 4.3\%$). Again according to our results this variant is not associated with AD in our population.

None of the variants were found to be significantly increased in patients compared to controls. To a certain extent, this is to be expected, given the multifactorial nature of AD. Our goal was to detect modifications which were present in cases but not in controls. We detected an haplotype formed by variants situated at positions 5633 (tRNA^{Ala}), 7476 (tRNA^{Ser}) and 15812 (Cyt. b), in 3 AD cases (4.3%), but in none of the 83 control individuals ($p = 0.09$). This haplotype was also found in one early-onset AD patient (out of 16 cases, or 6.25%) from another study [Chagnon *et al.*, 1996]. The presence of this mitochondrial modification is therefore relatively frequent in AD cases and absent in the control group. Moreover, our phylogenetic analysis (Figure 2) indicates that this haplotype is situated within a branching that largely comprises control individuals (16/20). The presence of this haplotype has changed the tendency of this lineage since all the carriers of this haplotype developed AD. The remainder of this branching which can be traced back to polymorphism 15928 was particularly represented by control individuals. For many reasons, it is possible that the combined effect of these 3 variants (5633, 7476 and 15812) was sufficient to

change the tendency of this lineage and provoke the development of the disease in these 4 AD cases.

First, variants 5633 and 7476 are situated within transfer RNAs alanine and serine in moderately conserved regions. Analysis of their secondary structures indicates that these two base substitutions are found in the anti-codon loop (Figure 3). It is possible that a modification at these positions induces a change in the three-dimensional tRNA structure and thereby provokes a functional change. Interestingly, it has been shown that another mutation situated at exactly the same position as 5633 but in the secondary structure of tRNA^{Asn} causes progressive external ophthalmoplegia (position 5703) [Moraes *et al.*, 1993]. Moreover, the mitochondrial tRNA gene mutations cause various other encephalopathy phenotypes including MELAS (myopathy with encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes) and MERRF (myoclonic epilepsy with ragged-red fibers). Numerous other familial or sporadic pathological conditions have also been described in association with more than 30 different point mutations in mitochondrial tRNA genes [Suomalainen, 1997]. **Secondly**, the 2 variants at 5633 and 7476 were recently detected in a patient with mitochondrial encephalopathy and the modifications appear to be causally-related to the disease [Sternberg *et al.*, 1998]. **Thirdly**, the frequency of variant 15812 is only 0.1% in the general population. In effect, Brown *et al.* [1992] have observed this base substitution only once within a group of 759 normal control individuals. However, a recent study has indicated that this variant was present in 4 of 99 Italian controls [Torrioni *et al.*, 1997]. The 7476 tRNA variant was previously detected in only one of 113 subjects representing four broad geographic categories [Cann *et al.*, 1984], as well as in only 1 of 100 controls in a different study [Houshmand *et al.*, 1994]. There is therefore a difference in what we observe in our senile and presenile AD cases (4.7%). **Fourthly**, the 15812 transition converts the moderately conserved aliphatic amino acid valine to a methionine in the protein cytochrome b. Since all vertebrates have either a valine, leucine or isoleucine in this position, this substitution may be functionally significant. **Finally**, this same variant has been associated previously with another mitochondrial disease, Leber hereditary optic neuropathy (LHON) [Brown *et al.*, 1995]. While this variant does not cause LHON, it may increase

the probability of phenotypic expression [Johns and Neufeld, 1991; Brown *et al.*, 1992]. It is possible that in the case of AD, this variant plays the same role as in LHON but in combination with variants 5633 and 7476. Given these different observations the presence of the haplotype formed by variants 5633, 7476, 15812 may have pathological consequences, and may be a risk factor for AD. However, since we have sequence roughly 50% of the mitochondrial genome, it is possible that there is another mutation linked to this haplotype that may contribute to the disease.

There are also other variants which were found exclusively in AD cases (positions: 593, 4596, 10506, 12310). However, these modifications are rare, appearing in only a very limited number of individuals. Further studies will be required to demonstrate a causal role for these base substitutions in AD.

In conclusion, we have observed contradictory results with respect to the role of the mitochondrial genome in AD. Firstly, the presence of an haplotype formed by variants 5633, 7476 and 15812 was found in 3 late-onset AD cases (4.3%) and one early-onset AD case (6.25%). This mitochondrial modification which was not found in any of our control individuals may therefore be a risk factor for AD. On the other hand, we have also found that variants 709 and 15928 were significantly increased in the control group as compared with AD cases, suggesting that these base substitutions may have a protective effect against AD. It is possible that these 2 variants confer a selective advantage by increasing the efficiency of the mitochondrial respiratory chain. Therefore, carriers of these variants may form fewer free radicals as a result of greater oxidoreduction capacity and consequently are less susceptible to the development of AD. Based on the mitochondrial theory of aging, we propose the following hypothesis: the oxidoreduction capacity may vary greatly amongst individuals depending on the presence of certain mtDNA variants. Given that the level of oxidative stress plays an important role in the physiopathology of AD, individuals possessing variant combinations that are protective (for example 709 and 15928) will also possess greater oxidative capacity and will be less susceptible to develop AD. In contrast, individuals possessing combinations that are harmful (5633, 7476, 15812) will display a reduced efficiency of the

respiratory chain which, over the course of their lives, will expose them to higher levels of oxidative stress, ultimately rendering them more susceptible to develop AD.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are most grateful to the patients and the families who participated in this study. This research was supported by Algène Biotechnologies Corporation.

REFERENCES

Anderson S, Bankier AT, Barrel BG, de Bruijn MHL, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJH, Staden R, Young IG (1981) : Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290: 457-465.

Brown MD, Shoffner JM, Kim YL, Jun AS, Graham BH, Cabell MF, Gurley DS, Wallace DC (1996) : Mitochondrial DNA sequence analysis of four Alzheimer's and Parkinson's disease patients. *Am J Med Genet* 61: 283-289.

Brown MD, Torroni A, Reckord CL, Wallace DC (1995) : Phylogenetic analysis of Leber's hereditary optic neuropathy mitochondrial DNA's indicates multiples independent occurrences of the common mutations. *Human Mutation* 6: 311-325.

Brown MD, Voljavec AS, Lott MT, Torroni A, Yang CC, Wallace DC (1992) : Mitochondrial DNA complex I and III mutations associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Genetics* 130: 163-173.

Cann RL, Brown WM, Wilson AC (1984) : Polymorphic sites and the mechanism of evolution in human mitochondrial DNA. *Genetics* 1106: 479-499.

Capaldi RA (1990) : Structure and function of cytochrome c oxidase. *Annu Rev Biochem* 59: 569-596.

Chagnon P, Robitaille Y, Gauvreau D (1996) : Brain mitochondrial DNA polymorphism and cytochrome oxidase activity in Alzheimer disease. *Alzh Res* 2: 237-242.

Chagnon P, Bétard C, Robitaille Y, Cholette A, Gauvreau D (1995) : Distribution of brain cytochrome oxidase activity in various neurodegenerative diseases. *NeuroReport* 6: 711-715.

Edland SD, Silvermann JM, Peskind ER, Tsuang D, Wijsman E, Morris JC (1996) : Increased risk of dementia in mothers of Alzheimer's disease cases: evidence for maternal inheritance. *Neurology* 47: 254-256.

Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra L, Haynes A, Irving N, James L, Mant R, Newton P, Rooke K, Roques P, Talbot C, Pericak-Vance M, Roses A, Williamson R, Rossor M, Owen M, Hardy J (1991) : Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 349: 704-706.

Horwitz B, Grady CL, Schlageter NL, Duara R, Rapoport SI (1987) : Intercorrelations of regional cerebral glucose metabolic rates in Alzheimer's disease. *Brain Res* 407: 294-306.

Houshmand M, Larsson NG, Holme E, Oldfors A, Tulinius MH, Andersen O (1994) : Automatic sequencing of mitochondrial tRNA genes in patients with mitochondrial encephalomyopathy. *Bioch Biophys Acta* 1226: 49-55.

Hoyer S (1991) : Abnormalities of glucose metabolism in Alzheimer's disease. *Ann New York acad Sci* 640: 53-58.

Hoyer S, Oesterreich K, Wagner O (1988) : Glucose metabolism as the site of the primary abnormality in early-onset dementia of Alzheimer type. *J Neurol* 235: 143-148.

Hutchin T, Cortopassi G (1995) : A mitochondrial DNA clone is associated with increased risk for Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 6892-6895.

Johns DR, Neufeld MJ (1991) : Cytochrome b mutations in Leber hereditary optic neuropathy. *Biochem Biophys Res Commu* 181: 1358-1364.

Khachaturian ZS (1985) : Diagnosis of Alzheimer's disease. *Arch Neurol* 59: 1097-1105.

Kish SJ, Bergeron C, Rajput A, Dozic S, Mastrogiacomo F, Chang LJ, Wilson JM, Distefano LM, Nobrega JN (1992) : Brain cytochrome oxidase in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 59: 776-779.

Kösel S, Egensperger R, Mehraein P, Graeber MB (1994) : No association of mutations at nucleotide 5460 of mitochondrial NADH dehydrogenase with Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 203: 745-749.

Kumar S, Tamura K, Nei M (1993) : MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis, version 1.0. The Pennsylvania State University, University Park, PA 16802.

Levy-Lahad E, Wijsman EM, Nemens E, Anderson L, Goddar KA, Weber JL, Bird TD, Schellenberg GD (1995) : A familial Alzheimer's disease locus on chromosome 1. *Science* 269: 970-973.

Lin F, Lin R, Wisniewski HM, Hwang TW, Grundke-Iqbal I, Haely-Louie G, Iqbal K (1992) : Detection of point mutations in codon 331 of mitochondrial NADH dehydrogenase subunit 2 in Alzheimer's brains. *Biochem Biophys Res Commun* 182: 238-246.

McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM (1994) : Clinical diagnosis of Alzheimer's disease : report of the NINCDS-ADRDA work group under the auspices of department of health and human services task force on Alzheimer's disease. *Neurology* 34: 939-944.

Mecocci P, MacGarvey U, Beal F (1994) : Oxidative damage to mitochondrial DNA is increased in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 36: 747-751.

MITOMAP: Human Mitochondrial Genome Database. Center for Molecular Medicine Emory University, Atlanta, GA, USA World Wide Web (<http://www.gen.emory.edu/mitomap.html>), 1995.

Moraes CT, Ciacci F, Bonilla E, Jansen C, Hirano M, Rao N, Lovelace LP, Schon EA, DiMauro S (1993) : Two novel pathogenic mitochondrial DNA mutation affecting organelle number and protein synthesis. is tRNA^{Leu}(UUR) gene an etiologic hot spot. *J Clin Invest* 92: 2906-2915.

Parker WD, Parks JK (1995) : Cytochrome c oxidase in Alzheimer's disease brain : Purification and characterization. *Neurology* 45: 482-486.

Parker WD, Parks J, Filley CM, Kleinschmidt-DeMasters BK (1994) : Electron transport chain defects in Alzheimer's disease brain. *Neurology* 44: 1090-1096.

Parker WD, Filley CM, Parks JK (1990) : Cytochrome oxidase deficiency in Alzheimer's disease. *Neurology* 40: 1302-1303.

Peterson C, Goldman JE (1986) : Alterations in calcium content and biochemical processes in cultured skin fibroblasts from aged and Alzheimer donors. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 2758-2762.

Petruzzella V, Chen X, Schon EA (1992) : Is a point mutation in the mitochondrial ND2 gene associated with Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Comm* 186: 491-497.

Rapoport SI, Horwitz B, Grady CL, Haxby JV, DeCarli C, Schapiro MB (1991) : Abnormal brain glucose metabolism in Alzheimer's disease as measured by position emission tomography. *Adv Exp Med Biol* 291: 231-48.

Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel W, St Georges-Hyslop P, Pericak-Vance MA, Roses AD (1993) : Association of apolipoprotein allele E4 with late-onset Alzheimer's disease. *Neurology* 43: 1467-1472.

Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Chi H, Lin C, Holman K, Tsuda T, Mar L, Foncin JF, Bruni AG, Montesi MP, Sorbi S, Rainero I, Pinessi L, Nee L, Chumakov, Pollen D, Brookes A, Sanseau P, Polinsky RJ, Wasco W, Da Silva HAR, Haines JL, Pericak-Vances MA, Tanzi RE, Roses AD, Fraser PE, Rommens JM, St George-Hyslop PH (1995) : Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 375: 754-760.

Shoffner JM, Brown MD, Torroni A, Lott MT, Cabell MF, Mirra SS, Beal F, Yang CC, Gearing M, Salvo R, Watts RL, Juncos JL, Hansen LA, Crain BJ, Fayad M, Reckord CL, Wallace DC (1993) : Mitochondrial DNA variants observed in Alzheimer disease and Parkinson disease patients. *Genomics* 17: 171-184.

Sternberg D, Danan C, Lombes A, Laforet P, Girodon E, Goossens M, Amselem S (1998) : Exhaustive scanning approach to screen all the mitochondrial tRNA genes for mutations and its

application to the investigation of 35 independent patients with mitochondrial disorders. *Hum Mol Genet* 7(1): 33-42.

Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS, Roses AD (1993) : Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 90(5): 1977-1981.

Suomalainen A (1997) : Mitochondrial DNA and disease. *Ann Med* 29: 235-246.

Tiberghien D, Robitaille Y, Laroche-Cholette A, Houde L, Grenon M, Gauvreau D (1993) : Retrospective Assessment of relative risks of coronary arteriosclerosis and myocardial infarct in autopsy confirmed dementias of the AD and non-AD types. In *Alzheimer's Disease: Advances in Clinical and Basic Research*, John Wiley & Sons Ltd, pp. 121-127.

Torroni A, Petrozzi M, D'Urbano L, Sellitto D, Zeviani M, Carrara F, Carducci C, Leuzzi V, Carelli V, Barboni P, De Negri A, Scozzari R (1997) : Haplotype and phylogenetic analyses suggest that one European-specific mtDNA background plays a role in the expression of Leber hereditary optic neuropathy by increasing the penetrance of the primary mutations 11778 and 14484. *Am J Hum Genet* 60(5): 1107-1121.

Wallace DC (1994) : Mitochondrial DNA mutations in diseases of energy metabolism. *J Bioenerg Biomembr* 26(3): 241-250.

Wallace DC, Shoffner JM, Trounce I, Brown MD, Ballinger SW, Corral-Debrinski M, Horton T, Jun AS, Lott MT (1995) : Mitochondrial DNA mutations in human degenerative disease and aging. *Biochim Biophys Acta* 1271: 141-151.

Wong-Riley MTT (1989) : Cytochrome oxidase: an endogenous metabolic marker for neuronal activity. *Trends Neurosci* 12: 94-101.

Wragg MA, Talbot CJ, Morris JC, Lendon CL, Goate AM (1995) : No association found between Alzheimer's disease and a mitochondrial tRNA glutamine gene variant. *Neurosci Lett* 201: 107-110.

Fig. 1. Strategy for sequencing CO genes and tRNA in the human mitochondrial genome.

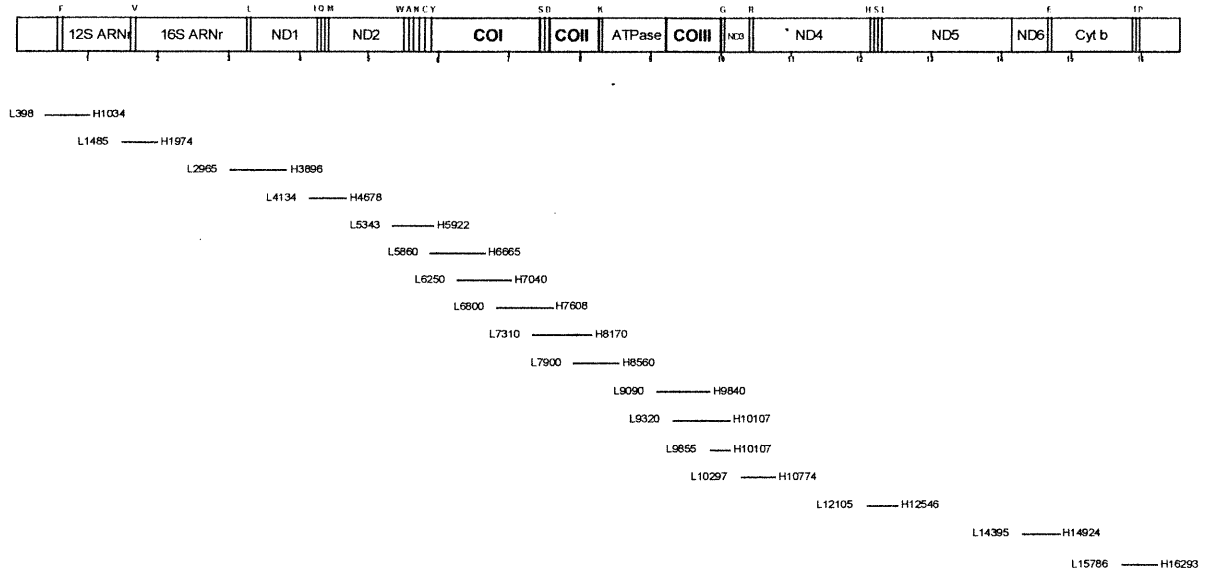
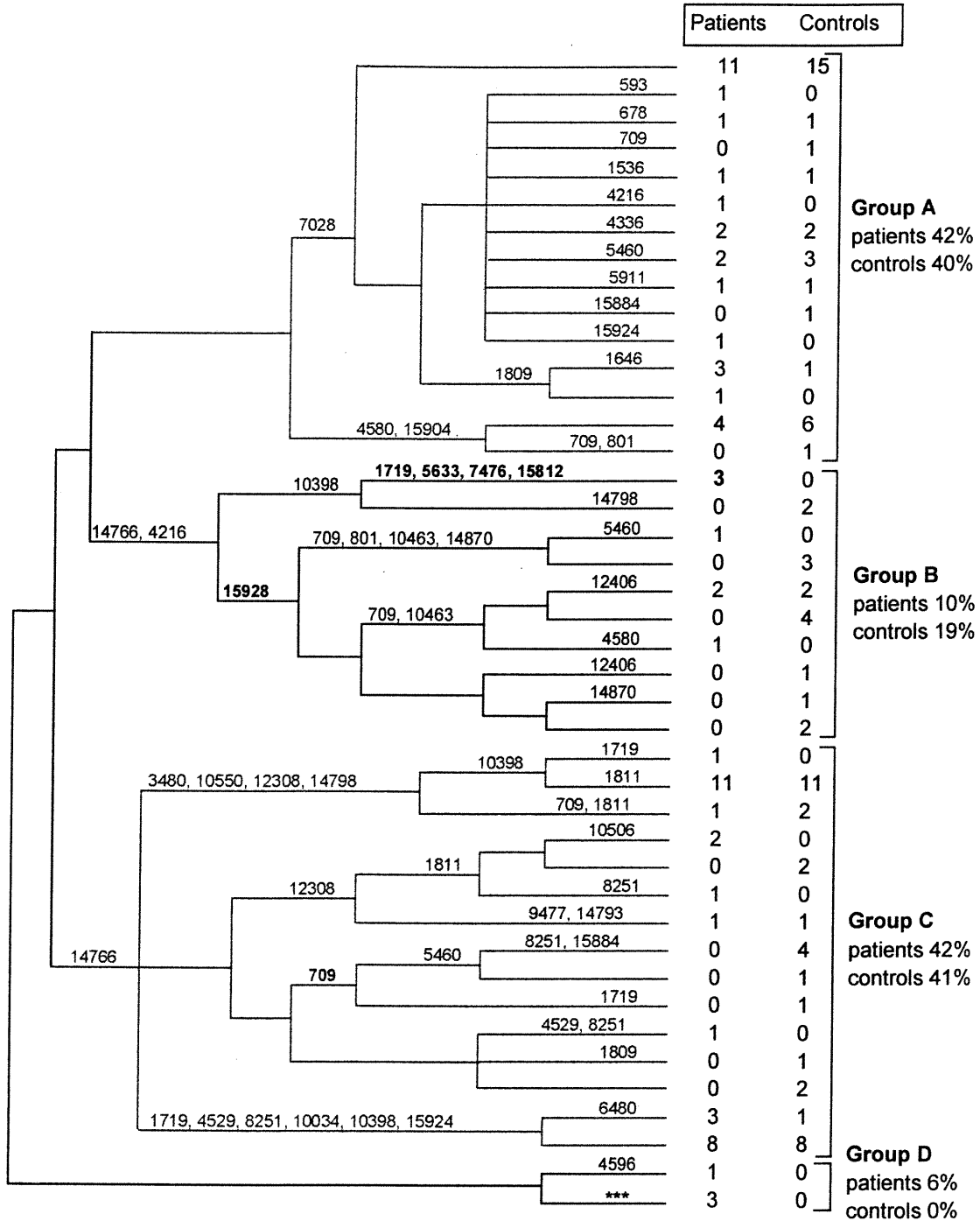


Fig. 2. Phylogenetic tree of mtDNA showing evolutionary relationships among 69 Alzheimer patients and 83 unaffected controls.



*** = published sequence (Anderson et al., 1981)

Fig. 3. Model of the secondary structure of human mitochondrial tRNA^{Ala} and tRNA^{Ser} showing the substitution caused by the 5633 and 7476 variants.

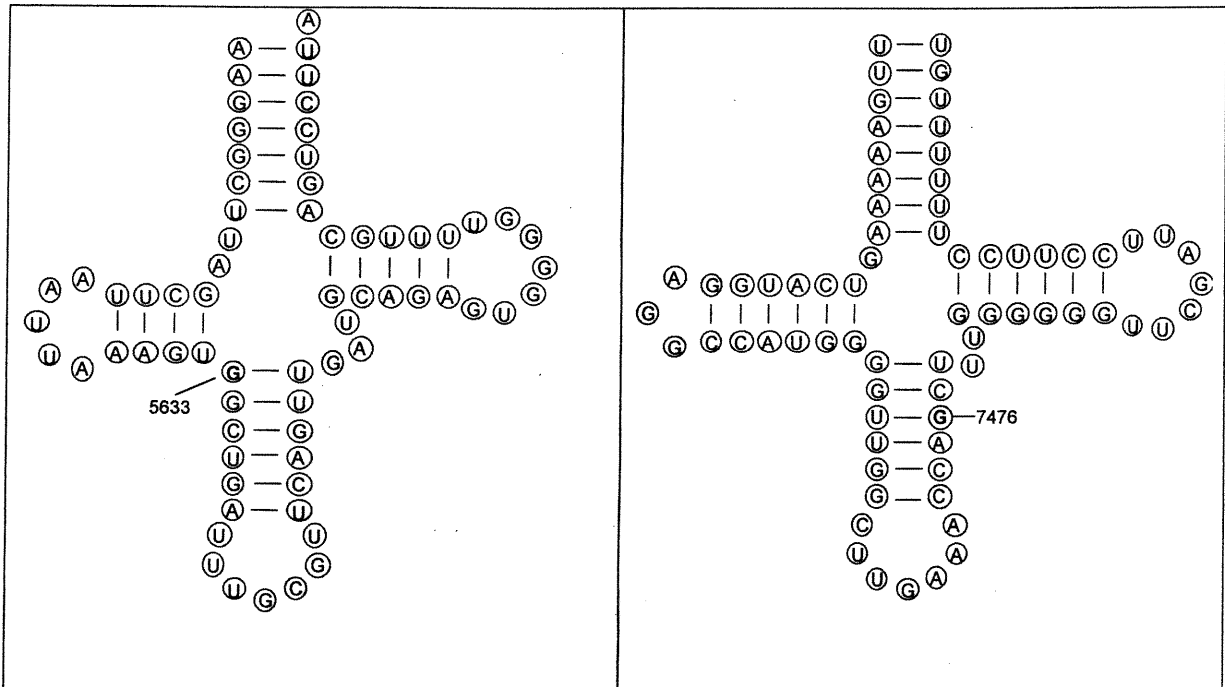


Table I. Nucleotide sequences of primers used for the PCR reaction. The primer's names represent its position inside the mitochondrial genome ("L" for the Light strand and "H" for the Heavy strand).

Primers	Nucleotide sequence
L398	M13-TTT.TAT.CTT.TTG.GCG.GTA.TG
H1034	AAG.CCA.CTT.TCG.TAG.TCT.AT
L1485	M13-GCC.CGT.CAC.CCT.CCT.CAA.GT
H1974	TCT.TCC.CAC.TAT.TTT.GCT.AC
L2965	M13-ATC.AAC.AAT.AGG.GTT.TAC.GA
H3896	GGG.TTC.GGT.TGG.TCT.CTG.CT
L4134	M13-ATA.CCC.CCG.ATT.CCG.CTA.CG
H4678	AGG.ATT.ATG.GAT.GCG.GTT.GC
L5343	M13-TTC.TAC.CTA.CGC.CTA.ATC.TA
H5922	GTC.AAC.GGT.CGG.CGA.ACA.TC
L5860	M13-TAC.AGT.CCA.ATG.CTT.CAC.TC
H6665	GAT.TAT.TCC.GAA.GCC.TGG.TA
L6250	M13-TAT.AGT.GGA.GGC.CGG.AGC.AG
H7040	ATA.GTG.GAA.GTG.GGC.TAC.AA
L6800	M13-GAC.ACA.CGA.GCA.TAT.TTC.AC
H7608	CCT.ACT.TGC.GCT.GCA.TGT.GCC
L7310	M13-TTC.ATG.ATT.TGA.GAA.GCC.TT
H8170	TTG.ACC.GTA.GTA.TAC.CCC.CG
L7900	M13-TGA.ACC.TAC.GAG.TAC.ACC.GA
H8560	GGG.CAA.TGA.ATG.AAG.CGA.AC
L9090	M13-ACA.CTT.ATC.ATC.TTC.ACA.AT
H9840	AGC.CAA.TAA.TGA.CGT.GAA.GT
L9320	M13-TCC.ATA.ACG.CTC.CTC.ATA.CT
H10107	TAG.TAA.GGC.TAG.GAG.GGT.G
L9855	M13-ATC.TGC.TTC.ATC.CGC.CAA.CT
L10297	M13-AAA.CAA.CTA.ACC.TGC.CAC.TA
H10774	GAT.TAG.TTT.TAG.CAT.TGG.AG
L12105	M13-TCA.ACC.CCG.ACA.TCA.TTA.CC
H12546	TGT.GGC.TCA.GTG.TCA.GTT.CG
L14395	M13-TAA.AAC.ACT.CAC.CAA.GAC.CT
H14924	AGG.CGT.CTG.GTG.AGT.AGT.GC
L15786	M13-TTA.CCA.TCA.TTG.GAC.AAG.TA
H16293	TGG.GTA.GGT.TTG.TTG.GTA.TC
M13	TGT.AAA.ACG.ACG.GCC.AGT

Table II. Nucleotide changes detected in mitochondrial DNA of the 69 SDAT patients. In order to render the tables more readable, only boxes that represent a polymorphic change are filled, whereas empty boxes denote no change from the nucleotide listed in the shaded area at the top of each column. We have also grouped individuals sharing the same haplotype, i.e. having the same polymorphisms at different positions.

Table III. Nucleotide changes detected in mitochondrial DNA of the 83 controls

Table IV. Comparative frequencies of different polymorphisms of the mitochondrial genome detected in 69 patients and 83 controls.

Position	Alzheimer (n=69)		Controls (n=83)		Fisher's test
	nb	%	nb	%	(p)
514-523-(4)*	3	4,3	6	7,2	0,512
514-523-(5)*	53	76,8	65	78,3	0,847
514-523-(6)*	7	10,1	7	8,4	0,783
514-523-(7)*	6	8,7	5	6,0	0,548
573	10	14,5	8	9,6	0,451
593	1	1,4	0	0	0,454
678	1	1,4	1	1,2	1,000
709	5	7,2	19	22,3	0,013
801	1	1,4	3	3,6	0,626
1536	1	1,4	1	1,2	1,000
1646	3	4,3	1	1,2	0,332
1719	15	21,7	10	12,0	0,127
1809	4	5,8	2	2,4	0,411
1811	15	21,7	15	18,1	0,683
3480	13	18,8	13	15,7	0,668
4216	8	11,6	16	19,3	0,265
4336	2	2,9	2	2,4	1,000
4529	12	17,4	9	10,8	0,345
4580	5	7,2	7	8,4	1,000
4596	1	1,4	0	0	0,454
5460	3	4,3	8	9,6	0,346
5633	3	4,3	0	0	0,091
5911	1	1,4	1	1,2	1,000
6480	3	4,3	1	1,2	0,330
7028	25	36,2	26	31,3	0,605
7476	3	4,3	0	0	0,091
8251	13	18,8	13	15,7	0,668
9477	1	1,4	1	1,2	1,000
10034	11	15,9	9	10,8	0,471
10398	26	37,7	22	26,5	0,163
10463	4	5,8	9	10,8	0,384
10506	2	2,9	0	0	0,204
10550	13	18,8	13	15,7	0,668
12308	17	24,6	16	19,3	0,437
12310	1	1,4	0	0	0,454
12406	2	2,9	3	3,6	1,000
14766	36	52,2	50	60,2	0,330
14793	1	1,4	1	1,2	1,000
14798	13	18,8	15	18,1	1,000
14870	1	1,4	4	4,8	0,377
15812	3	4,3	0	0	0,091
15884	0	0	5	6,0	0,064
15904	4	5,8	7	8,4	0,755
15924	12	17,4	9	10,8	0,345
15928	4	5,8	14	16,9	0,044

* The number in parenthesis represent the number of CA-repeat

2.4 Validation de la méthode de séquençage automatique pour la détection des variations hétéroplasmiques et homoplasmiques de l'ADNmt

Avant d'entreprendre notre projet de recherche portant sur l'analyse du génome mitochondrial, nous avons voulu évaluer la sensibilité de notre méthode de séquençage automatique (ABI 377, Perkin-Elmer) pour la détection des modifications hétéroplasmiques. Comme nous l'avons déjà mentionné, certaines mutations sévères de l'ADNmt causant des encéphalopathies sont présentes sous forme hétéroplasmique, c'est-à-dire qu'elles ne sont présentes que dans une portion du nombre total de copies de l'ADNmt d'une cellule. Il est reconnu que le niveau d'hétéroplasmie d'une mutation ponctuelle doit toujours dépasser un seuil situé entre 80-85% pour induire une manifestation pathologique (Sciacco *et al.*, 1994; Boulet *et al.*, 1992; Chomyn *et al.*, 1992). Comme on ne peut exclure la possibilité de variations hétéroplasmiques chez les patients Alzheimer, nous avons effectué une expérience permettant d'établir la valeur minimale du niveau d'hétéroplasmie détectable par la méthode de séquençage automatique en mélangeant les ADNmt de deux individus dont l'un possède une modification connue. Les ADN ont été dosés et mélangés afin d'obtenir des proportions variant de 0 à 100% (0, 10, 20, 30 ... 100%). Nous avons répété cette expérience plusieurs fois avec différents polymorphismes et déterminé que nous pouvions détecter sans ambiguïté la présence d'une modification hétéroplasmique lorsque sa fréquence dépassait le seuil de 40 à 50%. La figure 4 (p.122) illustre que la modification G/A (position 6480) est indétectable avant 20% mais qu'à 30% on commence à observer une diminution de la hauteur du G (tracé noir, vis-à-vis la flèche en haut) et une augmentation notable du A (tracé vert). C'est seulement à partir de 40% que l'on peut confirmer la présence de la modification. Lorsque la

valeur de chaque allèle représente 50%, la hauteur de deux fragments est identique et il ne fait plus aucun doute que nous sommes en présence d'une variation hétéroplasmique (cette situation est comparable à une modification hétérozygote de l'ADN nucléaire). Par la suite, le nucléotide A prend de plus en plus de valeur et atteint sa hauteur maximale à 100%. Cette expérience démontre clairement que l'on peut détecter par la méthode de séquençage automatique de fragments PCR les modifications dont la fréquence d'hétéroplasmie dépasse 40 à 50%.

Pour ce qui est des variations homoplasmiques, cette même méthode s'est avérée être très efficace. Il était pratiquement impossible ne pas détecter les variations de ce type (voir la figure 5, p.123). Par cette approche, nous avons réussi à détecter 95 variations différentes de l'ADNmt. D'autres part, nous avons également utilisé une autre méthode pour détecter certaines variations chez les 65 témoins du SLSJ et chez une vingtaine de patients. Il s'agit de la méthode par digestion avec enzyme de restriction, communément appelée RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). Cette technique repose sur le fait que lors du remplacement d'un nucléotide par un autre (mutation), le site de reconnaissance d'une enzyme en particulier, dont l'action est de couper l'ADN, peut être altéré (création ou élimination du site de restriction). Par exemple, lors de la création d'un site de restriction, par une mutation, le fragment d'ADN contenant ce site est coupé en deux. Il suffit, par la suite, de visualiser les fragments d'ADN sur gel d'agarose pour détecter la présence de la mutation. Cette méthode est plus simple, plus rapide et moins onéreuse que le séquençage. Par contre, elle est peu utile pour découvrir de nouvelles modifications génétiques. Il faut donc connaître préalablement l'emplacement des variations que l'on veut analyser. La figure 6 présente deux exemples du type de résultats obtenu à l'aide de cette méthode.

Figure 4. Modification hétéroplasmique à la position 6480 dont la fréquence varie de 0 à 100%.

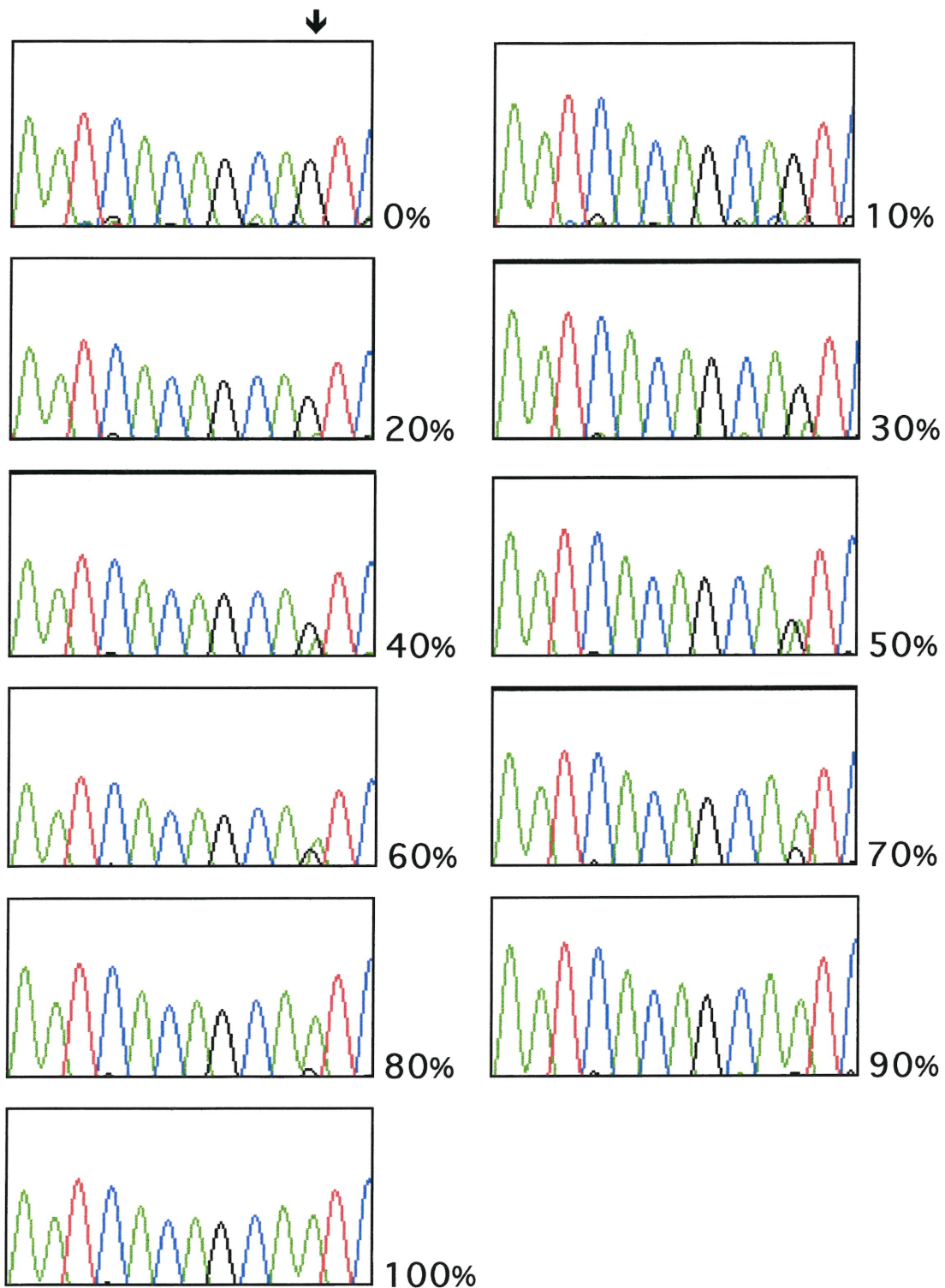


Figure 5. Détection de la variation 15812 chez un patient Alzheimer (A) et chez un individu témoin (G)

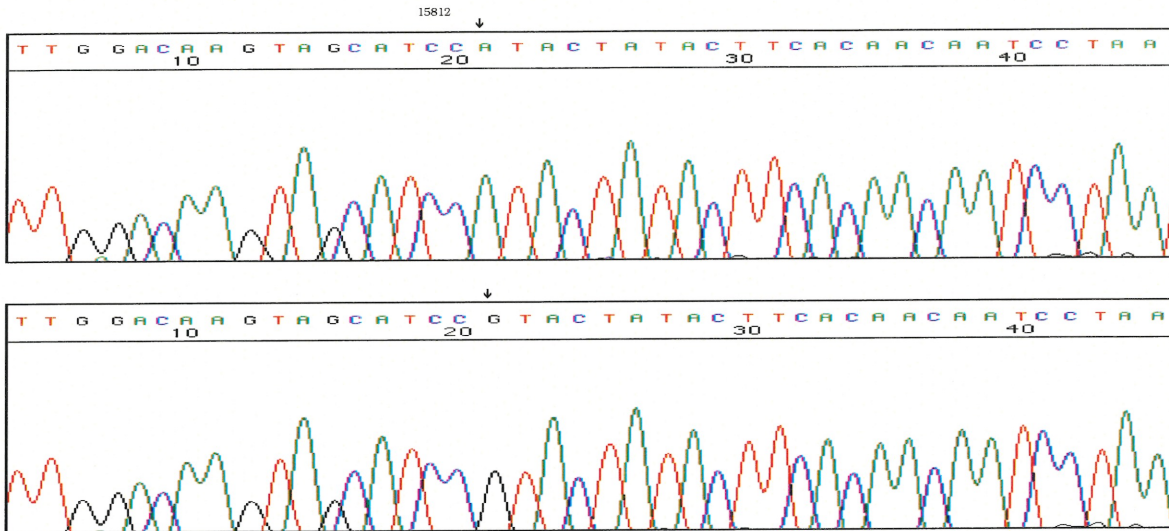
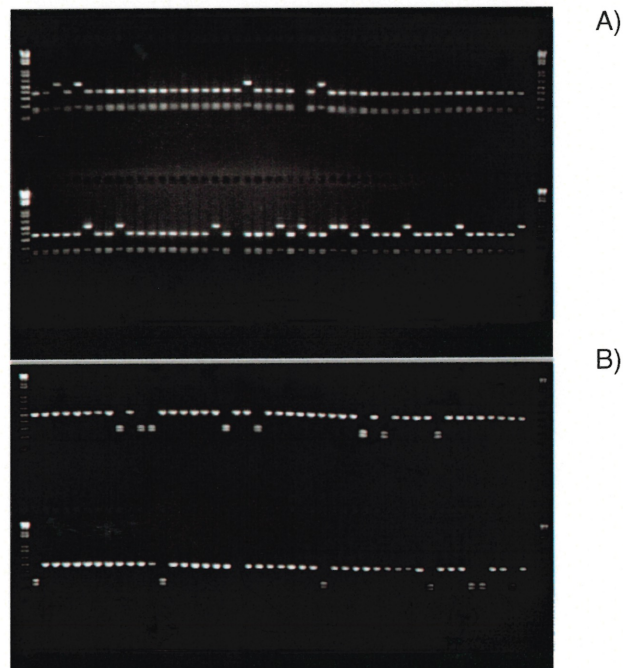


Figure 6. A) Détection chez une série de patients de la modification 8251 par la digestion du fragment PCR L7900/H8560 avec l'enzyme *Hae III*. B) Détection de la modification 10550 par la digestion du fragment PCR L10297/H10774 avec l'enzyme *Nla III*.



2.5 Détection de mutations somatiques de l'ADNmt chez 5 patients Alzheimer et 5 individus témoins.

L'hypothèse que nous voulions vérifier, dans cette étude, était celle d'un taux plus élevé de mutations somatiques de l'ADNmt dans le cerveau des patients Alzheimer que dans celui d'individus témoins. Certains patients et témoins ayant fait l'objet de cette étude sont porteurs de modifications que nous avons déjà trouvées plus souvent chez des patients (positions : 5633, 7476 et 15812) ou chez des témoins (positions : 709 et 15928). Sur la base du fait que, plus une mutation de l'ADNmt est délétère, plus elle augmente le niveau de stress oxydatif et plus le taux de mutations somatiques est élevé, nous avons voulu vérifier si la présence de ces modifications homoplasmiques, que l'on croit pathologiques ou bénéfiques, augmente ou diminue le taux de mutations somatiques à l'intérieur de l'ADNmt.

Comme les mutations somatiques ont généralement une fréquence hétéroplasmique très faible, elles ne peuvent être détectées lors du séquençage direct de produits PCR. Il faut donc avoir recours à une étape supplémentaire de clonage. Ainsi, chaque clone étudié correspond à une seule molécule d'ADNmt initiale.

Dans cette étude, nous avons cloné la région du génome mitochondrial contenant le gène COIII du cerveau de 5 patients (8801, 9114, 9133, 9248 et 9429) et de 5 cerveaux témoins (CT8, CT11, CT12, CT16 et CT18). Il s'agit ici de cerveaux qui proviennent de Montréal. Cette portion de l'ADNmt a été obtenue par amplification PCR à l'aide des amorces L9090 et H10107 (taille du fragment 1017 pb) et de l'ADN total isolé à partir du cortex cérébral. Pour contourner le haut taux d'erreur de la *Taq* polymérase, nous l'avons remplacée par la ventr^R polymérase

qui a une activité exonucléasique lui permettant de corriger ses erreurs et lui conférant une fidélité de 15 fois supérieure à celle de la *Taq* polymérase (Eckert et Kunkel, 1991; Mattila *et al.*, 1991). L'étape du clonage a débuté par une ligation de chacune des réactions PCR dans le vecteur pCR[®]II (TA Cloning[®]Kit, Invitrogen) et, par la suite, insérée dans une souche bactérienne compétente (INV α F' One Shot, Invitrogene). L'insert de chaque clone a été amplifié par PCR radioactif et digéré avec l'enzyme *DdeI* de façon à obtenir plusieurs fragments dont la taille ne dépasse pas 300 pb. Finalement, les mutations somatiques ont été détectées par la méthode de SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism). Cette technique est basée sur le principe que la structure secondaire que prend un segment d'ADN simple-brin est fonction de sa séquence. Or, une mutation ponctuelle au sein de cette séquence modifie en général suffisamment la structure secondaire pour qu'il en résulte une modification de la migration en électrophorèse (gel d'acrylamide). Cette propriété permet donc de mettre en évidence la présence des mutations ponctuelles.

Nous avons analysé par cette méthode un total de **2774** clones bactériens et détecté pour l'ensemble des 10 sujets 260 mutations (9,4%). Il y a donc, pour chaque individu, près d'une molécule d'ADNmt sur 10 possédant une mutation somatique à l'intérieur du gène COIII.

Le tableau I (p.126) indique le nombre de clones analysés pour chaque individu, ainsi que le nombre de mutations somatiques trouvées. La fréquence de mutagenèse de tous les individus se situe autour de 10%. Aucun des 10 individus ne se démarque des autres, sauf peut-être le témoin CT-8 dont la fréquence de mutagenèse est de seulement 6,3%. Chez les patients, on dénombre un total de 125 mutations pour 1321 clones analysés (**9,5%**), alors que pour les témoins, nous

avons détecté 135 mutations sur 1453 clones (**9,3%**). La première conclusion que nous pouvons tirer est qu'il n'y a pas d'augmentation du taux de mutations somatiques dans l'ADNmt (gène COIII) des patients Alzheimer. L'accumulation d'erreurs dans l'ADNmt ne participerait donc vraisemblablement pas au développement de cette maladie.

Tableau I. Nombre et fréquence des mutations somatiques détectées chez 5 patients Alzheimer et 5 témoins.

Individus	Phénotype	Nb. de clones analysés par SSCP	Nb. de mutations détectées	Fréquence
9133	Alzheimer	311	31	9,9%
8801	Alzheimer	234	26	11,1%
9114	Alzheimer	319	25	7,8%
9428	Alzheimer	166	14	8,4%
9429	Alzheimer	291	29	10,1%
CT-8	Témoin	254	16	6,3%
CT-11	Témoin	317	28	8,8%
CT-12	Témoin	369	37	10,0%
CT-16	Témoin	270	24	8,9%
CT-18	Témoin	243	30	12,3%

On remarque également dans le tableau I que le patient 9133 porteur de l'haplotype composé des modifications 5633, 7476 et 15812 a une fréquence de mutations de 9,9%, ce qui est comparable à la fréquence observée chez les autres sujets. La présence de cet haplotype n'aurait donc pas d'influence sur le taux de mutagenèse à l'intérieur du gène COIII de l'ADNmt. En ce qui concerne l'individu témoin porteur des variations 709 et 15928 (CT-16) son taux de mutations somatiques est légèrement sous la moyenne (8,9%).

Afin de déterminer plus précisément la nature des mutations détectées par la méthode de SSCP, nous avons séquencé 125 clones différents porteurs d'une mutation somatique (61 Alzheimer et 64 témoins). Le tableau II présente un résumé des caractéristiques de ces mutations que nous avons détectées (la liste détaillée des mutations est présentée à l'annexe I).

Tableau II. Nature des mutations somatiques de 61 clones représentant les 5 patients Alzheimer et de 64 clones représentant les 5 témoins.

	Alzheimer	Témoins
Clones séquencés	61	64
Transitions	34 (56%)	36 (56%)
transversions	23 (38%)	26 (41%)
Délétions	4 (6%)	2 (3%)
Mutations faux sens	28 (46%)	33 (52%)
Mutations neutres	29 (48%)	29 (45%)

A toutes fins pratiques, on peut affirmer que la nature des mutations somatiques des différents clones Alzheimer et témoins est identique. Il n'y a pas plus de mutations délétères dans le groupe de patients Alzheimer que chez les témoins.

3 - DISCUSSION

3.1 Les sujets (patients et témoins)

Tous les patients Alzheimer (préséniles et séniles) qui ont fait partie de nos études (mesures d'activité CO et analyses génétiques), provenaient de la région du Saguenay-Lac Saint-Jean (SLSJ). Il s'agit en fait de cerveaux de patients décédés, conservés à une température de -80°C (banque de cerveaux du Projet IMAGE). Nous avons utilisé des cerveaux pour la simple raison que le diagnostic le plus fiable de la MA repose sur l'examen neuropathologique suivant l'autopsie du patient. Lorsque le diagnostic est établi avant le décès, le taux de réussite est de seulement 85% (Hauw *et al.*, 1991). Ainsi, si nous avons utilisé de l'ADN lymphocytaire de patients vivants, nous aurions pu contaminer notre échantillonnage avec des patients atteints d'autres maladies neurodégénératives.

Idéalement, il aurait été souhaitable d'avoir un groupe témoin provenant également d'une banque de cerveaux et de la même région géographique que les patients. Cependant, l'obtention de cerveaux témoins s'est avérée une lourde tâche. Pour la première étude, celle publiée dans la revue *NeuroReport* (Chagnon *et al.*, 1995) nous avons seulement 8 cerveaux témoins qui provenaient de différentes régions du Québec, incluant le SLSJ. Dans la seconde étude (Chagnon *et al.*, 1996), nous avons ajouté 10 nouveaux cerveaux, mais qui provenaient cette fois de la région de Montréal. Ces cerveaux sont ceux d'individus de souche canadienne française décédés après l'âge de 65 ans et qui n'avaient aucune trace de maladies neurologiques dans leurs historiques médicales. La cause du décès

de la majorité de ces sujets est attribuable à une maladie cardiaque ou respiratoire.

Pour la suite de nos travaux, il devenait cependant impératif d'avoir un nombre beaucoup plus important de témoins. Le nombre de cerveaux provenant de la région de Montréal étant arrêté au nombre de 18 (sujets CT1 à CT18 dans le tableau III (p.117) de l'article Chagnon *et al.*, 1999), nous ne pouvions faire à ce moment aucune comparaison statistique entre les patients et témoins. La seule alternative qui s'offrait à nous était de nous tourner vers un échantillon de 65 ADN témoins d'origine sanguine qui était à notre disposition (sujets 80014 à 85205 dans le tableau III (p.117) de l'article Chagnon *et al.*, 1999). Même si ces ADN témoins n'étaient pas isolés à partir de tissus cérébraux, ils avaient, par contre, l'avantage de provenir de la même population fondatrice que tous nos patients, c'est-à-dire le SLSJ. Tous ces sujets (patients et témoins) étaient donc reliés entre eux par une dizaine de générations.

Pour une étude génétique classique, nous avons un échantillon de choix, puisque l'ADN nucléaire est exactement le même peu importe le tissu étudié. Dans notre cas, le problème provient du fait que le génome mitochondrial peut varier d'un tissu à l'autre (hétéroplasmie). Il nous est donc impossible de comparer correctement le niveau d'hétéroplasmie de certaines variations entre patients et témoins. Pour ce qui est des variations homoplasmiques cela ne pose aucun problème.

Même si l'ADN de nos deux groupes provient de tissus différents, il est fort probable que cela ne pose aucun problème. En effet, nous croyons que si une modification de l'ADNmt est impliquée dans la MA, celle-ci risque d'être sous forme

homoplasmique plutôt qu'hétéroplasmique pour la raison suivante. Les variations de l'ADNmt peuvent être classifiées en plusieurs catégories selon leurs conséquences pathologiques (très délétère, moyennement délétère, légèrement délétère et neutre) (voir Wallace, 1994). Généralement, les mutations très délétères demeurent sous forme hétéroplasmique puisque les individus porteurs meurent rapidement, ce qui a pour effet, d'empêcher ces mutations de s'installer dans les populations. Par contre, plus l'effet d'une mutation est faible, plus celle-ci a le temps de s'installer sur plusieurs générations et d'atteindre la forme homoplasmique. D'ailleurs, toutes les variations neutres spécifiques de certaines populations sont sous la forme homoplasmique. Dans le cas de la MA, les mutations impliquées (s'il y en a) se doivent d'être très légèrement délétères puisque les patients porteurs vivent, tout de même, durant 65 ans sans aucune déficience. Ainsi, nous recherchions plutôt une variation homoplasmique qu'hétéroplasmique. Par conséquent, le fait d'utiliser de l'ADNmt provenant du cortex des patients et des lymphocytes des témoins ne devrait pas être un préjudice très important pour cette étude. Bien que nous n'écartions pas la possibilité qu'une mutation hétéroplasmique puisse induire le phénotype Alzheimer, notre étude se prêtait difficilement à la vérification d'une telle hypothèse pour l'ensemble de nos sujets.

3.2 Déficit de l'activité cytochrome oxydase chez les sujets Alzheimer de type sénile

Le diagnostic d'une maladie mitochondriale est fondé entre autres sur le déficit de l'un des complexes de la chaîne respiratoire. L'hypothèse voulant que le génome mitochondrial joue un rôle dans la MA implique donc une déficience dans

certaines éléments de cette chaîne. Ainsi, avant d'entreprendre l'analyse génétique de l'ADNmt, nous nous sommes d'abord assurés que l'activité CO était significativement réduite chez nos patients Alzheimer. Si tel n'avait pas été le cas, une étude du génome mitochondrial aurait été inutile. Nous avons donc effectué un premier dosage enzymatique de l'activité CO dans plusieurs régions cérébrales chez quelques patients Alzheimer (séniles et préséniles) ainsi que chez d'autres patients atteints de différentes maladies neurodégénératives. Les résultats de cette étude, publiés dans le premier article, révèlent une diminution significative de l'activité CO dans le cortex frontal (-34%; $p < 0,05$) et pariétal (-38%; $p < 0,05$) de patients atteints de MA de type sénile (SDAT, $n=10$) comparativement à des sujets témoins ($n=8$) (Chagnon *et al.*, 1995). Par ailleurs, aucune réduction significative de l'activité de cette enzyme n'a été observée dans les autres régions cérébrales étudiées (hippocampe, gyrus parahippocampique, cervelet et substance noire) ni chez des individus atteints de maladie de Parkinson ($n=5$), de démence à corps de Lewy ($n=5$), de démence vasculaire ($n=8$) ou de MA de type présénile (PDAT, $n=10$). Le fait que ce déficit soit observé uniquement chez les patients SDAT suggère que la réduction de l'activité CO n'est pas qu'une simple conséquence du processus dégénératif. Si tel était le cas, nous aurions probablement observé une réduction de l'activité de cette enzyme dans les autres maladies étudiées. Certains mécanismes spécifiques à la forme sénile de la MA doivent donc vraisemblablement interagir directement ou indirectement avec le niveau d'activité CO.

Les résultats présentés dans le 2e article confirment cette observation. En effet, nous avons effectué un second dosage de l'activité CO chez 31 nouveaux sujets SDAT et réanalysé les 8 sujets témoins ayant fait partie de la première étude ainsi que 10 autres nouveaux témoins (ceux de Montréal). Nous avons

trouvé que chez ces patients l'activité CO était diminuée de 23% dans le cortex frontal et de 30% dans le cortex pariétal. Ces valeurs légèrement inférieures à celles que nous avons obtenues antérieurement, demeurent significatives.

Bien que les résultats générés par ces deux études démontrent une diminution de l'activité du complexe CO dans la MA, nous ignorons les conséquences réelles d'un tel déficit. Il est possible que celui-ci ne soit pas suffisant pour induire des manifestations pathologiques. Cependant, une étude effectuée chez le rat a démontré qu'une baisse de l'ordre de 30 à 35% de l'activité CO cérébrale avait pour effet de diminuer les capacités d'apprentissage et de mémoire de cet animal (Bennet *et al.*, 1996, 1992 et 1990). Puisque nous avons observé une diminution de l'ordre de 30% de l'activité CO dans le cortex pariétal des patients SDAT, nous pouvons supposer que cette baisse d'activité est peut-être suffisante pour avoir des conséquences pathologiques. Par contre, cette affirmation demeure très spéculative étant donné qu'il est très difficile de comparer le comportement de deux espèces différentes. De plus, l'origine du déficit CO présent chez le rat est artificielle, donc les réactions de l'animal à la diminution d'activité CO peuvent encore une fois être très différentes de ce qui se produit réellement chez des patients humains.

3.2.1 Activité CO reliée à l'âge du début de la maladie

Malgré sa division en formes présénile (avant 65 ans) et sénile (après 65 ans), la MA est actuellement considérée comme une maladie unique au plan pathologique. Cependant, beaucoup de critères autres que pathologiques tendent à différencier ces deux formes de MA (Scheltens *et al.*, 1993). Au strict point de

vue génétique, la forme présénile semble plus clairement héréditaire que la forme sénile. Il existe donc probablement plusieurs mécanismes physiopathologiques différents qui mènent au développement de cette maladie. Le niveau de l'activité CO est l'un des éléments qui semblent distinguer la forme sénile de la forme présénile. Nous avons observé un déficit significatif de l'activité de cette enzyme chez les sujets atteints de la forme sénile de la MA, alors que l'activité était pratiquement normale chez les sujets préséniles.

Notre première hypothèse voulait que l'âge avancé des sujets SDAT soit la principale cause expliquant la différence d'activité CO entre les individus SDAT et PDAT. Puisque l'on sait que l'activité CO diminue progressivement avec le vieillissement (Hsieh *et al.*, 1994), il est à prévoir que l'activité CO mesurée chez les patients de type sénile soit plus faible que l'activité mesurée chez les patients moins âgés (présénile). Cependant, l'écart entre patients SDAT et PDAT est assez important ce qui laisse croire qu'il ne s'agit peut-être pas d'une diminution graduelle de l'activité CO avec l'âge, mais bien d'une distinction entre ces deux groupes.

3.2.2 Activité CO reliée à la durée de la maladie

Lors du premier dosage enzymatique, nous avons observé une relation entre la durée de la maladie et l'activité CO chez quelques sujets SDAT (n=10). Le deuxième dosage, effectué chez 31 sujets SDAT, nous a permis de préciser davantage cette relation (Chagnon *et al.*, 1996). Initialement, ces 31 sujets ont été répartis en trois groupes différents selon la durée de leur maladie : un groupe de courte durée (3 à 5 ans, moyenne de $3,88 \pm 0,85$ années, n=17), un groupe de moyenne durée (6 à 10 ans, moyenne de $7,55 \pm 1,33$ années, n=9) et un groupe

de longue durée (11 ans et plus, moyenne de $14,60 \pm 2,60$ années $n=5$). Les résultats obtenus ont confirmé la corrélation puisque nous avons observé une réduction significative de l'activité CO dans le cortex pariétal des patients du groupe de courte durée ($3,90 \pm 0,85$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$) comparativement au groupe de longue durée ($5,71 \pm 1,10$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$). L'activité CO des sujets du groupe de moyenne durée avait une valeur intermédiaire aux deux autres groupes ($4,84 \pm 1,03$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$), tandis que les individus témoins présentaient le plus haut niveau d'activité CO ($6,35 \pm 1,47$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$).

Cependant, nous devons souligner que l'association entre la durée de maladie et l'activité CO pourrait être trompeuse. En effet, si les mécanismes impliqués dans une progression rapide de la maladie ne sont pas les mêmes que pour une évolution plus lente, le déficit CO pourrait n'être rien de plus qu'une conséquence de ces mécanismes spécifiques, sans être un élément causal du processus pathologique. Cette réflexion amène à questionner l'implication réelle du déficit CO dans la MA.

3.2.3 Le déficit de l'activité CO dans la MA est-il une cause ou un effet

Selon nos observations et celles de plusieurs autres études (Parker *et al.* 1990, 1994, 1995; Kish *et al.*, 1992; Simonian et Hyman, 1993; Mutisya *et al.*, 1994; Maurer *et al.*, 1995), nous pouvons affirmer que les mesures d'activité du complexe CO sont plus faibles dans le cerveau des patients Alzheimer que chez des témoins. Ce déficit enzymatique semble donc bien établi, mais son rôle exact dans le développement de la MA, s'il en a un, est difficile à déterminer. Certains éléments plaident en faveur d'un rôle actif alors que d'autres observations laissent

supposer que ce déficit n'est qu'une conséquence du processus dégénératif, voir un simple artefact.

Les éléments qui indiquent un rôle actif sont les suivants. D'abord, nous devons considérer que si le déficit de cette enzyme était secondaire aux processus dégénératifs, nous aurions dû observer une baisse de son activité chez tous les sujets Alzheimer. Or, aucune réduction n'a été observée chez les patients atteints de la forme présénile de la MA et ce, malgré la présence des mêmes signes neuropathologiques. De plus, nous avons observé une hétérogénéité dans les valeurs d'activité CO à l'intérieur du groupe de patients SDAT. Bien que tous ces sujets aient répondu aux mêmes critères neuropathologiques de la MA, seuls ceux ayant survécu moins de 5 ans ont présenté un déficit enzymatique sévère. Si le déficit CO n'était qu'une conséquence de la neurodégénérescence, les patients souffrant de la forme présénile ainsi que les SDAT ayant survécu plus de 5 ans auraient dû eux aussi présenter une réduction de l'activité CO. Par ailleurs, on pourrait croire que ce déficit enzymatique est la conséquence d'une perte neuronale et donc d'une perte plus importante de mitochondries pour certains patients que pour les sujets témoins. Parker *et al.* (1994) ont exclu cette possibilité en effectuant des dosages enzymatiques sur un nombre égal de mitochondries préalablement purifiées et provenant du cortex cérébral de patients Alzheimer de type sénile et de sujets témoins. Cette approche, évite que la perte neuronale observée dans la MA ne vienne fausser les résultats. De plus, ils ont effectué le dosage des 4 complexes de la chaîne respiratoire et ont observé que seule l'activité du complexe IV (CO) était réduite significativement chez les sujets Alzheimer. Si le déficit CO n'était qu'une simple conséquence de la perte de mitochondries dans les régions dégénérées, l'activité des 4 complexes aurait dû être affectée de façon comparable. Cette expérience démontre que la réduction de

l'activité CO dans la MA a bien lieu. De plus, le même groupe de recherche a démontré que la quantité de cytochrome aa3, une composante du complexe CO, était normale chez des sujets Alzheimer de type sénile (Parker et Parks, 1995). Cela signifie que pour un volume donné de tissu cérébral, le nombre de complexes CO est égal entre patients et témoins; la diminution d'activité CO ne résulte donc pas, selon cette étude, d'une perte physique du complexe. Mentionnons que ces deux études du groupe de Parker n'ont pas été répétées, par la suite, par d'autres chercheurs. Nous devons donc nous fier uniquement à ce groupe, qui récemment était de connivence avec la compagnie américaine MitoKor sur la fausse découverte de mutations hétéroplasmiques de l'ADNmt dans de la MA.

Nous venons de voir que la diminution d'activité CO dans le cerveau des patients Alzheimer ne semble pas être la conséquence d'une perte neuronale. Pourtant, plusieurs éléments nous interdisent d'affirmer que ce déficit enzymatique est impliqué dans la physiopathologie de la MA. Premièrement, la différence que nous observons entre patients séniles et préséniles pourrait être une simple conséquence de la différence d'âge entre les deux groupes ($80,0 \pm 3,8$ ans vs $71,2 \pm 5,6$ ans). Il est d'ailleurs reconnu que les fonctions mitochondriales, incluant l'activité CO, s'amenuisent avec le vieillissement (Boffoli *et al.*, 1994, Hsieh *et al.*, 1994). De plus, il est reconnu que le niveau d'activité CO est le reflet de l'activité neuronale. En effet, la privation de toute stimulation visuelle provoque une diminution de l'activité CO dans les neurones du cortex visuel de chats (Wong-Riley, 1979) et de singes (Horton et Hubel, 1981) alors que la stimulation électrique prolongé du nerf auditif provoque une augmentation de l'activité CO dans le cortex auditif (Wong-Riley *et al.*, 1981). Les fonctions cognitives étant réduites chez les patients Alzheimer, il est possible que la diminution d'activité CO ne résulte que d'une adaptation à la baisse de l'activité cérébrale. Dans ce cas, le

déficit CO ne serait qu'une conséquence et ne jouerait aucun rôle causal dans le processus pathologique de la MA. D'ailleurs, plusieurs études ayant observé une diminution de l'activité CO dans la MA envisagent cette possibilité (Kish *et al.*, 1992; Simonian et Hyman, 1993; Mutisya *et al.*, 1994). Enfin, nous avons mesuré une diminution significative de l'activité CO seulement dans 2 des 6 régions cérébrales étudiées chez les patients SDAT. Si ce déficit enzymatique était purement attribuable à une mutation de l'ADNmt, toutes les régions cérébrales auraient dû être affectées de façon identique. Il est particulièrement étrange que la structure cérébrale la plus affectée par la MA (hippocampe), présente un niveau d'activité CO comparable à ceux des témoins.

De plus, il faut également envisager que ce déficit enzymatique ne soit pas réel et qu'il s'agisse, en fait, d'un simple artefact produit lors des manipulations post-mortem des échantillons cérébraux. Par exemple, le fait que nous ayons utilisé un homogénat de cerveau implique que le complexe CO n'est probablement plus lié à la membrane mitochondriale interne. Il se trouve plutôt libre dans la solution. Ainsi, il pourrait très bien y avoir une composante pathologique de la MA, intracellulaire ou extra cellulaire, qui *in vivo* n'affecte pas l'activité CO mais qui lorsqu'elle se trouve liée à ce complexe à la suite du processus d'homogénéisation modifierait son activité. Par conséquent, la méthode que nous avons utilisée ne nous permet pas de conclure quoi que ce soit sur la nature réelle du déficit CO. Finalement, la majorité des études publiées sur l'activité CO et la MA, incluant la nôtre, ont utilisé sensiblement la même technique biochimique, ce qui implique que les mêmes lacunes se retrouvent dans chaque étude.

À la lumière de ce que nous venons de voir, il est impossible de se prononcer sur le rôle exact du déficit enzymatique CO dans la MA. D'une part, ce

déficit n'est peut-être qu'une simple adaptation à la diminution de l'activité neuronale. D'autre part, il est possible qu'il joue un rôle actif puisqu'il a été démontré qu'une diminution sévère de l'activité CO entraîne inévitablement des conséquences cérébrales (on n'a qu'à penser aux encéphalopathies mitochondriales).

Nous croyons que la réponse définitive à ce dilemme se trouve dans la génétique. Si en effet, le déficit CO joue un rôle actif dans la MA, on est en droit de s'attendre à ce que, tout comme pour les cytopathies mitochondriales, ce déficit soit associé à certaines modifications génétiques. Comme nous l'avons déjà mentionné ces modifications hypothétiques ont des chances d'être localisées à l'intérieur de l'un des trois gènes CO ou des ARNt du génome mitochondrial. L'étude de ce génome chez plusieurs patients et témoins visait à élucider le rôle de ce déficit enzymatique. Si aucune modification de l'ADNmt n'était observée, nous pourrions conclure que les gènes CO et ARNt mitochondriaux n'étaient pas impliqués dans la génétique de la MA. Par contre, si certaines modifications avaient été associées à des patients présentant une diminution de l'activité CO, nous aurions pu affirmer que ce déficit enzymatique était possiblement ou potentiellement impliqué dans le développement de la MA.

3.3 Analyse du génome mitochondrial

Cette portion de l'étude concerne le séquençage de toutes les régions de l'ADNmt pouvant avoir des conséquences directes sur l'activité du complexe CO (les trois gènes CO ainsi que les 22 ARNt). Même si ce complexe enzymatique est composé de sous-unités codées par les génomes nucléaire et mitochondrial, notre

étude a porté uniquement sur l'analyse de l'ADNmt. Ce choix s'appuie sur plusieurs faits connus. D'abord, le taux de mutations de l'ADNmt est environ 20 fois supérieur à celui de l'ADN nucléaire, et les trois gènes CO codés par l'ADNmt sont le coeur catalytique de l'enzyme (Capaldi, 1990). La probabilité de trouver une mutation ayant une conséquence directe sur l'activité CO est donc plus grande pour l'ADNmt que l'ADN nucléaire. De plus, on observe dans la majorité des cytopathies mitochondriales que le déficit de la chaîne respiratoire est directement lié à la présence de mutations du génome mitochondrial et non nucléaire. Ceci n'exclut évidemment pas la possibilité que le déficit CO puisse être causé par une anomalie du génome nucléaire. D'ailleurs, certaines cytopathies mitochondriales avec un déficit CO comme le syndrome de Leigh et la myopathie infantile fatale sont transmises selon un mode autosomal récessif, ce qui implique la défectuosité de certains gènes nucléaires (voir Dimauro *et al.*, 1990). Contrairement aux cytopathies mitochondriales classiques (causées par une mutation de l'ADNmt), il est très difficile d'identifier la cause génétique de ces maladies "nucléaires" car un nombre très élevé de gènes (dont certains ne sont pas encore identifiés) est impliqué dans l'élaboration, le fonctionnement et la régulation de la chaîne respiratoire mitochondriale. Par conséquent, nous avons opté, dans le cadre de cette étude, et ce, compte tenu des moyens disponibles, d'analyser uniquement le génome mitochondrial, particulièrement les trois gènes CO et les 22 ARNt.

La méthode que nous avons utilisée pour analyser l'ADNmt a consisté à utiliser de l'ADN total, c'est-à-dire tout l'ADN que peut contenir une cellule (mitochondrial et nucléaire). Puisque les oligonucléotides utilisés pour l'amplification PCR étaient spécifiques au génome mitochondrial, il n'y aurait pas lieu, normalement, de s'inquiéter de la présence de l'ADN nucléaire dans nos échantillons. Cependant, il faut mentionner qu'au cours de l'évolution plusieurs

gènes mitochondriaux ont été transférés au génome nucléaire (on n'a qu'à penser aux dix sous-unités nucléaires du gène CO). De plus, il y a également d'autres gènes mitochondriaux actuels qui ont tenté dans le passé de s'intégrer au génome nucléaire (Perna et Kocher, 1996). Ces intégrations ne furent pas couronnées de succès et les copies des gènes transférés sont demeurées sous forme de pseudogènes dans le génome nucléaire (Hu et Thilly, 1995). Il y a donc un certain risque, lorsque des gènes mitochondriaux sont amplifiés par PCR, que le produit final soit contaminé par des pseudogènes qui pourraient contenir des polymorphismes inopportuns. D'ailleurs, l'étude de Davis *et al.* (1997) qui rapporte la détection de plusieurs mutations hétéroplasmiques impliqués dans la MA, a en fait, détecté des polymorphismes présents dans des pseudogènes qui n'ont aucune fonction pathologique. Suite à de nombreuses critiques de la part de plusieurs groupes de chercheurs, ils ont admis leurs erreurs en publiant un second article démentant leur découverte (Davis et Parker, 1998).

Pour ce qui est de notre étude, nous croyons être à l'abri de ce type d'erreur pour certaines raisons. D'abord, il faut mentionner que le nombre de copies du génome mitochondrial dans chaque cellule est très élevé (jusqu'à 10 000 copies) alors que chaque gène nucléaire est présent seulement sous forme de deux copies par cellule. Par conséquent, les pseudogènes mitochondriaux sont très faiblement représentés dans un échantillon d'ADN total normal, en comparaison des vrais gènes de l'ADNmt. Ce que Davis *et al.* (1997) ont fait comme erreur, a été d'utiliser une fraction enrichie d'ADN nucléaire au lieu d'une solution d'ADN standard. Ils ont donc dramatiquement diminué la représentation du génome mitochondrial au profit du génome nucléaire. Jusqu'à un certain point, ils ont donc amplifié des pseudogènes mitochondriaux plutôt que les vrais gènes de l'ADNmt, ce qui leur a donné l'impression qu'ils venaient de détecter des variations

hétéroplasmiques responsable de la MA (cette hétéroplasmie était produite par le mélange du gène normal et du pseudogène). Or, lorsqu'ils ont refait leur expérience avec un échantillon d'ADN normal, ces variations hétéroplasmiques avaient disparu ainsi que leur découverte de gènes responsables de la MA (Davis et Parker, 1998). Le fait qu'ils aient détecté un nombre important de variations hétéroplasmiques différentes aurait dû leur mettre, dès le départ, la puce à l'oreille. En effet, les pseudogènes mitochondriaux sont intégrés au génome nucléaire depuis plusieurs millions d'années et n'ont subi aucune pression de sélection. Par conséquent, ils ont évolué très différemment des vrais gènes de l'ADNmt et acquis un nombre important de variations. Il est donc très suspect de lire une séquence qui contient beaucoup de variations hétéroplasmiques. Pour notre part, tous nos échantillons d'ADN ont été préparés de façon standard et contenaient ainsi toutes les copies d'ADNmt. De plus, certains échantillons d'ADN ont été préparés suite à une purification de mitochondries éliminant, par le fait même, l'ADN nucléaire et les pseudogènes. D'autre part, lorsque nous avons comparé nos séquences d'ADNmt de patients et de témoins entre eux et avec la séquence publiée (Anderson *et al.*, 1981), nous avons été très vigilants dans l'analyse de nos résultats afin de déterminer (par la présence de plusieurs variations hétéroplasmiques) si nos échantillons n'avaient pas été contaminés par des pseudogènes.

3.3.1 Séquençage des 3 gènes CO et des 22 ARNt de l'ADNmt chez 69 patients Alzheimer et 83 individus témoins

La stratégie de ce projet d'étude, portant sur l'analyse du génome mitochondrial, comporte 2 phases. Nous avons dans un premier temps analysé

toute la séquence des trois gènes CO et des 22 ARNt de l'ADNmt chez 50 patients Alzheimer et chez 18 témoins (les 18 cerveaux témoins de Montréal). Pour couvrir ces 25 gènes, nous avons utilisé 17 paires d'amorce PCR différentes positionnées le long du génome mitochondrial (Figure 1 de l'article Chagnon *et al.*, 1999, p.111). Pour chaque réaction de séquence, nous avons obtenu une lecture variant de 500 à 600 pb représentant un total d'environ 10 000 pb de séquences par individu (l'annexe II illustre un exemple de chacune des 17 réactions de séquence). Le but de cette première phase était de détecter le plus grand nombre possible de modifications de l'ADNmt, en comparant à l'aide du logiciel « *Sequencher* » toutes les séquences entre elles (patients et témoins). Un exemple d'alignement de 50 séquences de la même réaction est présenté en annexe III. Par cette approche, nous avons relevé, dans les trois gènes CO et toutes les régions contenant les ARNt, un total de 95 modifications différentes chez les 50 patients et 18 témoins. L'annexe IV en présente une description détaillée. De ces 95 modifications, 52 sont des variations neutres ou situées dans la région non-codante, 19 affectent la séquence en acides aminés des différentes protéines mitochondriales, 15 sont situées à l'intérieur de la séquence des ARNt alors que les 9 dernières sont dans les ARNr 12S et 16S. Elles sont toutes homoplasmiques, sauf celles situées aux positions 9300, 12372, 12501, 16093 et 16129, qui sont hétéroplasmiques.

Dans la deuxième phase de cette étude, nous avons réanalysé, chez 65 autres témoins (les sujets provenant du SLSJ) et 19 autres patients de type sénile toutes les modifications potentiellement pathogéniques, c'est-à-dire celles qui modifient un acide aminé ou celles situées à l'intérieur des ARNt ou ARNr. Certains polymorphismes neutres ont également été analysés, pour un total de 42 modifications différentes.

La raison d'être de cette stratégie en deux phases était de limiter le nombre de réactions de séquence. Le séquençage des 17 réactions PCR couvrant les trois gènes CO et les 22 ARNt chez tous les 69 patients et 83 témoins aurait nécessité près de 1500 réactions de séquences différentes, ce qui représentait des coûts élevés et des délais considérables. En éliminant les modifications non-informatives, nous avons réduit le nombre de réactions de séquences à effectuer. Par ailleurs, dans le cas où une réaction contenait des modifications affectant le site de restriction d'une endonucléase, nous avons opté pour la technique RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism).

Les tableaux II (p.115) et III (p.117) de l'article #3 (Chagnon *et al.*, 1999) résument l'ensemble des résultats que nous avons générés lors du génotypage des 42 modifications de l'ADNmt chez tous les patients et témoins. Dans le but d'interpréter correctement ces résultats, nous les avons soumis à deux tests différents. À l'aide du premier test, nous avons cherché à savoir si les écarts observés entre les fréquences des différentes modifications de l'ADNmt pouvaient être uniquement le fruit de fluctuations d'échantillonnage. Le test approprié pour ce type d'analyse est la méthode exacte de Fisher (Scherrer, 1984). Brièvement, cette méthode indique quel est le degré de différences existant entre deux groupes pour une variation donnée. Nous aurions pu également utiliser le test du Khi-carré (X^2) mais lorsque les effectifs et les fréquences s'avèrent faibles (comme c'est notre cas), il est souvent impossible de respecter les conditions d'application du test X^2 . La méthode exacte de Fisher est conçue pour tenir compte de faibles fréquences (exemple 3/69 vs 0/83). Les résultats générés par cette méthode sont représentés par la valeur p . Lorsque cette valeur est égale à 1 c'est qu'il n'y a aucune différence, alors que plus la valeur p est petite, plus la différence entre les deux groupes est élevée. En condition normale, on estime que si la valeur p est

inférieure à 0.05 cela veut dire que la différence entre les deux groupes est significative. En fait, pour un p de 0.05, il y a 95% de chances que cette différence soit réelle et seulement 5% de chance que cela soit le fruit du hasard. Cette dernière affirmation est seulement vraie lorsque le test est appliqué une seule fois ou plusieurs fois mais dans des populations différentes. Dans notre cas, nous avons utilisé le même test 42 fois à l'intérieur de la même population. Nous devons donc diviser notre seuil de 0.05 par le nombre de fois que le test a été appliqué (principe de Bonferoni). Le seuil de signification diminue donc à 0.001. Nous n'avions pas cette information lors de la rédaction du troisième article (Chagnon *et al.*, 1999), ce qui a eu pour effet que certains résultats n'ont pas été interprétés correctement. Nous y reviendrons plus loin.

Le deuxième test a été une analyse phylogénétique effectuée sur toutes les données de séquences de nos sujets. Cette approche, plus complète qu'une simple analyse de fréquence, a nécessité l'utilisation du logiciel MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis; Kumar *et al.*, 1993; <http://evolgen.biol.metro-u.ac.jp/MEGA/default.html>) qui a produit l'arbre phylogénétique présenté à la figure 2 (p.112) de l'article Chagnon *et al.* (1999). Ce logiciel permet d'estimer les distances évolutives et de reconstruire la phylogénie des individus entre eux, à partir des séquences moléculaires. En d'autres termes, il permet de regrouper les individus ayant la même séquence d'ADN et de les positionner sur un arbre phylogénétique selon leur proximité génétique.

MEGA a d'abord été conçu (comme tous les autres logiciels d'analyse phylogénétique) pour estimer les distances phylogénétiques entre différentes espèces. Cependant, rien n'empêche d'utiliser ce programme pour comparer la séquence de plusieurs individus d'une même espèce possédant un certain nombre

de variations. L'arbre phylogénétique illustre donc toutes les modifications que nous avons détectées en les positionnant selon une échelle évolutive. Les plus anciennes sont situées à la base des embranchements et les plus récentes aux extrémités. En réalité, ce qui nous intéresse ce n'est pas vraiment de connaître l'ordre évolutif des modifications de l'ADNmt mais plutôt de regrouper ensemble tous les individus (patients et témoins) ayant les mêmes séquences des gènes CO et des ARNt. Ceci nous a donc permis de comparer, non pas une seule modification à la fois, mais plutôt la fréquence de tous les haplotypes possibles entre patients et témoins (combinaison de plusieurs variations présentes chez un même individu) ou encore de grouper ensemble les individus ayant un génotype mitochondrial très similaire.

Les résultats combinés de la comparaison de fréquence par la méthode exacte de Fisher et par l'analyse phylogénétique indiquent que la fréquence de la grande majorité des variations de l'ADNmt est très semblable entre les deux groupes. En effet, on observe sur l'arbre phylogénétique que le nombre de patients et de témoins est comparable dans la plupart des embranchements. Pour ce qui est de la méthode de Fisher (avec un seuil de signification de 0.001 et non 0.05), elle n'a montré aucune différence significative entre les deux groupes. L'utilisation de ces deux approches nous permet donc de conclure que la MA n'est probablement pas une maladie dont la cause principale serait une anomalie des gènes CO ou de l'un des ARNt du génome mitochondrial. Cependant, malgré l'absence de données statistiquement significatives, nous avons observé certaines différences intéressantes entre les deux groupes. La prochaine partie de la discussion sera donc divisée en deux volets. D'abord, nous traiterons de ce qui semble être associé aux patients et par la suite, de ce que nous avons détecté plus fréquemment chez les témoins.

3.3.2 Modifications de l'ADNmt associées aux patients

Parmi toutes les modifications que nous avons détectées chez les patients et témoins aucun allèle n'est significativement plus fréquent chez les patients. Cependant, vu le caractère multifactoriel de la MA, cette observation n'est pas étonnante. Par exemple, l'analyse des gènes PS1, PS2 ou APP chez 100 patients Alzheimer produirait probablement le même genre de résultats, puisque ces trois gènes n'expliquent qu'une faible proportion des cas de MA (moins de 5%). Si nous avions inclus l'analyse des gènes PS et APP dans notre étude, la fréquence chez les patients n'aurait sûrement pas été assez élevée pour atteindre un seuil significatif. Pourtant, il est bien reconnu que ces trois gènes sont impliqués dans la génétique de la MA. Ainsi, notre but n'était pas de rechercher uniquement des différences significatives entre les deux groupes, mais également de détecter des modifications se retrouvant dans le groupe de patients mais pas chez les témoins, comme pistes pour des études ultérieures.

Notre observation la plus intéressante concerne un haplotype formé des polymorphismes situés aux positions 5633 (ARNt^{Ala}), 7476 (ARNt^{Ser}) et 15812 (Cyt. B) que nous avons détecté chez trois des 69 patients Alzheimer (4.3%) mais chez aucun des 83 individus témoins. De plus, la modification 7476 a également été détectée chez un des 16 patients Alzheimer préséniles faisant partie de l'étude présentée dans l'article #2. Nous avons donc ré-examiné ce sujet et détecté également la présence des deux autres variations aux positions 5633 et 15812. Nous sommes donc en présence d'un haplotype relativement fréquent chez les patients séniles et préséniles (4/85, 4,7%) et absent du groupe témoin (0/83). Le test de Fisher indique que la valeur p représentant la différence de fréquence entre patients et témoins est de 0,084. Sans être significative, cette valeur indique tout

de même une certaine tendance. L'activité CO mesurée chez deux de ces patients se situe dans la moyenne des valeurs mesurées chez les patients.

Des 3 embranchements majeurs de l'arbre phylogénétique, cet haplotype est situé à l'intérieur de la seule lignée qui n'est pas homogène entre patients et témoins. Cet embranchement est dominé largement par la présence d'individus témoins (16/20) alors que les quelques individus porteurs de l'haplotype 5633, 7476 et 15812 sont des patients Alzheimer. Pour plusieurs raisons, il est possible que l'effet combiné de ces trois modifications ait été suffisamment important pour provoquer un changement de tendance à l'intérieur de cet embranchement et pousser les quatre patients porteurs à développer la MA. Évidemment, à ce stade-ci de l'étude, il nous manque plusieurs informations avant de pouvoir vraiment affirmer que cet haplotype est impliqué dans la MA. Les hypothèses que nous allons maintenant émettre ne sont que spéculatives.

Premièrement, en comparant ces trois modifications avec la séquence du génome mitochondrial de plusieurs espèces dont la séquence est connue, nous voyons qu'elles sont situées dans des régions relativement bien conservées. Les trois nucléotides aux positions 5633, 7476 et 15812 doivent donc avoir une certaine importance dans le fonctionnement normal de l'ARN^{tAla}, l'ARN^{tSer} et dans le cytochrome b sinon ils ne seraient que très peu conservés, surtout chez les espèces éloignées. On peut postuler que le changement de nucléotides à ces trois positions entraîne des modifications qui, sans être catastrophiques, pourraient causer certains torts au fonctionnement normal de la chaîne respiratoire. Deuxièmement, les deux modifications 5633 et 7476 ont été détectées récemment chez un individu atteint d'une encéphalopathie mitochondriale (Sternberg *et al.*, 1998). Les auteurs de cette étude mentionnent que la présence de ces deux

modifications, absentes chez des témoins, serait la cause de ce phénotype neuropathologique. Troisièmement, la fréquence de la modification 15812 est de seulement 0.1% dans la population générale. En effet, Brown *et al.* (1992) ont observé cette variation une seule fois à l'intérieur d'un groupe de 759 individus normaux. La fréquence de 4,7% que nous observons chez les patients Alzheimer (séniles et préséniles) est donc anormalement élevée. En ce qui concerne la modification 7476, elle a été détectée chez seulement 1 de 113 sujets représentant 4 régions géographiques différentes (Cann, Brown and Wilson, 1984). Une autre étude rapporte sa présence chez 1 de 100 individus (Houshmand *et al.*, 1994). Quatrièmement, la transition 15812 provoque le changement de l'acide aminé valine pour une méthionine dans la protéine cytochrome b. Or, tous les vertébrés dont la séquence de l'ADNmt est connue possèdent à cette position soit une valine, une leucine ou une isoleucine mais jamais une méthionine (Johns et Neufeld, 1991). Ce changement d'acide aminé pourrait donc avoir des conséquences fonctionnelles. Finalement, cette même modification (15812) est déjà associée à une autre maladie mitochondriale, la neuropathie optique héréditaire de Leber (LHON). Quatre-vingt-dix pour cent des cas de cette maladie neurodégénérative sont principalement attribuables à 3 mutations différentes de l'ADNmt auxquelles s'ajoute un certain nombre de modifications secondaires que l'on observe très fréquemment chez les patients atteints de cette maladie (Brown *et al.*, 1995). La modification 15812 fait partie de ces variations secondaires de la maladie de Leber. Bien que cette modification ne cause pas directement le développement de cette maladie, elle semble influencer la sévérité de son expression phénotypique (Brown *et al.*, 1992, Johns and Neufeld, 1991). Il est possible que dans le cas de la MA, cette modification joue le même rôle que pour la maladie de Leber, mais cette fois en combinaison avec 5633 et 7476.

Toutes ces observations laissent croire que cet haplotype pourrait avoir des conséquences pathologiques et être un facteur de risque pour la MA. Cependant, comme nous l'avons déjà mentionné plus haut, il faut être prudent avant d'attribuer un rôle pathologique à cet haplotype. Il y a d'ailleurs un élément important qui ne plaide pas en sa faveur. En effet, cet haplotype ne contient pas de variations dans les gènes CO mais plutôt dans les ARNt et le cytochrome b. En conséquence, tous les complexes de la chaîne respiratoire devraient donc être affectés de façon identique. Or, dans la MA seule l'activité du complexe CO est diminuée alors que les autres complexes ont une activité normale. Il faudra donc attendre que d'autres études confirment ou infirment nos résultats ou qu'une étude fonctionnelle démontre une déficience de la chaîne respiratoire chez les individus porteurs de cet haplotype.

En terminant, il y a également d'autres variations que nous avons détectées chez les patients mais pas chez les témoins. À la position 10506 (ND4, complexe I), nous avons détecté une modification chez deux patients mais pas dans le groupe témoin. Trois autres variations, aux positions 593 (ARNt^{Phe}), 4596 (ND2) et 12310 (ARNt^{Leu}) étaient présentes chez un seul patient (1.5%) mais chez aucun des témoins (0%). Étant donné que ces modifications sont rares dans notre population, il est difficile de nous prononcer sur leurs fonctions réelles. D'autres études seront requises pour déterminer s'il y a vraiment une relation de cause à effet entre ces modifications et la MA.

3.3.3 Modifications de l'ADNmt associées aux témoins

Dans le troisième article (Chagnon *et al.*, 1999), nous avons rapporté la présence de deux modifications différentes qui sont trois fois plus fréquentes chez les témoins que chez les patients ($p < 0.05$). La première de ces modifications est située à la position 709 et fait partie de la sous unité 12S de l'ARN ribosomique mitochondrial (22.3% vs 7.2%), alors que la seconde se trouve à la position 15928 à l'intérieur de l'ARNt^{Thr} (16.9% vs 5.8%). L'analyse phylogénétique indique que ces deux variations sont plus anciennes au point de vue évolutif que l'haplotype associé aux patients, et qu'elles sont la base de deux lignées représentant 22 individus témoins mais seulement 5 patients Alzheimer (Figure 2, de l'article Chagnon *et al.*, 1999, p.112). Mentionnons que sur les 22 témoins, il y en a 5 qui proviennent de Montréal (cerveau) alors que les 17 autres sont du SLSJ (lymphocyte). La proportion ($5/22 = 23\%$) est donc la même que pour l'ensemble des témoins ($18/83 = 22\%$). La différence entre patients et témoins n'est donc pas créée par un groupe particulier de témoins. Dans ce même article, nous avons mentionné que la différence entre les deux groupes était significative puisque la valeur « p » était inférieure à 0.05. Nous avons donc émis l'hypothèse que ces deux modifications pouvait avoir un effet protecteur contre la MA, ce qui expliquerait leurs présences plus fréquentes chez les sujets normaux et leur faible représentation chez les patients. De plus, comme les 65 individus témoins du SLSJ provenaient de la même population fondatrice que les patients, on pouvait difficilement attribuer cette différence à la présence de polymorphismes de population.

L'erreur importante que nous avons commise et malheureusement déjà publiée a été de prendre la valeur de 0.05 comme seuil de signification. En réalité,

puisque nous avons utilisé le test de Fisher 42 fois pour les mêmes groupes d'individus, il fallait diviser notre valeur de 0.05 par 42, ce qui diminue la valeur du seuil à 0.001. Cette différence énorme modifie complètement notre point de vue sur le rôle de ces deux modifications. Nous ne pouvons en aucun cas leur attribuer un rôle protecteur contre la MA. Il est très probable que cette différence, même si elle paraît importante, soit le fruit du hasard uniquement. En effet, nous avons détecté un si grand nombre de modifications (n=95) chez l'ensemble de nos sujets, qu'il était prévisible que la fréquence de certaines d'entre elles diffère considérablement entre patients et témoins, par pur hasard.

En conclusion de cette étude, nous pouvons affirmer qu'il n'y a aucune différence significative entre patients et témoins. Par conséquent, le déficit CO observé dans le cerveau des patients Alzheimer n'est pas causé par une anomalie des gènes CO et des ARNt mitochondriaux. De plus, les deux variations déjà associées à la MA et situées aux positions 4336 et 5460 ne se retrouvent pas plus fréquemment chez les patients que chez les témoins, bien au contraire. Ils n'ont donc aucune implication dans le développement de cette maladie. Finalement, il n'y a qu'une seule modification qui attire notre attention et il s'agit de l'haplotype dont nous avons déjà discuté. Pour en savoir davantage sur cet haplotype, nous avons mesuré le niveau de mutations somatiques de l'ADNmt (gène COIII) d'un individu porteur ainsi que de quatre autres patients et cinq témoins. La prochaine section traite de ces résultats.

3.4 Mutations somatiques de l'ADNmt chez les patients et témoins

L'analyse des mutations somatiques a été effectuée sur un nombre restreint de patients (n=5) et de témoins (n=5). Cependant, un nombre très important de clones (environ 3000) a été analysé, ce qui nous donne une vision assez juste du taux de mutations somatiques chez ces individus. Malgré la charge de travail considérable qu'a nécessité cette étude, elle présente deux limitations importantes mais inévitables. En effet, nous avons dû restreindre notre analyse au gène COIII en présumant qu'il puisse être représentatif de l'ensemble du génome mitochondrial. Cependant, nous ne savons pas ce qui se passe sur le reste des 15 kb de l'ADNmt. On pourrait donc imaginer que certaines régions puissent être plus sensibles à l'accumulation de mutations somatiques et dont le taux pourrait alors différer entre patients et témoins. D'autre part, le clonage du gène COIII a été effectué après une amplification PCR. Cette étape a donc probablement ajouté un certain nombre de mutations dans notre échantillon. Pour minimiser cet effet nous avons remplacé la Taq polymérase par la Vent polymérase, qui a un taux d'erreur très inférieur à celui de la Taq. Comme nous avons analysé un nombre important de clones Alzheimer et témoins (presque 3000), nous croyons que les erreurs qui ont pu s'infiltrer dans notre échantillon ont dû être balancées entre les deux groupes. Cependant, ces mutations d'origine technique pourraient avoir masqué des différences entre patients et témoins en compromettant le rapport signal (bruit de fond).

De cette étude, nous pouvons tirer certaines conclusions. D'abord, nous avons démontré que les mutations somatiques étaient très fréquentes à l'intérieur du gène COIII de l'ADNmt, et ce autant chez les patients que chez les témoins

(autour de 10%). Cette observation est donc en accord avec la théorie du vieillissement mitochondrial voulant que le taux de mutations somatiques de l'ADNmt augmente rapidement après l'âge de 65 ans (Ozawa, 1995b; Kadenbach *et al.*, 1995). En effet, comme l'âge moyen des individus témoins et Alzheimer est supérieur à 70 ans, un taux élevé de mutagenèse était prévisible. La comparaison du groupe de patients avec le groupe témoin ne révèle aucune différence. L'accumulation de mutations somatiques ne serait donc pas impliquée dans le développement de la MA. Par ailleurs, le patient 9133 porteur de l'haplotype 5633, 7476 et 15812 présentait un taux de mutations somatiques similaire aux autres individus. Il n'y a donc pas lieu de croire que cet haplotype ait un caractère délétère ayant pour conséquence d'augmenter le stress oxydatif ainsi que le taux de mutations somatiques. Dans le même ordre d'idées, le témoin CT-16, porteur des modifications 709 et 15928, a pratiquement le même niveau de mutagenèse que les autres sujets. Par conséquent, nous ne pouvons conclure que ces variations puisse avoir un effet protecteur contre le stress oxydatif.

4 - CONCLUSION

Les résultats obtenus au cours de cette étude apportent de nouvelles données concernant le rôle du génome mitochondrial dans la MA. D'abord, nous avons confirmé une réduction significative de l'activité enzymatique CO dans le cortex cérébral de patients Alzheimer comparativement à des individus normaux. Nous avons déterminé que ce déficit est spécifique à la MA de type sénile puisque le niveau d'activité CO est normal chez des patients atteints de la maladie de Parkinson, de démence à corps de Lewy, de démence cérébrovasculaire et de la forme présénile de la MA. Nous avons également observé une étroite relation entre le niveau d'activité CO et la durée de la MA de forme SDAT. En effet, les patients SDAT qui ont une durée de maladie très courte ont une diminution d'activité CO plus importante que ceux ayant survécu plus de dix ans à la maladie. La baisse de l'activité CO distingue donc les patients qui meurent rapidement de ceux qui survivent parfois très longtemps à la maladie. Cependant, le fait que nous ayons mesuré une diminution d'activité CO n'indique pas nécessairement que ce déficit enzymatique joue un rôle dans la MA. Il peut s'agir simplement d'une conséquence de la maladie ou encore d'un artefact. En envisageant la possibilité que la diminution d'activité CO joue un rôle actif dans la MA, un grand nombre de gènes deviennent des candidats potentiels pour la contribution à l'étiologie de cette maladie. Le but premier de notre étude était d'analyser les 25 gènes les plus suspects qui pouvaient être en cause (COI, COII, COIII et les 22 ARNt mitochondriaux).

La première conclusion qui se dégage de notre analyse génétique est que la MA n'est pas une maladie de l'ADN mitochondrial. Si cela avait été le cas, nous aurions observé sur l'arbre phylogénétique qu'un grand nombre de patients serait

situé sur des embranchements différents de témoins. Or, on observe que la fréquence des patients et des témoins est comparable dans la plupart des lignées phylogénétiques. Donc, règle générale, l'ADNmt ne distingue pas les individus qui développent la maladie de ceux qui en sont épargnés. De plus, l'évaluation du taux de mutations somatiques de l'ADNmt démontre qu'il n'y a pas plus de mutagenèse mitochondriale chez les patients que chez les témoins. Ces deux observations laissent croire que le déficit CO observé chez la plupart des patients atteints de la MA ne serait pas causé par une anomalie des gènes CO et des ARNt mitochondriaux. Il reste donc trois options pour expliquer la cause de la diminution d'activité CO. Soit qu'un des gènes nucléaires participant à la formation ou au fonctionnement du complexe CO est défectueux ou soit que la mutation responsable se situe à l'intérieur de l'ADNmt mais dans les autres gènes (complexes I et III, l'ATPase ou encore dans les ARN ribosomiques mitochondriaux). Cette hypothèse cependant est peu probable puisque l'activité des complexes I et III est normale dans la MA (le complexe II est codé uniquement par le génome nucléaire). Finalement, la dernière option que nous proposons est que le déficit enzymatique ne soit qu'une adaptation au processus dégénératif et qu'il ne joue aucun rôle dans le développement de la MA.

S'il semble évident que le déficit généralisé de l'activité CO chez les patients Alzheimer n'est pas causé par une anomalie du génome mitochondrial, nous ne pouvons pas totalement exclure la possibilité que certaines modifications de l'ADNmt participent au développement de la MA chez un nombre restreint de sujets. D'abord, il y a la présence d'un haplotype (5633, 7476 et 15812) détecté chez 4 patients (3 SDAT et 1 PDAT, 4,7%), mais chez aucun des 83 témoins. S'il s'avérait que la présence de cet haplotype dans la MA était confirmée par d'autres études, il pourrait représenter un facteur de risque pour les individus qui en sont

porteurs. Cependant, notre étude du taux de mutagenèse de l'ADNmt indique que le nombre de mutations somatiques à l'intérieur du gène CO3 de l'un des patients porteurs est comparable à celui d'individus normaux. Il n'y aurait donc pas plus de dommages oxydatifs à l'ADNmt chez les patients porteurs de cet haplotype que pour des témoins. Par conséquent, l'effet pathologique de cette modification pourrait être négligeable. Quoiqu'il en soit, d'autres études seront nécessaires avant de statuer sur l'implication réelle de cet haplotype dans la MA.

Deux approches fonctionnelles pourraient confirmer le rôle pathologique de cet haplotype. La première d'entre elles serait de créer des cellules hybrides, c'est-à-dire d'introduire des mitochondries de patients porteurs dans des cellules en culture dépourvues d'ADNmt (cellule Rho^o). La difficulté avec cette méthode tient au fait que les mitochondries transférées doivent être fraîches, c'est-à-dire provenant d'un patient vivant. Or, comme notre échantillonnage de patients était composé uniquement de cerveaux post-mortem, il nous était impossible d'envisager cette approche. Très récemment, un groupe de chercheurs japonais a réalisé une telle expérience (Ito *et al.*, 1999). Ils ont observé que le transfert d'ADNmt de patients Alzheimer dans de cellules Rho^o pouvaient restaurer, et de façon comparable à des individus témoins du même âge, les fonctions respiratoires mitochondriales. Ces résultats renforcent d'une certaine façon notre conclusion voulant que le génome mitochondrial ne soit pas impliqué dans le développement général de la MA. Cependant, il y aurait lieu d'effectuer cette expérience avec des sujets porteurs de l'haplotype que nous avons détecté. La seconde approche fonctionnelle qui pourrait être utilisée serait de créer un système de traduction mitochondriale pour vérifier l'efficacité des ARNt contenant les modifications 5633 et 7476, mais ceci n'a jamais été fait et un projet d'une telle complexité pourrait nécessiter plusieurs années de travail.

5 - RÉFÉRENCES

Allinquant B, Moya KL, Bouillot C, Prochiantz A. Amyloid precursor protein in cortical neurons: coexistence of two pools differentially distributed in axons and dendrites and association with cytoskeleton. *J Neurosci* 14 : 6842-6854 (1994).

Anderson S, Bankier AT, Barrel BG, de Bruijn MHL, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJH, Staden R, Young IG. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290 : 457-65 (1981).

Arnheim N, Cortopassi G. Deleterious mitochondrial DNA mutations accumulate in aging human tissues. *Mut Res* 275 : 157-167 (1992).

Arriagada PV, Growdon JH, Hedley-Whyte ET, Hyman BT. Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology* 42 : 631-639 (1992).

Attardi G, Contatore P, Ching E, Crews S, Gelfand R, Merkel C, Montaya J, Ojala D. Organization and expression of genetic information in human mitochondrial DNA. In *International Cell Biolog*, Schweiger HG, ed. Springer-Verlag, p. 225-238 (1981).

Bennett MC, Mlady GW, Fleshner M, Rose GM. Synergy between chronic corticosterone and sodium azide treatments in producing a spatial learning deficit

and inhibiting cytochrome oxidase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(3) : 1330-1334 (1996).

Bennett MC, Diamond DM, Stryker SL, Parks JK, Parker WD Jr. Cytochrome oxidase inhibition: a novel animal model of Alzheimer's disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 5 : 93-101 (1992).

Bennett MC, Diamond DM, Stryker SL, Parks JK, Parker WD. Cytochrome oxidase inhibition impairs learning and hippocampal plasticity. *Neurosci Abstr* 16 : 1346 (1990).

Benzi G, Moretti A. Are reactive oxygen species involved in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 16(5) : 661-674 (1995).

Bétard C, Robitaille Y, Gee M, Tiberghien D, Larrivée D, Roy P, Mortimer JA, Gauvreau D. Apo E allele frequencies in Alzheimer's disease, Lewy body dementia, Alzheimer's disease with cerebrovascular disease and vascular dementia. *NeuroReport* 5 : 1893-1896 (1994).

Binder LI, Frankfurter A, Rebhun LI. The distribution of tau in the mammalian central nervous system. *J Cell Biol* 101 : 1371-1378 (1985).

Blacker D, Wilcox MA, Laird NM, Rodes L, Horvath SM, Go RCP, Perry R, Watson B, Bassett SS, McInnis MG, Albert MS, Hyman BT, Tanzi RE. Alpha-2 macroglobulin is genetically associated with Alzheimer disease. *Nat Genet* 19 : 357-360 (1998).

Blanchard BJ, Park T, Fripp WJ, Lerman LS, Ingram VM. A mitochondrial DNA deletion in normally aging and in Alzheimer brain tissue. *NeuroReport* 4 : 799-802 (1993).

Blass JP. Pathophysiology of the Alzheimer's syndrome. *Neurology* 43(suppl 4) : S25-S38 (1993).

Blass JP, Gibson GE. The role of oxidative abnormalities in the pathophysiology of Alzheimer's disease. *Rev Neurol* 147(6-7) : 513-525 (1991).

Blass JP, Ko L, Wisniewski HM. Pathology of Alzheimer's disease. *The Psychiatric Clinics of North America* 14(2) : 397-420 (1991).

Blass JP, Baker AC, Ko L, Sheu KFR, Black RS. Induction of Alzheimer antigens by an uncoupler of oxidative phosphorylation. *Arch Neurol* 47(8) : 864-869 (1990).

Boffoli D, Scacco SC, Vergari R, Solarino G, Santacrose G, Papa S. Decline with age of the respiratory chain activity in human skeletal muscle. *Biochim biophys acta* 1226 : 73-82 (1994).

Bondareff W, Mountjoy CQ, Roth M, Rossor MN, Iversen LL, Reynolds GP. Age and histopathological heterogeneity in Alzheimer's disease. *Arch Gen Psychiatry* 44 : 412-417 (1987).

Boulet L, Karpati G, Shoubridge EA. Distribution and threshold expression of the tRNA^{Lys} mutation in skeletal muscle of patients with myoclonic epilepsy and ragged-red-fibers (MERRF) *Am J Hum Genet* 51 : 1187-1188 (1992).

Boveris A, Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J.* 134(3) : 707-716 (1973).

Bowling AC, Beal F. Bioenergetic and oxidative stress in neurodegenerative disease. *Life science* 56(14) : 1151-1171 (1995).

Broe GA, Henderson AS, Creasey H, McCusker E, Korten AE, Jorm AF, Longley W, Anthony JC. A case-control study of Alzheimer's disease in Australia. *Neurology* 40(11) : 1698-1707 (1990).

Brousseau T, Legrain S, Berr C, Gourlet V, Vidal O, Amouyel P. Confirmation of the e4 allele of the apolipoprotein E gene as a risk factor for late-onset Alzheimer's disease. *Neurology* 44 : 342-344 (1994).

Brown MD, Shoffner JM, Kim YL, Jun AS, Graham BH, Cabell MF, Gurley DS, Wallace DC. Mitochondrial DNA sequence analysis of four Alzheimer's and Parkinson's disease patients. *Am J Med Genet* 61 : 283-289 (1996).

Brown MD, Torroni A, Reckord CL, Wallace DC. Phylogenetic analysis of Leber's hereditary optic neuropathy mitochondrial DNA's indicates multiple independent occurrences of the common mutations. *Human Mutation* 6 : 311-325 (1995).

Brown MD, Wallace DC. Molecular basis of mitochondrial DNA disease. *J Bioenerget Biomembr* 26(3) : 273-289 (1994).

Brown MD, Voljavec AS, Lott MT, Torroni A, Yang CC, Wallace DC. Mitochondrial DNA complex I and III mutations associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Genetics* 130 : 163-173 (1992).

Bullido MJ, Artiga MJ, Recuero M, Sastre I, Garcia MA, Aldudo J, Lendon C, Han SW, Morris JC, Frank A, Vasquez J, Goate A, Valdivieso F. A polymorphism in the regulatory region of APOE associated with risk for Alzheimer's dementia. *Nature Genet* 18 : 69-71 (1998).

Cann RL, Brown WM, Wilson AC. Polymorphic sites and the mechanism of evolution in human mitochondrial DNA. *Genetics* 106(3) : 479-499 (1984).

Cairns NJ, Chadwick A, Lantos PL, Lavy R, Rossor MN. β A4 protein deposition in familial Alzheimer's disease with the mutation in codon 717 of β A4 amyloid precursor protein gene and sporadic Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 149 : 137-140 (1993).

Capaldi RA. Structure and function of cytochrome c oxidase. *Ann Rev Biochem* 59 : 569-596 (1990).

Carter DA, Desmarais E, Bellis M, Campion D, Brice A, Agid Y, Jaillard A, Clerger-Darpoux F. More missense in amyloid gene. *Nature Genet* 2 : 255 (1992).

Chagnon P, Robitaille Y, Gauvreau D. Brain mitochondrial DNA polymorphism and cytochrome oxidase activity in Alzheimer's disease. *Alzheimer Res* 2 : 237-242 (1996).

Chagnon P, Bétard C, Robitaille Y, Cholette A, Gauvreau D. Distribution of brain cytochrome oxidase activity in various neurodegenerative disease. *NeuroReport* 6 : 711-715 (1995).

Chandrasekaran K, Hatanpää K, Rapoport SI, Brady DR. Decreased expression of nuclear and mitochondrial DNA-encoded genes of oxidative phosphorylation in association neocortex in Alzheimer disease. *Mol Brain Res* 44 : 99-104 (1997).

Chartier-Harlin MC, Parfitt M, Legrain S, Perez-Tur J, Brousseau T, Evans A, Berr C, Vidal O, Roques P, Gourlet V, Fruchart JC, Delacourte A, Rossor M, Amouyal P. Apolipoprotein E, e4 allele as a major risk factor for sporadic early and late-onset forms of Alzheimer's disease: analysis of the 19q13.2 chromosomal region. *Hum Mol Genet* 3 : 569-574 (1994).

Chartier-Harlin MC, Crawford F, Houlden H, Warren A, Hughes D, Fidani L, Goate A, Rossor M, Roques P, Hardy J, Mullan M. Early onset alzheimer's caused by mutations at codon 717 of the β amyloid precursor protein gene. *Nature* 353 : 844-845 (1991).

Chen L, Richardson JS, Caldwell JE, Ang LC. Regional brain activity of free radical defense enzymes in autopsy samples from patients with Alzheimer's disease and from nondemented controls. *Int J Neurosci* 75(1-2) : 83-90 (1994).

Cheng SV, Nadeau JH, Tanzi RE, Watkins PC, Jagadesh J, Taylor BA, Haines JL, Sacchi N, Gusella JF. Comparative mapping of DNA markers from the familial Alzheimer disease and Down syndrome regions of human chromosome 21 to mouse chromosomes 16 and 17. *Proc Nat Acad Sci USA* 85 : 6032-6036 (1988).

Chomyn A, Martinuzzi A, Yoneda M, Daga A, Hurko O, Johns D, Lai ST, Nonaka I, Angelini C, Attardi G. MELAS mutation in mtDNA binding site for transcription termination factor causes defects in protein synthesis and in respiration but no change in levels of upstream and downstream mature transcript. *Proc Natl Acad Sci USA* 89 : 4221-4225 (1992).

Citron M, Wesaway D, Xia W, Carlson G, Diehl T, Lesvesque G, Johnson-Wood K, Lee M, Seubert P, Davis A, Kholodenko D, Moter R, Sherrington R, Perry B, Yao H, Strome R, Lieberburg I, Rommens J, Kim S, Schenk D, Fraser P, St George Hyslop P, Selkoe DJ. Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid β -protein in both transfected cells and transgenic mice. *Nature Med* 3 : 67-72 (1997).

Clayton DA. Structure and function of the mitochondrial genome. *J Inher Metab Dis* 15 : 439-447 (1992a).

Clayton DA. Transcription and replication of animal mitochondrial DNAs. *Int Rev Cytol* 141 : 217-232 (1992b).

Clayton DA, Doda JN, Friedberg EC. The absence of a pyrimidine dimer repair mechanisms in mammalian mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* 71 : 2777-2781 (1974).

Constantinidis J. Aspects génétique de la forme sporadique. In: *La maladie d'Alzheimer*, Ed MEDSI McGraw-Hill, p. 19-29 (1989).

Cooper CE, Nichols P, Freedman JA. Cytochrome c oxidase: structure, function, and membrane topology of the polypeptide subunits. *Biochem Cell Biol* 69 : 586-607 (1991).

Corder EH, Saunders AM, Risch NJ, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC jr, Rimmler JB, Locke PA, Conneally PM, Schmader KE, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA. Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset alzheimer disease. *Nature Genet* 7(2) : 180-184 (1994).

Corral-Debrinski M, Horton T, Lott MT, Schoffner JM, McKee AC, Beal MF, Graham BH, Wallace DC. Marked changes in mitochondrial DNA deletion levels in Alzheimer Brains. *Genomics* 23 : 471-476 (1994).

Corral-Debrinski M, Horton T, Lott MT, Schoffner JM, Beal FM, Wallace DC. Mitochondrial DNA deletions in human brain : regional variability and increase with advanced age. *Nature Genet* 2 : 324-339 (1992).

Cortopassi GA, Arnheim N. Detection of a specific mitochondrial DNA deletion in tissues of older humans. *Nucleic Acids Res* 18 : 6927-6933 (1990).

Cross CE, Halliwell B, Borish ET, Pryor WA, Ames BN, Saul RL, McCord JM, Harman D. Oxygen radicals and human disease. *Ann Intern Med* 107(4) : 526-45 (1987).

Csaszar A, Kalman J, Szalai C, Janka Z, Romics L. Association of the apolipoprotein A-IV codon 360 mutation in patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 230: 151-154 (1997).

Cummings JL, Benson DF. The role of the nucleus basalis of Meynert in dementia: Review and consideration. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 1 : 128-145 (1987).

Davis JN 2nd, Parker WD. Cytochrome c oxidase mutations in Alzheimer's disease are based on nDNA pseudogenes of recent evolutionary origin. *Biochem Biophys Res Commun* 244(3) : 877-883 (1998).

Davis RE, Miller S, Herrnstadt C, Ghosh SS, Fahy E, Shinobu LA, Galasko D, Thal LJ, Beal MF, Howell N, Parker WD. Mutations in mitochondrial cytochrome c oxidase genes segregate with late-onset Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 4526-4531 (1997).

Delacourte A, Robitaille Y, Sergeant N, Buée L, Hof PR, Wattez A, Laroche-Cholette A, Mathieu J, Chagnon P, Gauvreau D. Specific pathological Tau protein variants characterize Pick's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 55(2) : 159-168 (1996).

Delacourte A, Défossez A. Alzheimer's disease : Tau proteins, the promoting factors of microtubule assembly, are major components of paired helical filaments. *J Neurol Sci* 76 : 173-186 (1986).

Devasagayam TP, Steenken S, Obendorf MS, Schulz WA, Sies H. Formation of 8-hydroxy(deoxy)guanosine and generation of strand breaks at guanine residues in DNA by singlet oxygen. *Biochemistry* 30(25) : 6283-9 (1991).

Dickson DW. The pathogenesis of senile plaques. *J Neuropathol exp neurol* 56(4) : 321-339 (1997).

DiMauro S, Wallace DC. *Mitochondrial DNA in human Pathology*. New York, Raven Press (1993).

Dizdaroglu M. Chemical determination of free radical-induced damage to DNA. *Free Radic Biol Med* 10(3-4) : 225-242 (1991).

Eckert KA, Kunkel TA. DNA polymerase fidelity and the polymerase chain reaction. *PCR Methods Appl* 1 : 17-24 (1991).

Edland SD, Silvermann JM, Peskind ER, Tsuang D, Wijsman E, Morris JC. Increased risk of dementia in mothers of Alzheimer's disease cases: evidence for maternal inheritance. *Neurology* 47 : 254-256 (1996).

Elder G, Tezapsidis N, Carter J, Shinoi J, Bouras C, Li H, Johnston J, Efthimiopoulos S, Friedrich V, Robakis N. Identification and neuron specific expression of the S182/Presenilin I protein in human and rodent brains. *J Neurosci Res* 45 : 308-320 (1996).

Evans DA, Funkenstein HH, Albert MS, Scherr PA, Cook NR, Chown MJ, Hebert LE, Hennekens CH, Taylor JO. Prevalence of Alzheimer's disease in a community population of older persons. Higher than previously reported. *JAMA* 262 : 2551-2556 (1989).

Fisher RP, Lisowsky T, Parisi MA, Clayton DA. DNA wrapping and bending by a mitochondrial high mobility group-like transcriptional activator protein. *J Biol Chem* 267 : 3358-3367 (1992).

Fitch N, Becker R, Heller A. The inheritance of Alzheimer's disease. A new interpretation. *Ann Neurol* 23 : 14-19 (1988).

Fratiglioni L, Ahlbom A, Vitanen M, Winblad B. Risk factors for late-onset alzheimer's disease : a population-based case-control study. *Ann Neurol* 3 : 258-266 (1993).

Fukunaga M, Yielding KL. Fate during cell growth of yeast mitochondrial and nuclear DNA after photolytic attachment of the monoazide analog of ethidium. *Biochem Biophys Res Commun* 90(2) : 582-586 (1979).

Gelfand R, Attardi G. Synthesis and turnover of mitochondrial ribonucleic acid in HeLa cells: the mature ribosomal and messenger ribonucleic acid species are metabolically unstable. *Mol Cell Biol* 1 : 497-511 (1981).

German DC, White CL, Sparkman DR. Alzheimer's disease: neurofibrillary tangles in nuclei that project to cerebral cortex. *Neuroscience* 21: 305-312 (1987).

Giles RE, Blanc H, Cann HM, Wallace DC. Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 77 : 6715-6719 (1980).

Glenner GG, Wong CC. Alzheimer's disease : initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* 122 : 885-889 (1984).

Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra L, Haynes A, Irving N, James L, Mant R, Newton P, Rooke K, Roques P, Talbot C, Percak-Vance M, Roses A, Williamson R, Rossor M, Owen M, Hardy J. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 349 : 704-706 (1991).

Goldgaber D, Lerman MI, McBride OW, Saffiotti U, Gajdusek DC. Characterization and chromosomal localization of a cDNA encoding brain amyloid of Alzheimer's disease. *Science* 235 : 877-880 (1987).

Gsell W, Conrad R, Hickethier M, Sofic E, Frolich L, Wichart I, Jellinger K, Moll G, Ransmayr G, Beckmann H. Decreased catalase activity but unchanged superoxide dismutase activity in brains of patients with dementia of Alzheimer type. *J Neurochem* 64(3) : 1216-1223 (1995).

Gyllenstein U, Wharton D, Josefsson A, Wilson AC. Paternal inheritance of mitochondrial DNA in mice. *Nature* 352 : 255-257 (1991).

Halliwell B. Oxidants and human disease : some new concepts. *FASEB* 1(5) : 358-64 (1987).

Hauw JJ, Duyckaerts C, Delaère P, Lamy C. Maladie d'Alzheimer : de la neuropathologie aux symptômes. *Rev Prat (Paris)* 41(13) : 1188-1194 (1991).

Hensley K, Butterfield DA, Hall N, Cole P, Subramaniam R, Mark R, Mattson MP, Markesbery WR, Harris ME, Aksenov M, Wu JF, Carnay JM. Reactive oxygen species as causal agents in the neurotoxicity of the Alzheimer's disease-associated amyloid beta peptide. *Ann New York Acad Sci* 786 : 120-134 (1996).

Hirano M, Shtilbans A, Mayeux R, Davidson MM, DiMauro S, Knowles JA, Schon EA. Apparent mtDNA heteroplasmy in Alzheimer's disease patients and in normals due to PCR amplification of nucleus-embedded mtDNA pseudogenes. *Proc Natl Acad Sci USA* 94 : 14894-14899 (1997).

Holcomb L, Gordon MN, McGowan E, Yu X, Benkovic S, Jantzen P, Wright K, Saad I, Mueller R, Morgan D, Sanders S, Zehr C, O'Campo H, Hardy J, Prada CM, Eckman C, Younkin S, Hsiao K, Duff K. Accelerated Alzheimer-type phenotype in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin 1 transgenes. *Nat Med* 4(1) : 97-100 (1998)

Horton JC, Hubel DH. Regular patchy distribution of cytochrome oxidase staining in primary visual cortex of macaque monkey. *Nature* 292 : 762-764 (1981).

Houshmand M, Larsson NG, Holme E, Oldfors A, Tulinius MH, Andersen O. Automatic sequencing of mitochondrial tRNA genes in patients with mitochondrial encephalomyopathy. *Bioch Biophys Acta* 1226 : 49-55 (1994).

Hoyer S. Oxidative energy metabolism in Alzheimer brain. *Mol Chem Neuropathol* 16 : 207-224 (1992).

Hsieh RH, Hou JH, Hsu HS, Wei YH. Age-dependant respiratory function decline and DNA deletions in human muscle mitochondria. *Biochem Mol Biol Inter* 32(6) : 1009-1022 (1994).

Hu G, Thilly WG. Multi-copy nuclear pseudogenes of mitochondrial DNA reveal recent acute genetic changes in the human genome. *Curr Genet* 128(5) : 410-4 (1995).

Hubber G, Bailly Y, Martin JR, Mariani J, Brugg B. Synaptic β amyloide precursor proteins increase with learning capacity in rats. *Neurosci* 80 : 313-320 (1997).

Hutchin T, Cortopassi G. A mitochondrial DNA clone is associated with increased risk for Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 92 : 6892-6895 (1995).

Ito S, Ohta S, Nishimaki K, Kagawa Y, Soma R, Kuno SY, Komatsuzaki Y, Mizusawa H, Hayashi J. Functional integrity of mitochondrial genomes in human platelets and autopsied brain tissues from elderly patients with Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 96(5) : 2099-2103 (1999).

Jaehning JA. Mitochondrial transcription : is a pattern emerging. *Mol Microbiol* 8 : 1-4 (1993).

Jenner P, Dexter DT, Sian J, Schapira AH, Marsden CD. Oxidative stress as a cause of nigral cell death in Parkinson's disease and incidental Lewy body disease. The Royal Kings and Queens Parkinson's Disease Research Group. *Ann Neurol* 32 Suppl : S82-87 (1992).

Johns DR, Neufeld MJ. Cytochrome b mutations in Leber hereditary optic neuropathy. *Biochem Biophys Res Commun* 181 : 1358-1364 (1991).

Kadenbach B, Munscher C, Frank V, Muller-Hocker J, Napiwotzki J. Human aging is associated with stochastic somatic mutations of mitochondrial DNA. *Mutat Res* 338(1-6) : 161-172 (1995).

Kadenbach B, Schneyder B, Mell O, Stroh S, Reimann A. Respiratory chain proteins. *Rev Neurol* 147(6-7) : 436-442 (1991).

Kadenbach B, Kuhn-Nentwig L, Buge U. Evolution of a regulatory enzyme: cytochrome c oxidase (complex IV). *Curr Top Bioenerg* 15 : 113-161 (1987).

Kang J, Lemaire HG, Unterback A, Salbaum JM, Masters CL, Grezeschik KH, Multhaup G, Beyreuther K, Mer-Hill B. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 325 : 733-736 (1987).

Kish SJ, Bergeron C, Rajput A, Dozic S, Mastrogiacomo F, Chang LJ, Wilson JM, DiStefano LM, Nobrega JN. Brain cytochrome oxidase in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 59 (2) : 776-779 (1992).

Kovacs DM, Faussett HJ, Page KJ, Kim TW, Moir RD, Merriam DE, Hollister RD, Hallmark OG, Mancini R, Felsenstein KM, Hyman BT, Tanzi RE, Wasco W. Alzheimer-associated presenilins 1 and 2: Neuronal expression in brain and localization to intracellular membranes in mammalian cells. *Nature Med* 2 : 224-229 (1996).

Ksiezak-Reding H, Liu WK, Yen SH. Phosphate analysis and dephosphorylation of modified tau associated with paired helical filaments. *Brain Res* 597(2) : 209-219 (1992).

Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis, version 1.0. The Pennsylvania State University, University Park, PA 16802 (1993).

Kunkel TA, Loeb LA. Fidelity of mammalian DNA polymerase. *Science* 213 : 765-768 (1981).

L'Abbé D, Duhaime JF, Lang B, Morais R. The transcription of DNA in chicken mitochondria initiated from one major bidirectional promoter. *J Biol Chem* 266(10) : 10844-10850 (1991).

Lee HC, Wei YH. Mutation and oxidative damage of mitochondrial DNA and defective turnover of mitochondria in human Aging. *J Formos Med Assoc* 96 : 770-778 (1997).

Lee HC, Pang CH, Hsu HS, Wei YH. Differential accumulations of 4977 bp deletion in mitochondrial DNA of various tissues in human ageing. *Bioch Biophys Acta* 1226 : 37-43 (1994).

Lehtovirta M, Soininen H, Helisalmi S, Mannermaa A, Helkala EI, Hartikainen T, Ryyanen M, Riekkinen PJ. Clinical and neuropsychological characterisation in familial and sporadic Alzheimer's disease: relation to apolipoprotein E polymorphism. *Neurology* 46(2) : 413-419 (1996).

Levy-Lahad E, Wijsman EM, Nemens E, Anderson L, Goddar KA, Weber JL, Bird TD, Schellenberg GD. A familial Alzheimer's disease locus on chromosome 1. *Science* 269 : 970-973 (1995).

Lin FH, Lin R, Wisniewski HM, Hwang TW, Grundke-Iqbal I, Haely-Louie G, Iqbal K. Detection of point mutation in codon 331 of mitochondrial NADH dehydrogenase subunit 2 in Alzheimer's brains. *Biochem Biophys Res Comm* 182(1) : 238-246 (1992).

Linnane AW, Baumer A, Maxwell RJ, Preston H, Zhang c, Marzuki S. Mitochondrial gene mutation : The aging process and degenerative diseases. *Biochem Int* 22 : 1067-1076 (1990).

Lovell MA, Ehmann WD, Butler SM, Markesbery WR. Elevated thiobarbituric acid-reactive substances and antioxidant enzyme activity in the brain in Alzheimer's disease. *Neurology* 45(8) : 1594-1601 (1995).

Mahler ME, Cummings JL. Alzheimer disease and the dementia of Parkinson disease : Comparative investigations. *Alzheimer Disease and Associated Disorders* 4(3) : 133-149 (1990).

Mahley RW. Apolipoprotein E : cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* 240 : 622-630 (1988).

Manelli AM, Puttfarcken PS. Beta-Amyloid-induced toxicity in rat hippocampal cells: in vitro evidence for the involvement of free radicals. *Brain Res Bull* 38(6) : 569-76 (1995).

Markesbery WR. Neuropathological criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging* 18 : S13-S19 (1997).

Mattila P, Korpela J, Tenkanen T, Pitkanen K. Fidelity of DNA synthesis by the *Thermococcus litoralis* DNA polymerase-an extremely heat stable enzyme with proofreading activity. *Nucleic Acids Res* 19: 4967-4973 (1991).

Maurer I, Zierz S, Möller HJ, Jerusalem F. Cytochrome c oxidase in Alzheimer's disease. *Neurology* 45 : 1423 (1995).

McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease : report of the NINCDS-ADRDA work group under the auspices of department of health and human services task force on Alzheimer's disease. *Neurology* 34 : 939-944 (1984).

Mecocci P, Beal MF, Cecchetti R, Polidori MC, Cherubini A, Chionne F, Avellini L, Romano G, Senin U. Mitochondrial membrane fluidity and oxidative damage to mitochondrial DNA in aged and AD human brain. *Mol Chem Neuropathol* 31(1) : 53-64 (1997).

Mecocci P, MacGarvey U, Beal F. Oxidative damage to mitochondrial DNA is increased in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 36 : 747-751 (1994).

Mecocci P, MacGarvey U, Kaufman AE, Koontz D, Shoffner JM, Wallace DC, Beal MF. Oxidative damage to mitochondrial DNA shows marked age-dependent increases in human brain. *Ann Neurol* 34(4) : 609-616 (1993).

Mehta ND, Refolo LM, Eckman C, Sanders S, Yager D, Perez-Tur J, Younkin S, Duff K, Hardy J, Hutton M. Increased A β 42(43) from cell lines expressing presenilin 1 mutations. *Ann Neurol* 43(2) : 256-258 (1998).

Miquel J. An update on the oxygen stress-mitochondrial mutation theory of aging: genetic and evolutionary implications. *Exp Gerontol* 33 : 113-126 (1998).

Miquel J. An integrated theory of aging as the result of mitochondrial DNA mutation in differentiated cells. *Arch Gerontol Geriatr* 12 : 99-117 (1991).

Montoya J, Gaines G, Attardi G. The pattern of transcription of the human mitochondrial rRNA genes reveals two overlapping transcription units. *Cell* 34 : 151-159 (1983).

Montoya SE, Aston CE, DeKosky ST, Kamboh MI, Lazo JS, Ferrell RE. Bleomycin hydrolase is associated with risk of sporadic Alzheimer disease. *Nat Genet* 18 : 211-212 (1998).

Morgan-Hughes JA, Sweeney MG, Cooper JM, Hammans SR, Brockington M, Schapira AHV, Harding AE, Clark JB. Mitochondrial DNA (mtDNA) diseases: correlation of genotype to phenotype. *Bioch Biophys Acta* 1271 : 135-140 (1995).

Mori H, Kondo J, Ihara Y. Ubiquitine is a component of paired helical filament in Alzheimer's disease. *Science* 235 : 1641-1644 (1987).

Mucke L, Masliah A, Johnson WB, Ruppe MD, Alford M, Rocenstein EM, Forss-Petter S, Pietropaolo M, Mallory M, Abraham CR. Synaptotrophique effects of human amyloid β protein precursors in the cortex of transgenic mice. *Brain Res* 666 : 151-157 (1994).

Mullan M. A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of β -amyloid. *Nature Genet* 1 : 345-347 (1992).

Murphy WI, Attardi B, Tu C, Attardi G. Evidence for complete symmetrical transcription in vivo of mitochondrial DNA in Hela Cells. *J Mol Biol* 99 : 809-814 (1975).

Murrel J, Farlow M, Ghetti B, Benson MD. A mutation in the amyloid precursor protein associated with hereditary Alzheimer's disease. *Science* 254 : 97-99 (1991).

Mutisya EM, Bowling AC, Beal MF. Cortical cytochrome oxidase activity is reduced in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 63(6) : 2179-2184 (1994).

Nakano K, Ohta S, Nishimaki K, Miki T, Matuda S. Alzheimer's disease and DLST genotype. *The Lancet* 350 : 1367-1368 (1997).

Nee LE, Eldridge R, Sunderland T, Thomas CB, Katz D, Thompson KE, Weingartner H, Weiss H, Julian C, Cohen R. Dementia of the Alzheimer type : clinical and family study of 22 twin pairs. *Neurology* 37 : 359-363 (1987).

Neve RL, Harris P, Kosik KS, Kurnit DM, Doulon TA. Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein 2. *Mol Brain Res* 1 : 271-280 (1986).

Ohsawa I, Kohsaka. La protéine précurseur de l'amyloïde favorise-t-elle la poussée neuritique. *Alzheimer Actualités* 129 : 8-10 (1998).

Ozawa T. Mechanism of somatic mitochondrial DNA mutation associated with age and diseases. *Bioch Biophys Acta* 1271 : 177-189 (1995).

Ozawa T. Mitochondrial DNA mutations associated with aging and degenerative diseases. *Exp gerontol* 30 : 269-290 (1995b).

Parisi MA, Clayton DA. Similarity of human mitochondrial transcription factor 1 to high mobility group proteins. *Science* 252 : 965-969 (1991).

Parker WD, Parks J. Cytochrome c oxidase in Alzheimer's disease brain: Purification and characterization. *Neurology* 45 : 482-486 (1995).

Parker WD, Parks J, Filley CM, Kleinschmidt-DeMasters BK. Electron transport chain defects in Alzheimer's disease brain. *Neurology* 44 : 1090-1096 (1994).

Parker WD, Filley CM, Parks JK. Cytochrome oxidase deficiency in Alzheimer's disease. *Neurology* 40 : 1302-1303 (1990).

Partridge RS, Munroe SM, Parks JK, Johnson K, Parker WD Jr, Eaton GR, Eaton SS. Spin trapping of azidyl and hydroxyl radicals in azide-inhibited rat brain submitochondrial particles. *Arch Biochem Biophys* 310 : 210-217 (1994).

Pérez-Tur J, Campion D, Martinez M, Brice A, Tardieu S, Hannequin D, Agid Y, Delacourte A, Clerget-Darpoux F, Chartier Harlin MC. Evidence for APOE e4 association in early-onset Alzheimer's disease patients with late onset relatives. *Am J Med Genet* 60 : 550-553 (1995).

Pericak-Vance MA, Bebout JL, Gaskell PC, Yamaoka LH, Hung WY, Alberts MH, Walker AP, Barlett RJ, Haynes CA, Welsh A, Earl NL, Heyman AL, Clark CM, Roses AD. Linkage studies in familial Alzheimer's disease : evidence for chromosome 19 linkage. *Am J Hum Genet* 48 : 1034-1050 (1991).

Perna NT, Kocher TD. Mitochondrial DNA : molecular fossils in the nucleus. *Curr Biol* 6(2) : 128-9 91996).

Perry G, Smith MA. Senile plaques and neurofibrillary tangles : what role do they play in Alzheimer disease ? *Clin Neurosci* 1 : 199-203 (1993)

Pettepher CC, Ledoux SP, Bohr VA, Wilson GL. Repair of alkali-labile sites within the mitochondrial DNA of Rnr 38 cells after exposure to the nitrosourea streptozotocin. *J Biol Chem* 266 : 3113-3117 (1991).

Petruzzella V, Chen X, Schon EA. Is a point mutation in the mitochondrial ND2 gene associated with Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Comm* 186(1) : 491-497 (1992).

Poirier J. Apolipoprotein E4, cholinergic integrity and the pharmacogenetics of Alzheimer's disease. *J Psychiatry Neurosci* 24(2) : 147-153 (1999).

Poirier J, Davignon J, Bouthillier D, Kogan S, Bertrand P, Gauthier S. Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer's disease. *Lancet* 342(8873) : 697-699 (1993).

Price DL, Altschuler RJ, Struble RG, Casanova MF, Cork LC, Murphy DB. Sequestration of tubulin in neurons in Alzheimer's disease. *Brain Res* 385(2) : 305-310 (1986).

Raiha I, Kaprio J, Koskenvuo M, Rajala T, Sourander L. Alzheimer's disease in Finnish twins. *Lancet* 347(9001) : 573-578 (1996).

Rapoport S, Pettigrew K, Schapiro M. Discordant and concordance of dementia of the Alzheimer type (DAT) in monozygotic twins indicate heritable and sporadic forms of Alzheimer's disease. *Neurology* 41 : 1549-1553 (1991).

Rapoport SI, Schapiro MB. Discordance and concordance of Alzheimer's disease (AD) in monozygotic twins indicate two mode of transmission. *Neurosci Abstr* 16 : 149 (1990).

Rogaev EI, Sherrington R, Rogaev EA, Levesque G, Ikeda M, Liang Y, Chi H, Lin C, Holman K, Tsuda T, Mar L, Sorbi S, Nacmias B, Placentini S, Amaducci L, Chumakov I, Cohen D, Lannfelt L, Fraser PE, Rommens JM, St George-Hyslop PH. Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature* 376 : 775-778 (1995).

Rouleau GA, Clark AW, Rooke K, Pramatarova A, Krizus A, Suchowersky O, Julien JP, Figlewicz D. SOD1 mutation is associated with accumulation of neurofilaments in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 39(1) : 128-131 (1996).

Sano M, Ernesto C, Thomas RG, Klauber MR, Schafer K, Grungman M, Woodbury P, Growdon J, Cotman CW, Pfeiffer E, Scheider LS, Thal L. A controlled trial of selegiline, alpha-tocopherol, or both as treatment for Alzheimer's disease. The Alzheimer's Disease Cooperative Study. *N Engl J Med* 336 : 1216-1222 (1997).

Saraiva AA, Borges MM, Madeira MD, Travers MA, Paula-Barbosa MM. Mitochondrial abnormalities in cortical dendrites from patients with Alzheimer's disease. *J Submicrosc Cytol* 17 : 459-464 (1985).

Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel W, St Georges-Hyslop P, Pericak-Vance MA, Roses AD. Association of apolipoprotein allele E4 with late-onset Alzheimer's disease. *Neurology* 43 : 1467-1472 (1993).

Schafer L, Thorling EB. Lipid peroxidation and antioxidant supplementation in old age. *Scand J Clin Lab Invest* 50(1) : 69-75 (1990).

Schapira AHV. Mitochondrial cytopathies. *Curr Opin Neurobiol* 3: 760-767 (1993).

Schellenberg GD, Payami H, Wijsman EM, Orr HT, Goddard KA, Anderson L, Nemens E, White JA, Alonso ME, Ball MJ. Chromosome 14 and late-onset familial Alzheimer disease (FAD). *Am J Hum Genet* 53(3) : 619-628 (1993).

Schellenberg GD, Bird TD, Wijsman EM, Orr HT, Anderson L, Nemens E, White JA, Bonnycastle L, Weber JL, Alonso E, Potter H, Heston LL, Martin GM. Genetic linkage evidence for a familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14. *Science* 258 : 668-671 (1992).

Schellenberg GD, Anderson L, O'Dahl S, Wisjman EM, Sadovnick AD, Ball MJ, Larson EB, Kukull WA, Martin GM, Roses AD, Bird TD. APP 717, APP 693 and PRIP gene mutations are rare in Alzheimer's disease. *Am J Hum Genet* 49 : 511-517 (1991).

Schellenberg GD, Bird TD, Wijsman EM, Moore DK, Boehnke M, Bryant EM, Lampe TH, Nochlin D, Sumi SM, Deeb SS, Beyreuther K, Martin GM. Absence of linkage of chromosome 21q21 markers to familial Alzheimer's disease. *Science* 241 : 1507-1510 (1988).

Scheltens P, Vermersch P, Leys D. Hétérogénéité de la maladie d'Alzheimer. *Rev Neurol* 149 : 14-25 (1993).

Scherrer B. *Biostatistique*. Gaëtan Morin Éditeur, Québec, Canada, (1984).

Sciaccio M, Bonilla E, Schon EA, DiMauro S, Moraes CT. Distribution of wild-type and common deletion forms of mtDNA in normal and respiration-deficient muscle fibers from patients with mitochondrial myopathy. *Hum Mol Genet* 3 : 13-19 (1994).

Schon EA, Hirano M, DiMauro S. Mitochondrial encephalomyopathies: clinical and molecular analysis. *J Bioenerget Biomembr* 26(3) : 291-299 (1994).

Schon EA, Rizzuto R, Moraes CT, Nakase H, Zeviani M, Dimauro S. A direct repeat is a hotspot for large-scale deletion of human mitochondrial DNA. *Science* 244 : 346-249 (1989).

Shadel GS, Clayton DA. Mitochondrial transcription initiation. Variation and conservation. *J Biol Chem* 268 : 16083-16086 (1993).

Sherratt HSA. Mitochondria: structure and function. *Rev Neurol* 14 (6-7) : 417-430 (1991).

Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Chi H, Lin C, Holman K, Tsuda T, Mar L, Foncin JF, Bruni AG, Montesi MP, Sorbi S, Rainero I, Pinessi L, Nee L, Chumakov, Pollen D, Brookes A, Sanseau P, Polinsky RJ, Wasco W, Da Silva HAR, Haines JL, Pericak-Vances MA, Tanzi RE, Roses AD, Fraser PE, Rommens JM, St George-Hyslop PH. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 375 : 754-760 (1995).

Shigenaga MK, Ames BN. Assays for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine : a biomarker of in vivo oxidative DNA damage. *Free Radic Biol Med* 10(3-4) : 211-6 (1991).

Shoffner JM, Brown MD, Torroni A, Lott MT, Cabell MF, Mirra SS, Beal F, Yang CC, Gearing M, Salvo R, Watts RL, Juncos JL, Hansen LA, Crain BJ, Fayad M, Reckord CL, Wallace DC. Mitochondrial DNA variants observed in Alzheimer disease and Parkinson disease patients. *Genomics* 17 : 171-184 (1993).

Shoffner JM, Wallace DC. Mitochondrial genetics: principles and practice. *Am J Hum Genet* 51(6) : 1179-1186 (1992).

Shoffner JM, Wallace DC. Oxidative phosphorylation diseases. Disorders of two genomes. *Adv Hum Genet* 19 : 267-330 (1990).

Simonetti S, Chen X, DiMauro S, Schon EA. Accumulation of deletions in human mitochondrial DNA during normal aging: analysis by quantitative PCR. *Bioch Biophys Acta* 1180 : 113-122 (1992).

Simonian NA, Coyle JT. Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 36 : 83-106 (1996).

Simonian NA, Hyman BT. Functional alterations in Alzheimer's disease : Selective loss of mitochondrial-encoded cytochrome oxidase mRNA in the hippocampal formation. *J Neuropathol Exp Neurol* 53(5) : 508-512 (1994).

Simonian NA, Hyman BT. Functional alterations in Alzheimer's disease : Diminution of cytochrome oxidase in the hippocampal formation. *J Neuropathol Exp Neurol* 52(6) : 580-585 (1993).

Sims NR, Finegan JM, Blass JP. Altered glucose metabolism in fibroblasts from patients with Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 313 : 638-639 (1985).

Sims NR, Bowen DM, Neary D, Davison AN. Metabolic processes in Alzheimer's disease: adenosine nucleotide content and production of $^{14}\text{CO}_2$ from [l- ^{14}C] glucose in vitro in human cortex. *J Neurochem* 41 : 1329-1334 (1983).

Smith CD, Carney JM, Starke-Reed PE, Oliver CN, Stadtman ER, Floyd RA, Markesbery WR. Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 88(23) : 10540-10543 (1991).

Smith MA, Sayre LM, Monnier VM, Perry G. Radical AGEing in Alzheimer's disease. *TINS* 18(4) : 172-6 (1995).

Soong NW, Hinton DR, Cortopassi G, Arnheim N. Mosaicism for a specific somatic mitochondrial DNA mutation in adult human brain. *Nature Genet* 2 : 318-323 (1992).

St George-Hyslop P, Haines J, Rogaev E, Mortilla M, Vaula G, Pericak-Vance M, Foncin JF, Montesi M, Bruni A, Sorbi S, Rainero I, Pinessi L, Pollen D, Polinsky R, Nee L, Kennedy J, Marccardi F, Rogaeva E, Liang Y, Alexandrova N, Lukiw W, Schlumpf K, Tanzi R, Tsuda T, Farrer L, Cantu JM, Duara R, Amaducci L, Bergamini L, Gusella J, Roses A, Mclachlan C. Genetic evidence for a novel familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14. *Nature Genet* 2 : 330-334 (1992).

St George-Hyslop PH, Tanzi RE, Polinsky RJ, Haines JL, Nee L, Watkins PC, Myers RH, Feldman RG, Pollen D, Drachman D, Growdon J, Bruni A, Foncin JF, Salmon D, Frommelt P, Amaducci L, Sorbi S, Piacentini S, Stewart GD, Hobbs WJ, Conneally PM, Gusella JF. The genetic defect causing familial Alzheimer's disease maps on chromosome 21. *Science* 235 : 885-889 (1987).

Sternberg D, Danan C, Lombes A, Laforet P, Girodon E, Goossens M, Amselem S. Exhaustive scanning approach to screen all the mitochondrial tRNA genes for mutations and its application to the investigation of 35 independent patients with mitochondrial disorders. *Hum Mol Genet* 7(1) : 33-42 (1998).

Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS, Roses AD. Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 90(5) : 1977-1981 (1993).

Tanzi RE, Kovacs DM, Kim TW, Moir RD, Guenette Y, Wasco W. The presenilin genes and their role in early-onset familial Alzheimer's disease. *Alzh Dis Rev* 1 : 90-98 (1996).

Terry RD, Wisniewski HM. Ultrastructure of senile dementia and of experimental analogs. In: Gaitz CM, ed. *Aging and the brain*. New York: Plenum Press, p. 89-116 (1972).

Terry RD, Peck A, DeTeresa R, Schechter R, Horoupian DS. Some morphometric aspects of the brain in senile dementia of the Alzheimer type. *Ann Neurol* 10 : 184-192 (1981).

The Canadian Study of Health and Aging: Risk factors for Alzheimer's disease in Canada. *Neurology* 44 : 2073-2080 (1994).

Tomita T, Maruyama K, Saido TC, Kume H, Shinozaki K, Tokuhira S, Capell A, Walter J, Grünberg J, Haass C, Iwatsubo T, Obata K. The presenilin 2 mutation (N141I) linked to familial Alzheimer disease (Volga German families) increases the secretion of amyloid beta protein ending at the 42nd (or 43rd) residue. *PNAS* 94 : 2025-2030 (1997).

Tomkinson AE, Bonk RT, Bartfeld JK, Linn S. Mammalian mitochondrial endonuclease activities specific for ultraviolet-irradiated DNA. *Nucl Acids Res* 18 : 929-935 (1990).

Tzagoloff A, Wharton DC. Studies on the electron transfer system. LXII. The reaction of cytochrome oxidase with carbon monoxide. *J Biol Chem* 240 : 2628-2633 (1965).

Urakami K, Sato K, Okada A, Mura T, Shimomura T, Takenaka Y, Wakutani Y, Oshima T, Adachi Y, Takahashi K. CU, Zn superoxide dismutase in patients with dementia of the Alzheimer type. *Acta Neurol Scandinav* 91(3) : 165-168 (1995).

Van Broeckhoven C, Backhovens H, Cruts M, De Winter G, Bruylant M, Cras P, Martin JJ. Mapping of a gene predisposing to early-onset Alzheimer's disease to chromosome 14q24.3 *Nature Genet* 2 : 335-339 (1992).

Van Duijn CM, Farrer LA, Cuppels LA, Hofman A. Genetic transmission of Alzheimer's disease among families in a Dutch population based study. *J Med Genetics* 30 : 640-646 (1993).

Van Duijn CM, Clayton D, Chandra V. Familial aggregation of Alzheimer's disease and related disorder : a collaborative reanalysis of case-control studies. *Int J Epidemiol* 20 : S13 (1991).

Van Zuylen AJ, Bosman G, Ruitenbeek W, Van Kalmthout PJC, De Grip WJ. No evidence for reduced thrombocyte cytochrome oxidase activity in Alzheimer disease. *Neurology* 42 : 1246-1247 (1992).

Vermersch P, Robitaille Y, Bernier L, Warrez A, Gauvreau D, Delacourte A. Biochemical mapping of neurofibrillary degeneration in a case of progressive supranuclear palsy: evidence for general cortical involvement. *Acta Neuropathol* 87 : 572-577 (1994).

Virbasius JV, Scarpulla RC. Activation of the human mitochondrial transcription factor A gene by nuclear respiratory factors: A potential regulatory link between nuclear and mitochondrial gene expression in organelle biogenesis *Proc Natl Acad Sci USA* 91 : 1309-13 (1994).

Wallace DC. Mitochondrial DNA mutations in disease of energy metabolism. *J Bioenerg Biomembr* 26(3) : 241-250 (1994).

Wallace DC. Diseases of the mitochondrial DNA. *Ann Rev Biochem* 61 : 1175-1212 (1992a).

Wallace DC. Mitochondrial genetics : A paradigm for aging and degenerative diseases? *Science* 256 : 628-632 (1992b).

Wallace DC, Stuard C, Murdock D, Schurr T, Brown MD. Ancient mtDNA sequences in the human nuclear genome: A potential source of errors in identifying pathogenic mutations. *Proc Natl Acad Sci USA* 94 : 14900-14905 (1997).

Wallace DC, Shoffner JM, Trounce I, Brown MD, Ballinger SW, Corral-Debrinski M, Horton T, Jun AS, Lott MT. Mitochondrial DNA mutations in human degenerative disease and aging. *Bioch Biophys Acta* 1271 : 141-151 (1995).

Wei YH. Oxidative stress and mitochondrial DNA mutations in human aging. *Proc Soc Exp Biol Med* 217 : 53-63 (1998).

Wolozin B, Alexander P, Palacino J. Regulation of Apoptosis by presenilin 1. *Neurobiol Aging* 19 : S23-S27 (1998).

Wong-Riley MT. Cytochrome oxidase: an endogenous metabolic marker for neuronal activity. *Trends Neurosci* 12 : 94-101 (1989).

Wong-Riley MT. Changes in the visual system of monocularly sutured or enucleated cats demonstrable with cytochrome oxidase histochemistry. *Brain Res* 171 : 11-28 (1979).

Wong-Riley MT, Walsh SM, Leake-Jones PA, Merzenich M. Maintenance of neuronal activity by electrical stimulation of unilaterally deafened cats

demonstrable with cytochrome oxidase technique. *Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl* 90 : 30-32 (1981).

Wragg MA, Talbot CJ, Morris JC, Lenden CL, Goate AM. No association found between Alzheimer's disease and a mitochondrial tRNA glutamine gene variant. *Neurosci Lett* 201(2) : 107-110 (1995).

Zhou Y, Richardson JS, Mombourquette MJ, Weil JA. Free radical formation in autopsy samples of Alzheimer and control cortex. *Neurosci Lett* 195(2) : 89-92 (1995).

**Annexe I. Nature et position des mutations somatiques détectées dans les clones
Alzheimers et témoins.**

Sujets	Positions	A.A.	Séquences
9133	9145	Ala-Thr	ctgtc G/A cctta
	9155	Gln-Leu	aatcc A/T agcct
	9167	Délétion (1n)	cgttt T/: cacat
	9175	Délétion (1n)	cactt C/: tagta
	9177	Leu-Leu	cttct A/G gtaag
	9202	Thr-Ala	acaac A/G cataa
	9220	Ser-Leu	ccaat C/T acatg
	9253	Thr-Stop	cccat G/A acccc
	9262	Thr-Ile	cctaa C/T agggg
	9315	Phe-Ile	ttcac T/A tccac
	9408	Gln- Stop	catac C/T aaggc
	9439	Gly-Asp	aaaag G/A ccttc
	9506	Ala-Ala	tgagc C/G ttta
	9506	Ala-Ala	tgagc C/A ttta
	9521	Ser-Ser	tccag C/T ctagc
	9623	Ala-Ala	ctcgc A/T tcagg
	9687	Gln- Stop	taatt C/T aagca
	9688	Gln-Arg	aattc A/G agcac
9711	Leu-Leu	tttta C/T tgggt	
8801	9141	Ala-Ala	atcgc T/A gtcgc
	9141	Ala-Ala	atcgc T/A gtcgc
	9196	Asp-Tyr	tgcac G/T acaac
	9270	Leu-Ile	gggcc C/A tctca
	9344	Gly-Gly	ctagg C/T ctact
	9380	Trp-Trp	tgatg G/A cgcga
	9386	Asp-Glu	cgcga A/T gtaac
	9396	Gly-Lys	cacga G/A aaagc
	9396	Gly-Lys	cacga G/A aaagc
	9449	Tyr-Tyr	cgata C/T gggat
	9470	Thr-Thr	attac C/A tcaga
	9510	Délétion (1n)	ccttt T/: accac
	9536	Pro-Pro	acccc C/A caatt
	9537	Gln- Stop	ccccc C/T aatta
	9554	Trp-trp	cactg G/A ccccc
	9558	Pro-Thr	ggccc C/A caaca
	9572	Thr-Thr	atcac C/T ccgct
	9720	Tyr-His	gtctc T/C atttt

Sujets	Positions	A.A.	Séquences
9114	9162	Tyr-Tyr	gccta C/T gttt
	9174	Leu-Leu	acact T/A ctagt
	9179	Val-Ala	tctag T/C aagcc
	9270	Leu-Ile	gggcc C/A tctca
	9449	Tyr-Tyr	cgata C/T gggat
	9548	Gly-Gly	ggagg G/A cactg
	9563	Thr-Thr	ccaac A/T ggcat
	9569	Ile-Ile	ggcat C/T acccc
	9569	Ile-Ile	ggcat C/T acccc
	9606	Thr-Ser	taaac A/T catcc
	9644	Trp-Trp	acctg A/G gctca
	9645	Ala-Thr	cctga G/A ctcac
	9682	Ile-Lys	ccaaa T/A aattc
9428	9276	Ala-Thr	tctca G/A coctc
	9389	Val-Val	gatgt A/G acacg
	9584	Pro-Pro	aatcc C/A ctaga
9429	9169	Thr-Ala	tttcc A/G cactt
	9327	Délétion (1n)	ccata A/: cgctc
	9384	Asp-Asn	ggcgc G/A atgta
	9470	Thr-Thr	attac C/A tcaga
	9470	Thr-Thr	attac C/A tcaga
	9514	His-Leu	ttacc A/T ctcca
	9545	Gly-Gly	ttagg G/A gggca
9556	Pro-His	ctggc C/A cccaa	
CT-18	9145	Ala-Thr	ctgtc G/A cctta
	9171	Thr-Thr	ttcac A/G cttct
	9176	Leu-Pro	acttc T/C agtaa
	9192	Leu-Leu	tacct G/A cacga
	9192	Leu-Leu	tacct G/A cacga
	9226	Ala-Asp	acatg C/A ctatc
	9343	Gly-Asp	actag G/A cctac
	9346	Leu-Pro	aggcc T/C actaa
	9413	Gly-Gly	caagg C/A cacca
	9452	Gly-Gly	tacgg G/A ataata
	9546	Gly- Stop	tagga G/A ggcac
	9600	Leu-leu	cactc C/T taaac

Sujets	Positions	A.A.	Séquences
CT-8	9413	Gly-Gly	caagg C/A cacca
	9413	Gly-Gly	caagg C/A cacca
	9413	Gly-Gly	caagg C/A cacca
	9439	Gly-Asp	aaaag G/A ccttc
	9490	Ala-Val	cttcg C/T aggat
	9557	Pro-Pro	tggcc C/T ccaac
CT-16	9170	Thr-Ile	tttca C/T acttc
	9170	Thr-Ile	tttca C/T acttc
	9209	Met-Ile	ataat G/T accca
	9212	Thr-Thr	atgac C/A cacca
	9212	Thr-Thr	atgac C/A cacca
	9313	His-Leu	atttc A/T ctcc
	9394	Arg-Leu	aacac G/T agaaa
	9424	Pro-Leu	cacac C/T acctg
	9432	Gln-Lys	ctgtc C/A aaaaa
	9520	Ser-Ile	ctcca G/T cctag
	9533	Thr-Thr	cctac C/A cccca
	9553	Trp-Leu	gcact G/T gcccc
	9555	Pro-Ser	actgg C/T cccca
9583	Pro-Leu	aaatc C/T cctag	
CT-12	9173	Leu-Pro	cacac T/C tctag
	9174	Leu-Leu	acact T/A ctagt
	9199	Asn-Asp	acgac A/G acaca
	9220	Ser-Leu	ccaat C/T acatg
	9233	His-Gln	tatca T/A atagt
	9270	Leu-Ile	gggcc C/A tctca
	9301	Ala-Val	cctag C/T catgt
	9317	Phe-Phe	cactt C/T cactc
	9389	Val-Val	gatgt A/G acacg
	9413	Gly-Gly	caagg C/A aaggc
	9510	Délétion (1n)	ccttt T/ accac
	9514	His-Leu	ttacc A/T ctcca
	9542	Leu-Leu	caatt A/G ggagg
	9575	Pro-Pro	acccc G/A ctaaa
	9575	Pro-Pro	acccc G/A ctaaa
	9626	Ser-Ser	gcatc A/G ggagt
	9682	Ile-Lys	ccaaa T/A aattc
9712	Leu-Pro	tttac T/C gggtc	

Sujets	Positions	A.A.	Séquences
CT-11	9142	Val-Ile	tcgct G/A tcgcc
	9167	Délétion (1n)	cgttt T/: cacat
	9177	Leu-Leu	ttcta G/A taagc
	9177	Leu-Leu	ttcta G/A taagc
	9177	Leu-Leu	ttcta G/A taagc
	9219	Ser-Thr	accaa T/A cacat
	9277	Ala-Val	ctcag C/T cctcc
	9301	Ala-Val	cctag C/T catgt
	9329	Thr-Thr	ataac G/T ctctt
	9329	Thr-Thr	ataac G/T ctctt
	9389	Val-Val	gatgt A/G acacg
	9402	Thr-Pro	aaagc A/C catac
	9585	Leu-Leu	atccc C/T tagaa
9663	Glu-Stop	taata G/T aaaac	

Annexe II. Électrophorégrammes représentant les 17 réactions de séquences nécessaires pour couvrir les 22 ARNt et les trois gènes CO de l'ADNmt d'un seul individu.

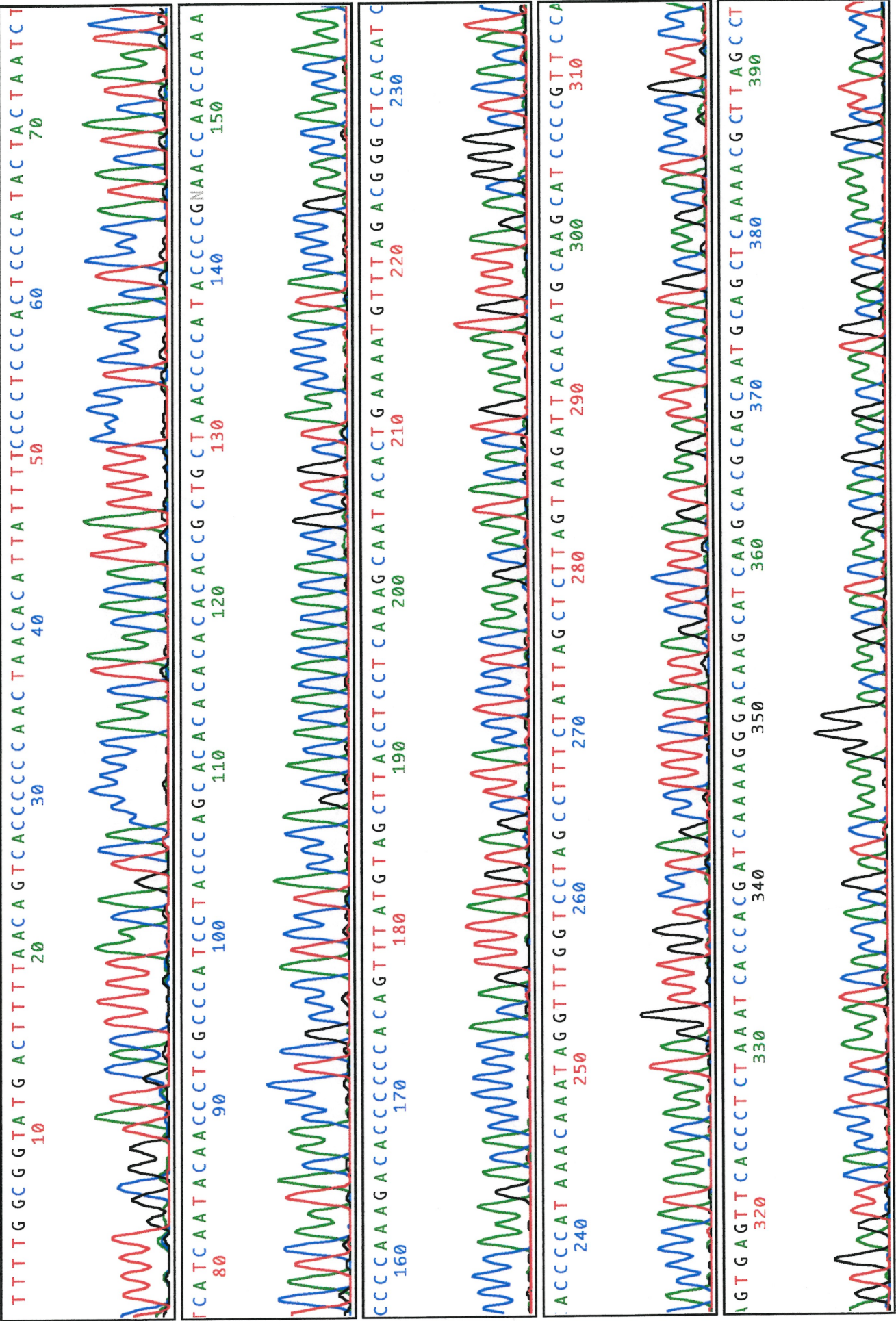


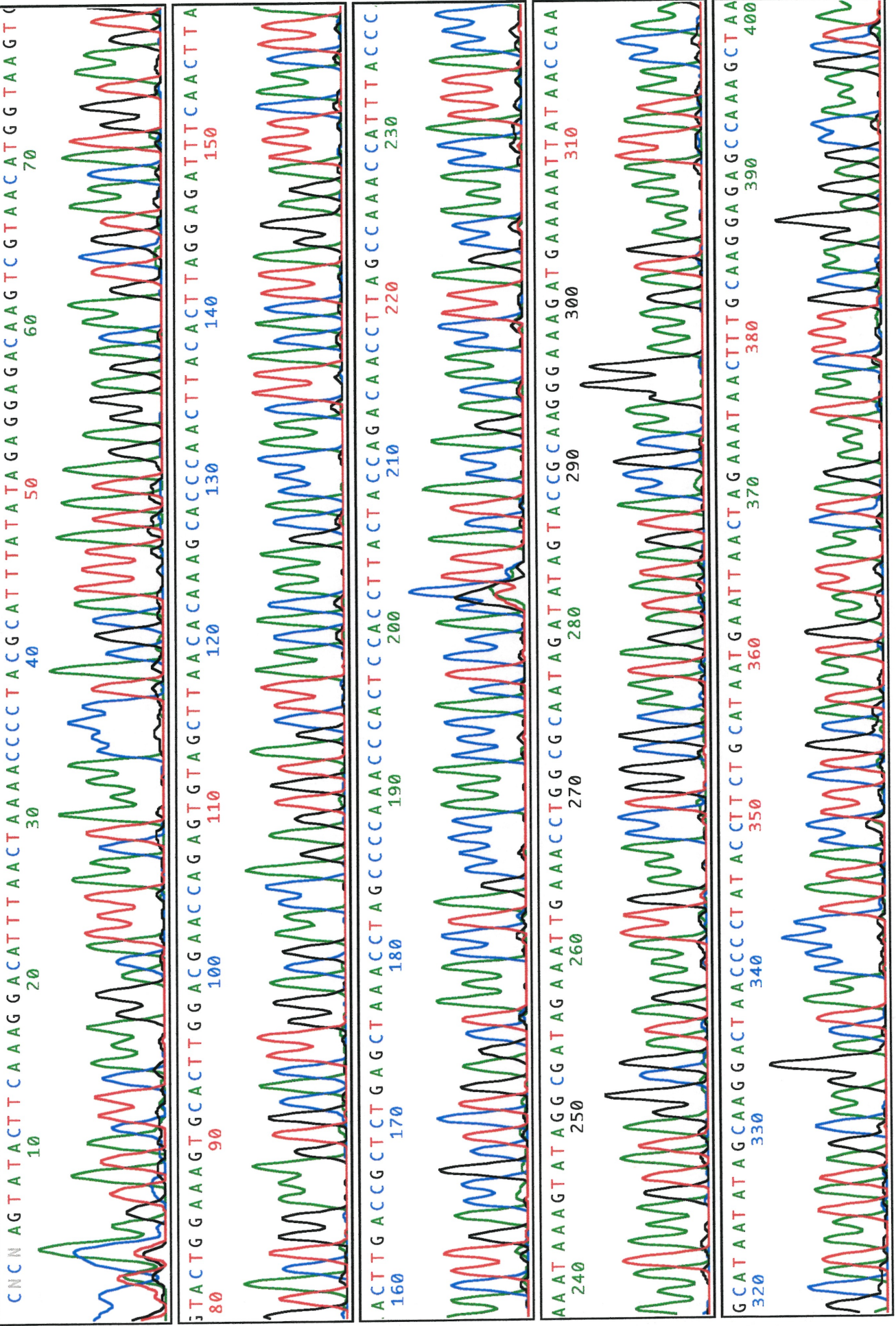
Model 377
Version 3.0
ABI100
Version 3.0

L 398
L 398
Lane 10

Signal C:464 A:331 G:388 T:575
DP4%Ac(-21M13)
matrix 408
Points 1028 to 7080 Base 1:1028

Page 1 of 2
Merc 23 sept 1998 11:20
Jeu 13 nove 1997 19:52
Spacing: 9.24(9.24)





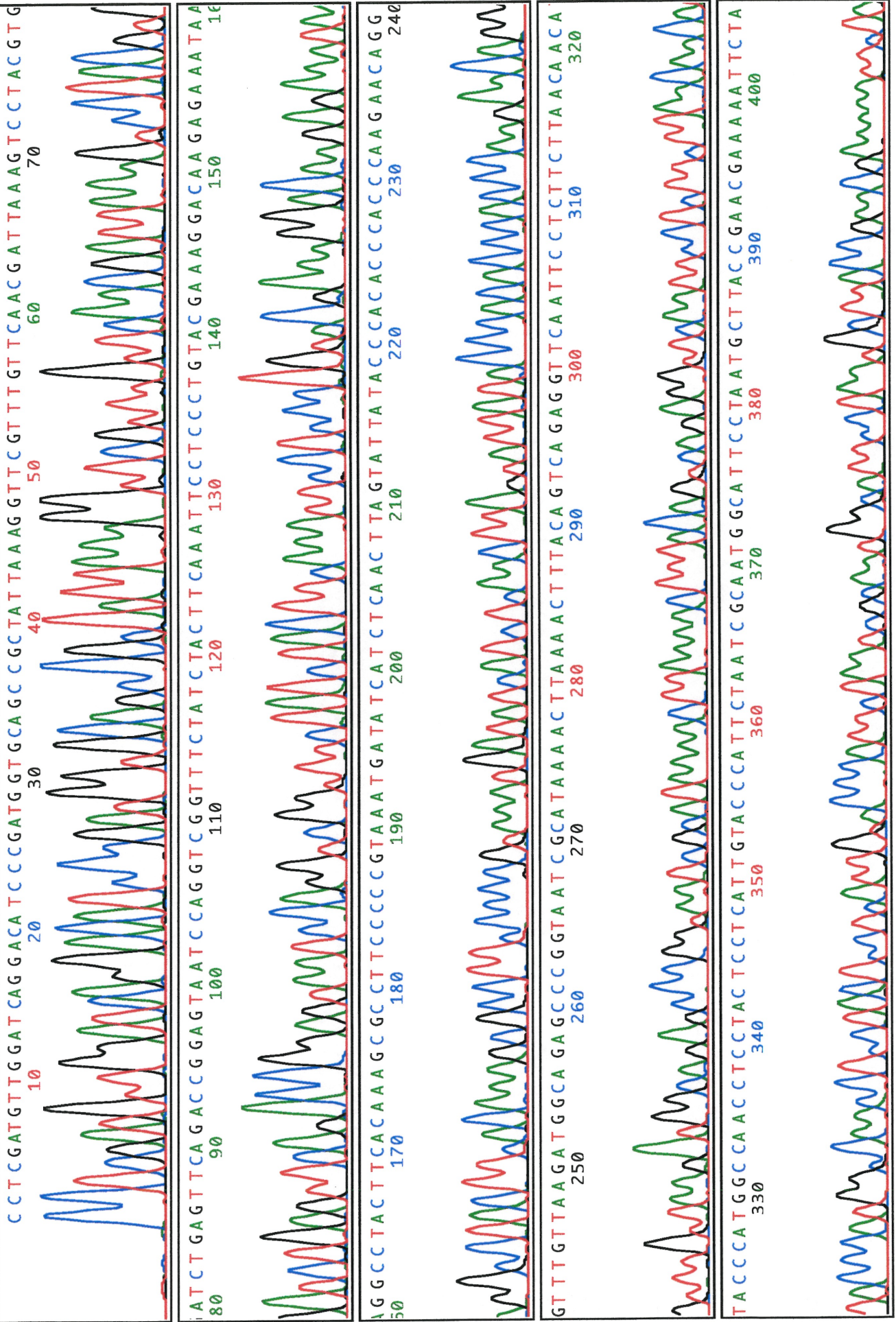


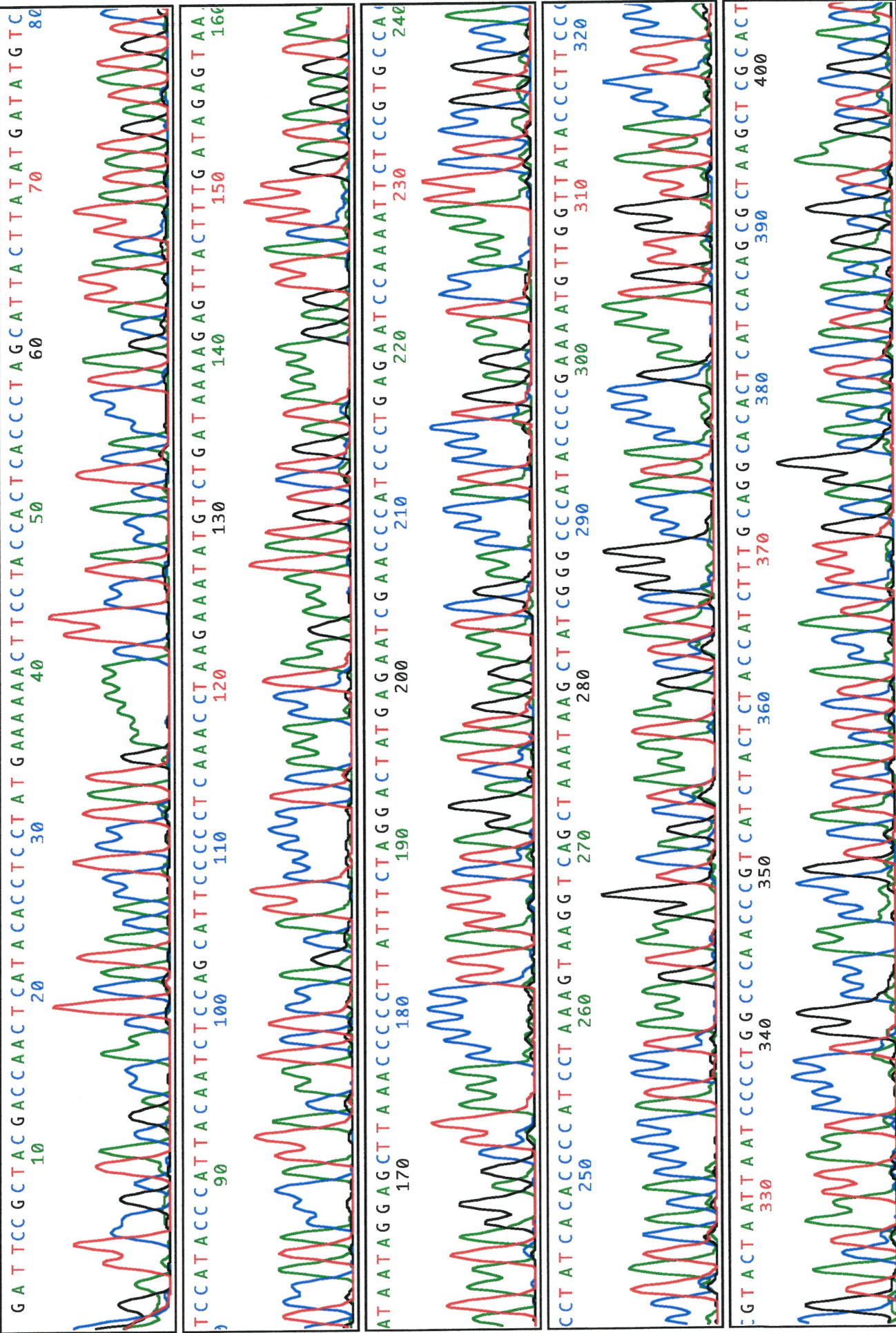
Model 377
Version 3.0
ABI100
Version 3.0

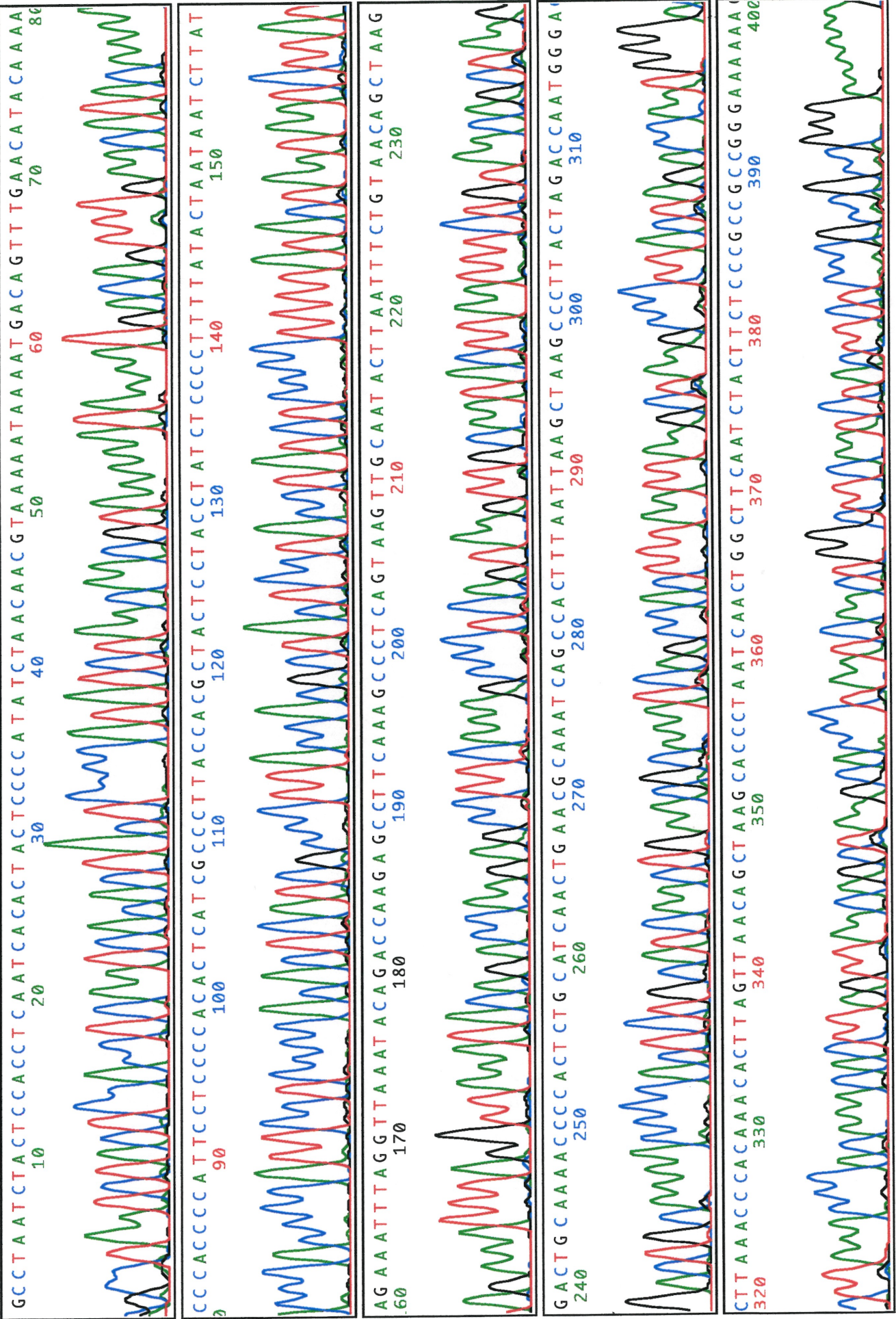
L 2965
L 2965
Lane 27

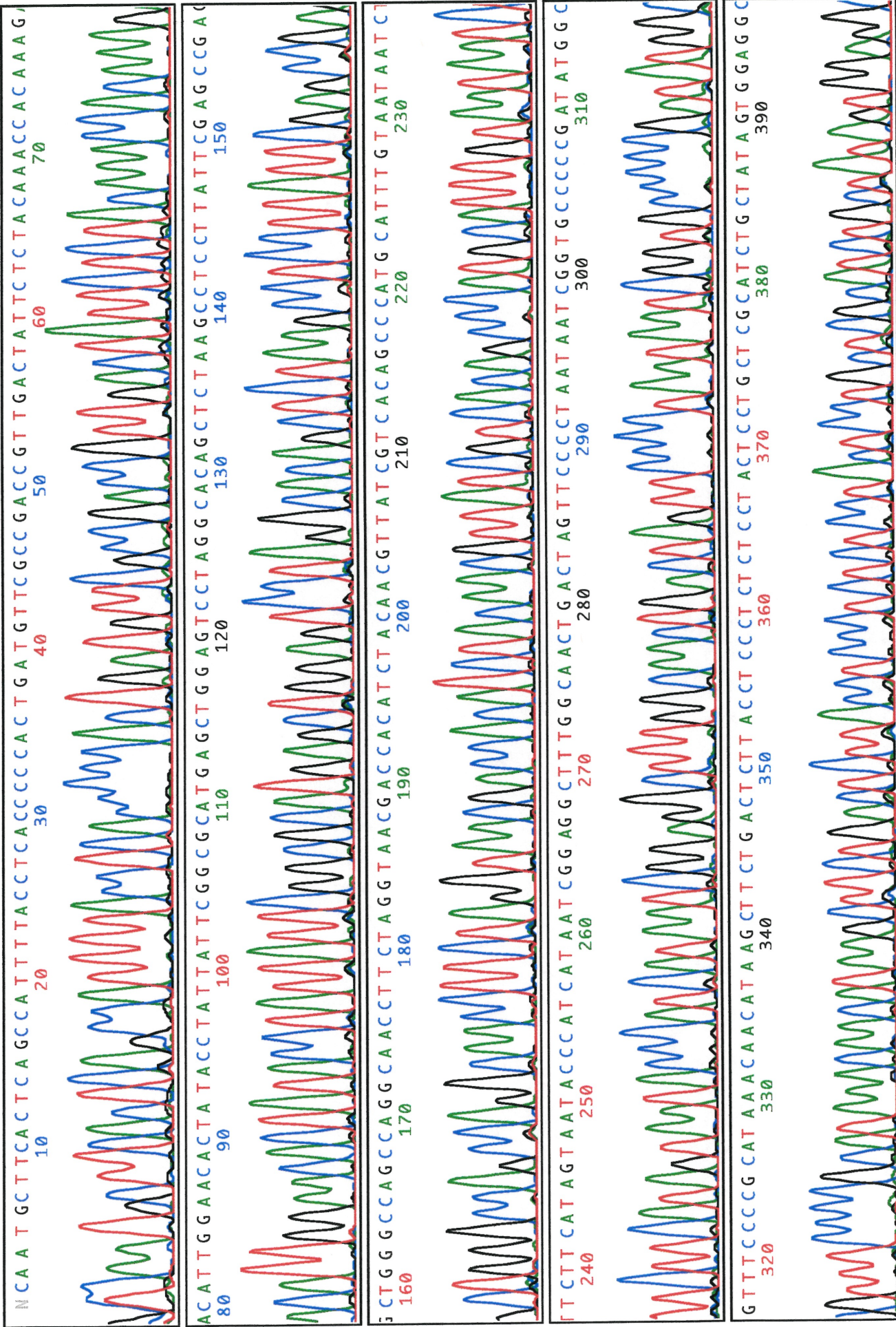
Signal G:244 A:354 T:318 C:298
DT {BD Set Any-Primer}
dRhod
Points 1079 to 8334 Base 1: 889

Page 1 of 2
Merc 23 sept 1998 11:20
Lund 09 mars 1998 18:21
Spacing: 8.99(8.98)









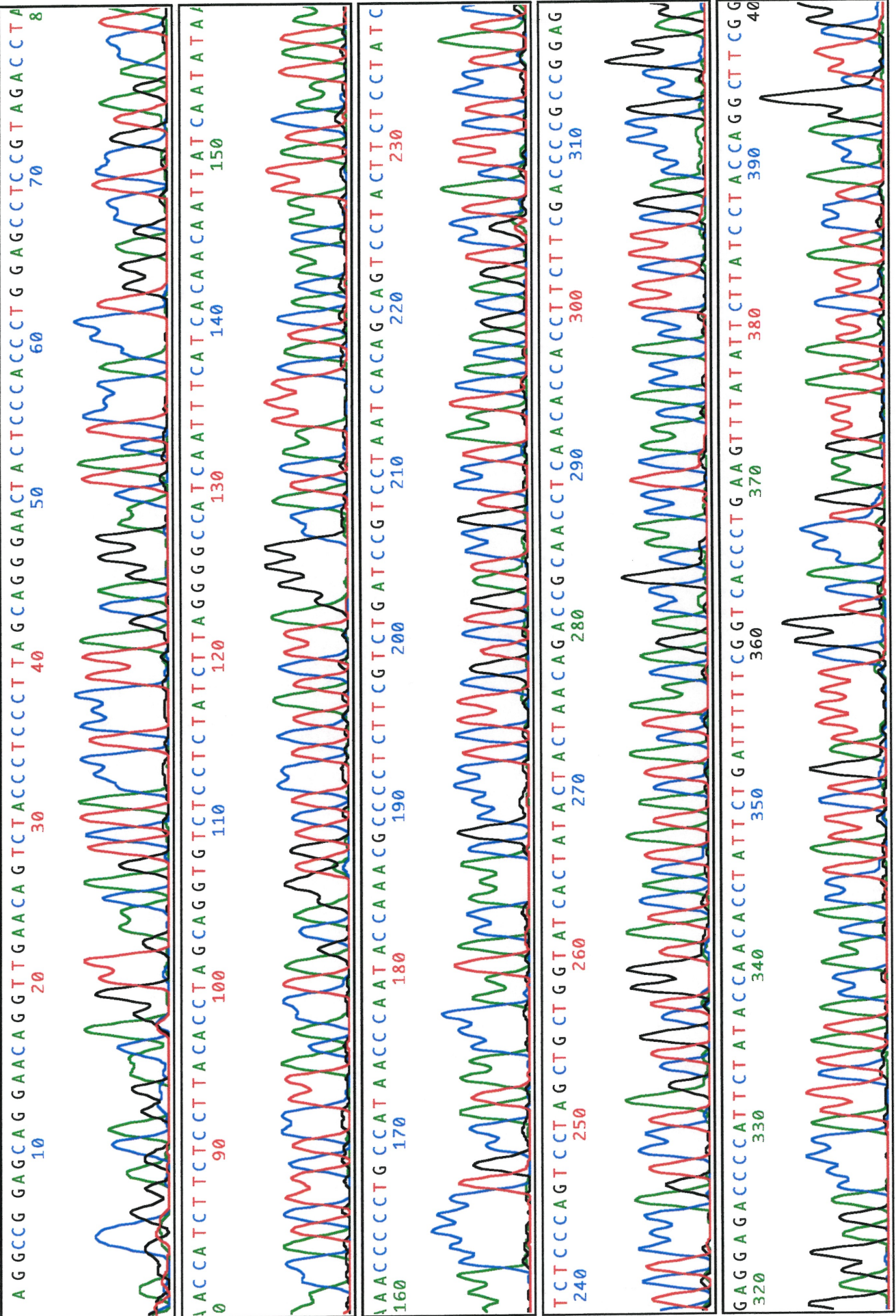


Model 377
Version 3.0
ABI100
Version 3.0

L 6250
L6250
Lane 1

Signal C:479 A:448 G:308 T:495
DP4%Ac(-21M13)
matrix 415
Points 1005 to 5450 Base 1: 1005

Page 1 of 2
Merc 23 sept 1998 11:21
Vend 28 nove 1997 20:01
Spacing: 9.48(9.48)



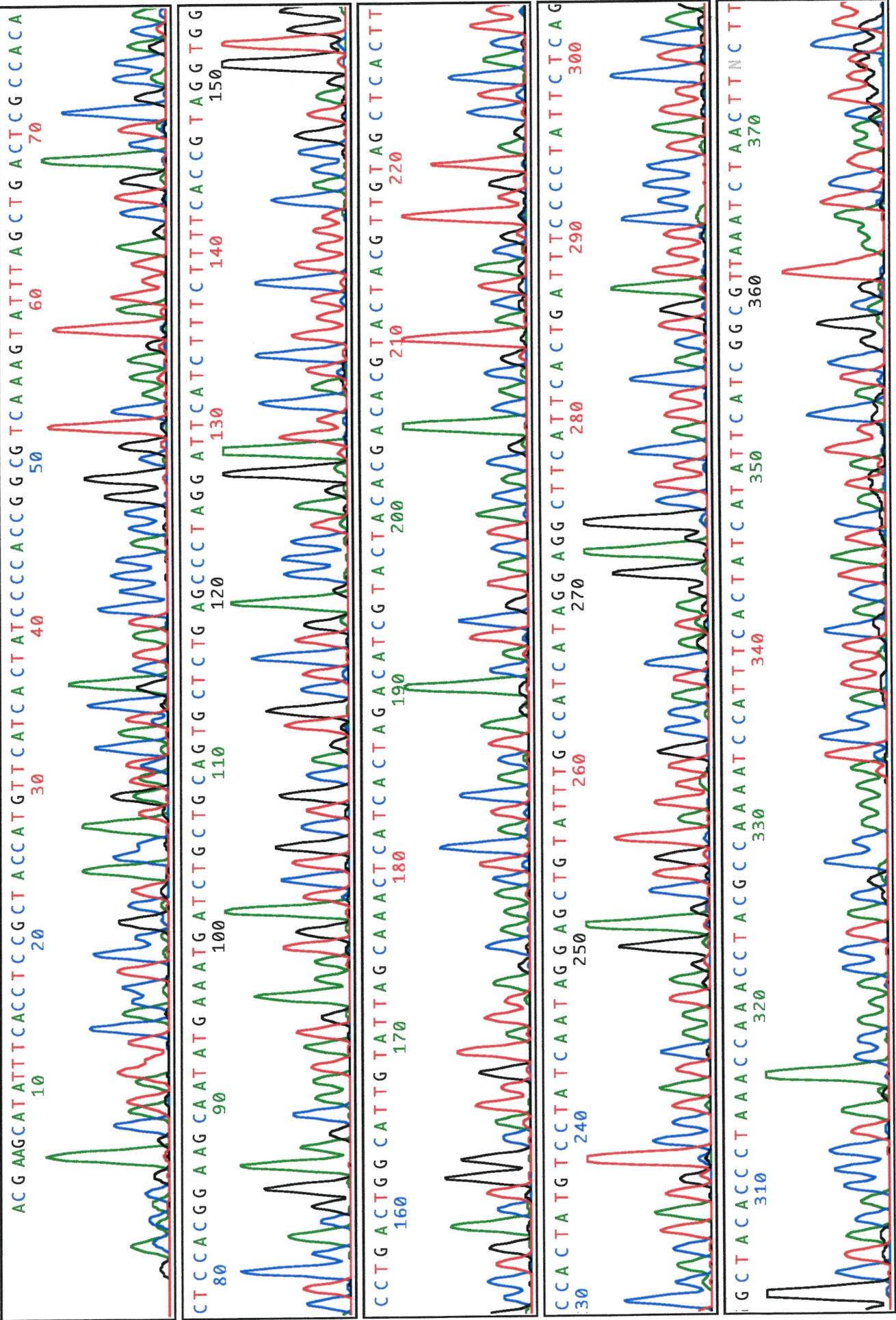


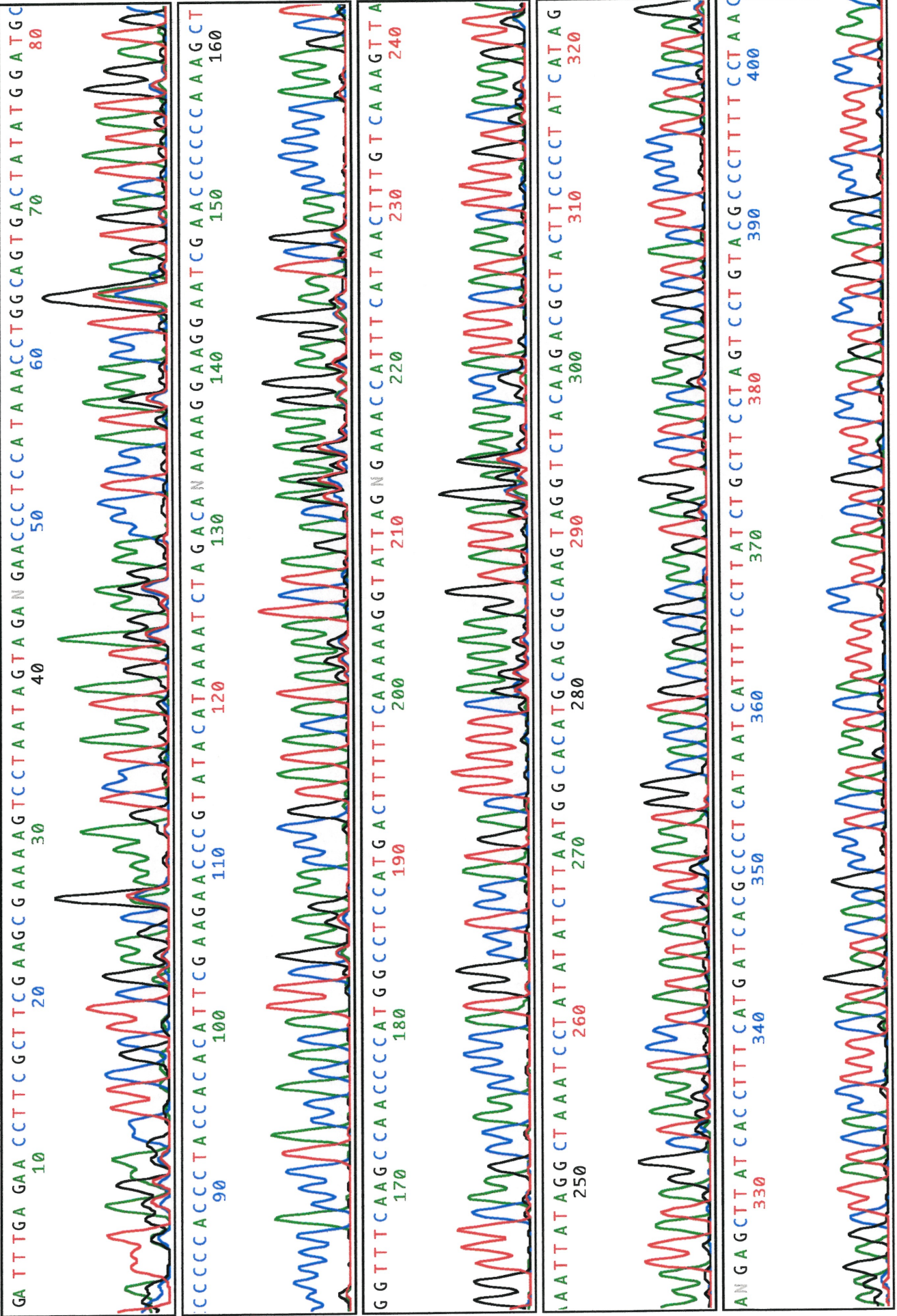
Model 377
Version 3.0
ABI100
Version 2.1.1

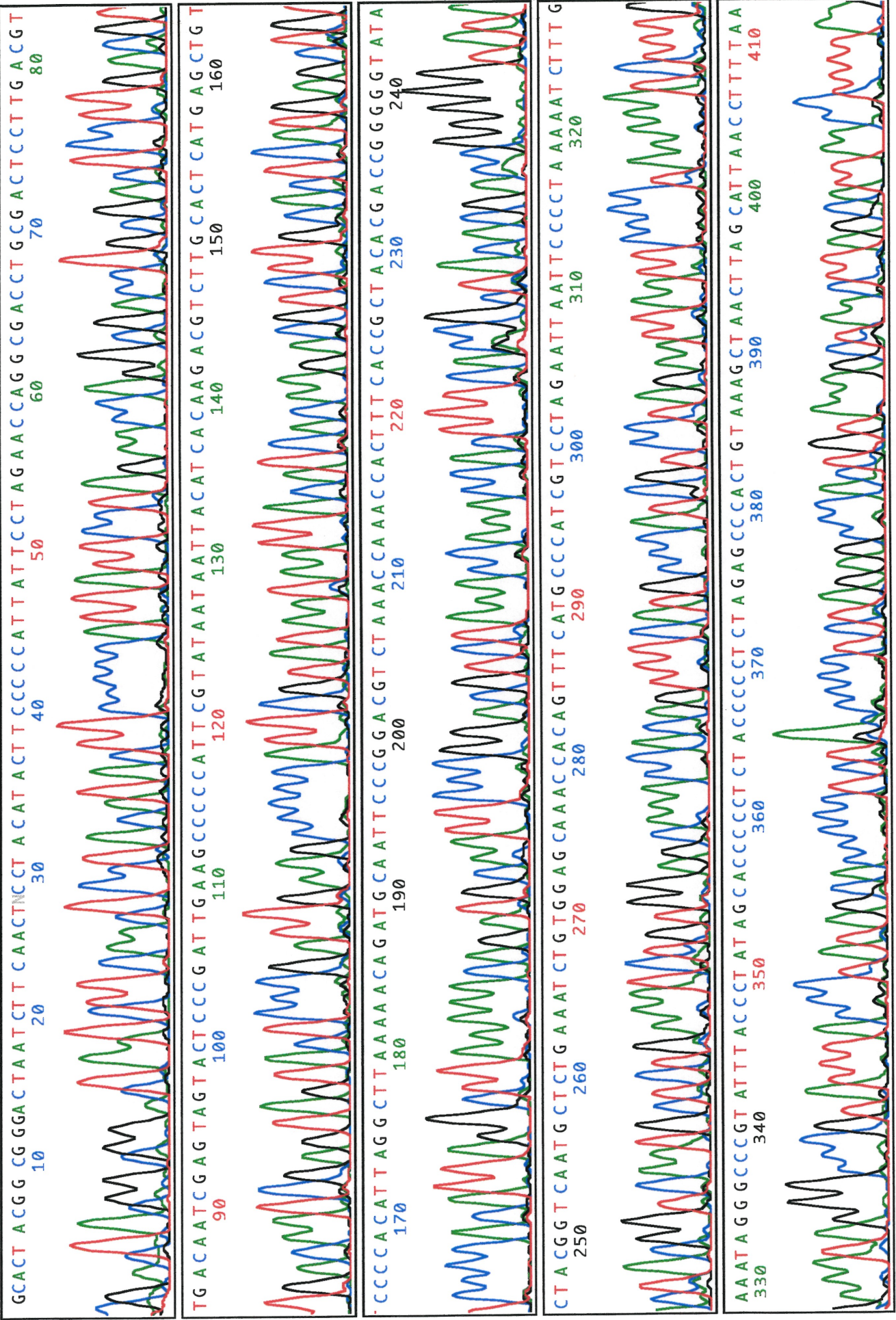
L 6800
L 6800
Lane 7

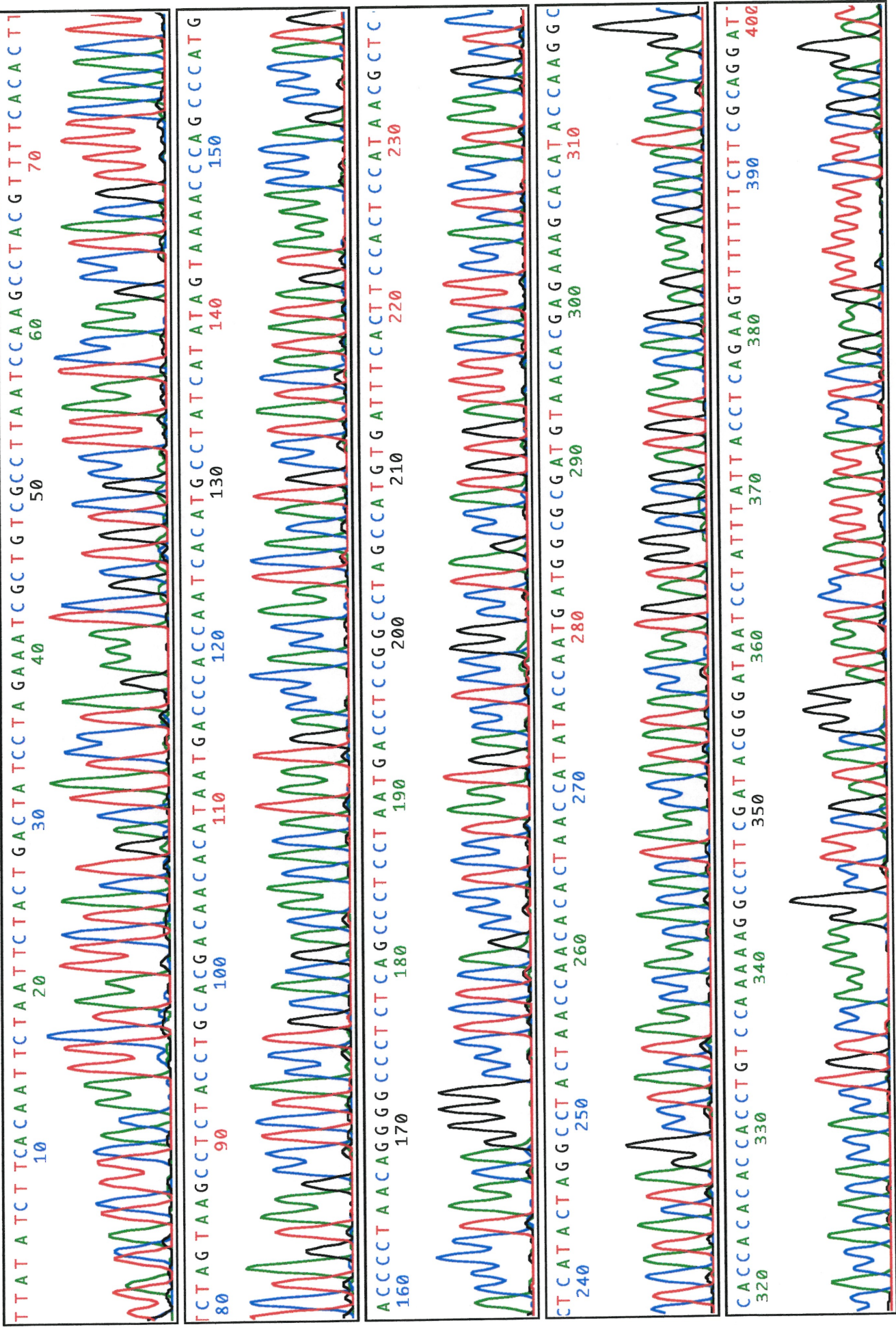
Signal G:681 A:1437 T:1314 C:1032
DT4%Ac(A Set-AnyPrimer)
feb2.952
Points 1037 to 6996 Base 1: 1037

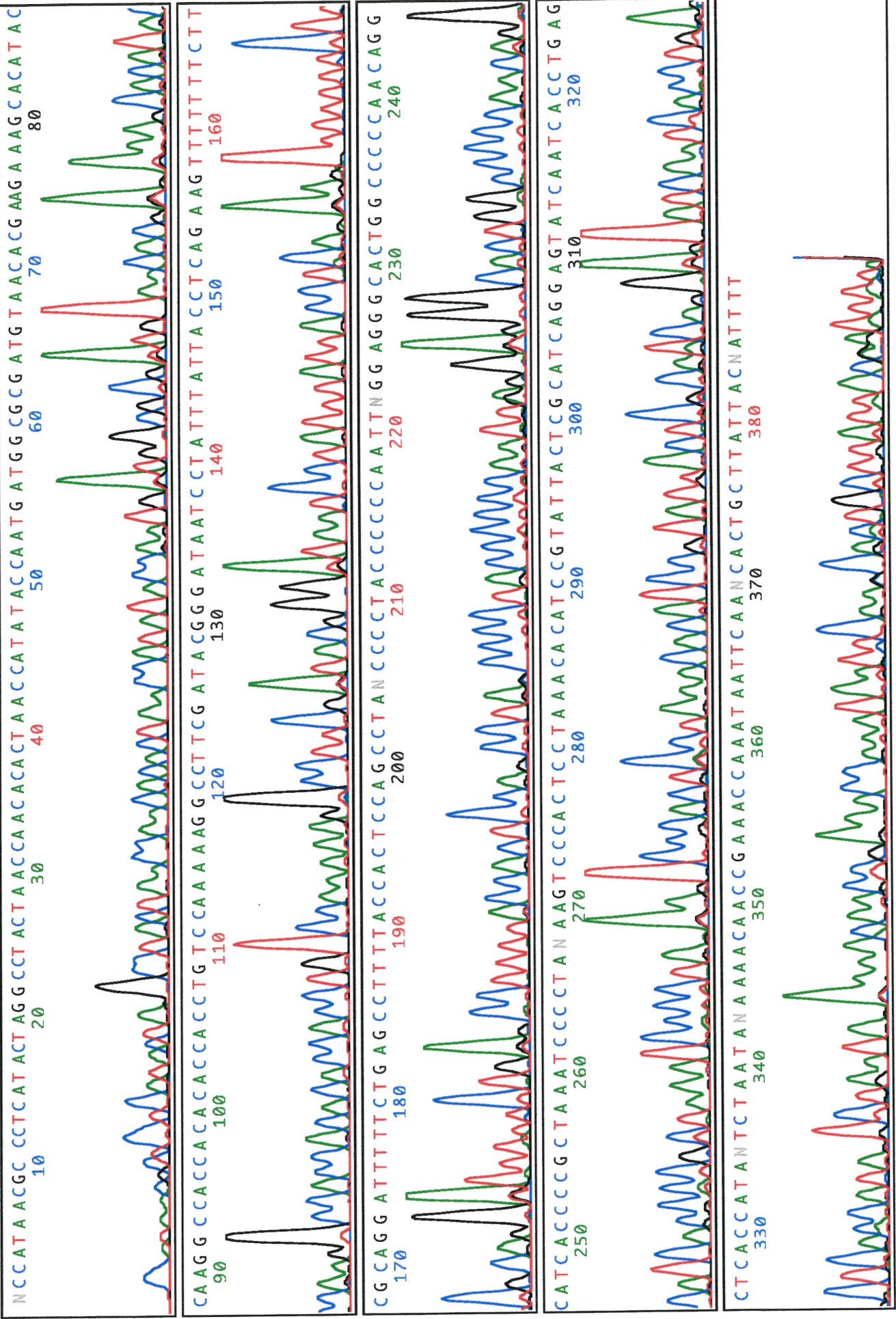
Page 1 of 2
Merc 23 sept 1998 11:21
Lund 01 avri 1996 16:41
Spacing: 11.98[0]

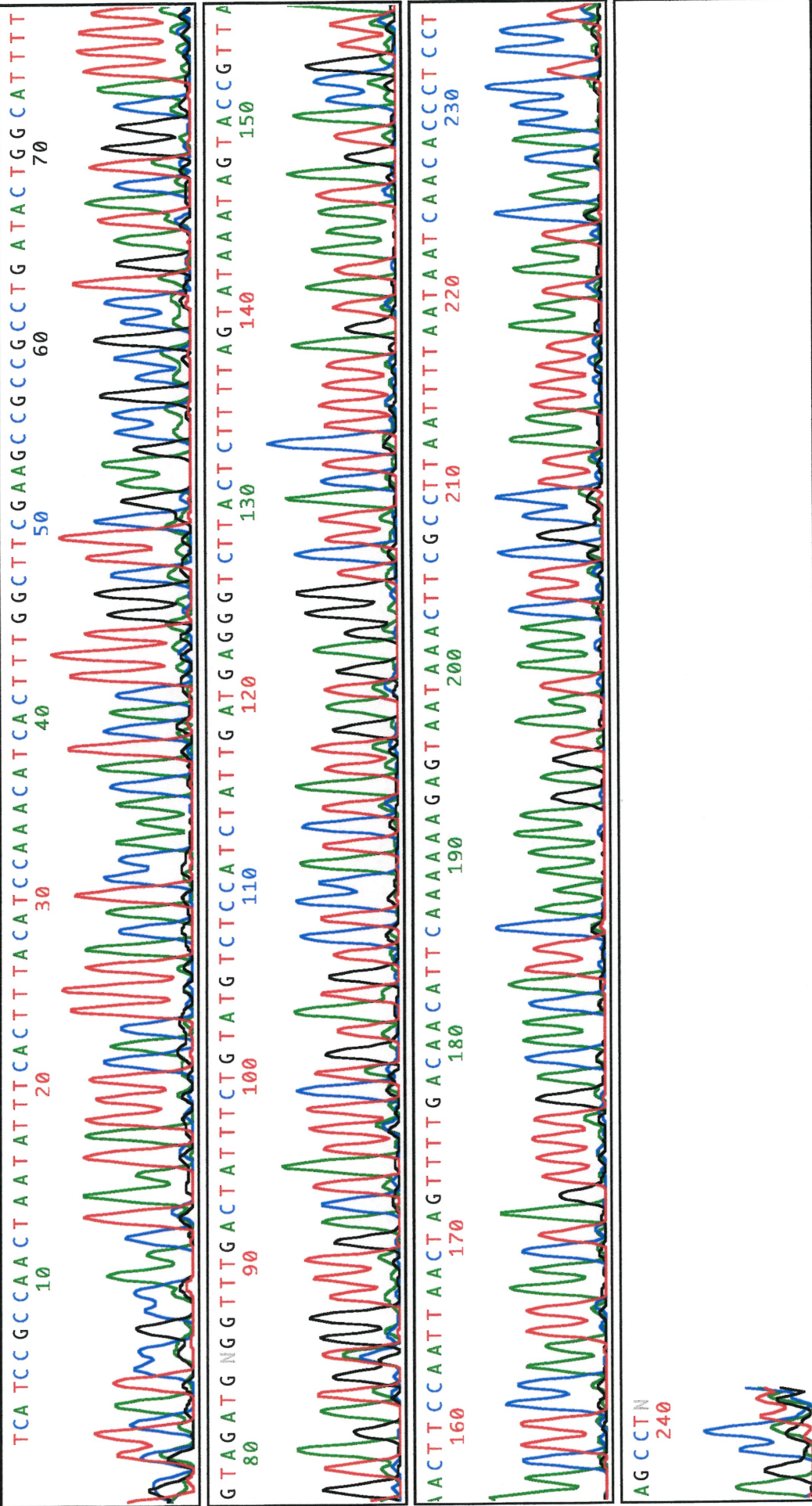












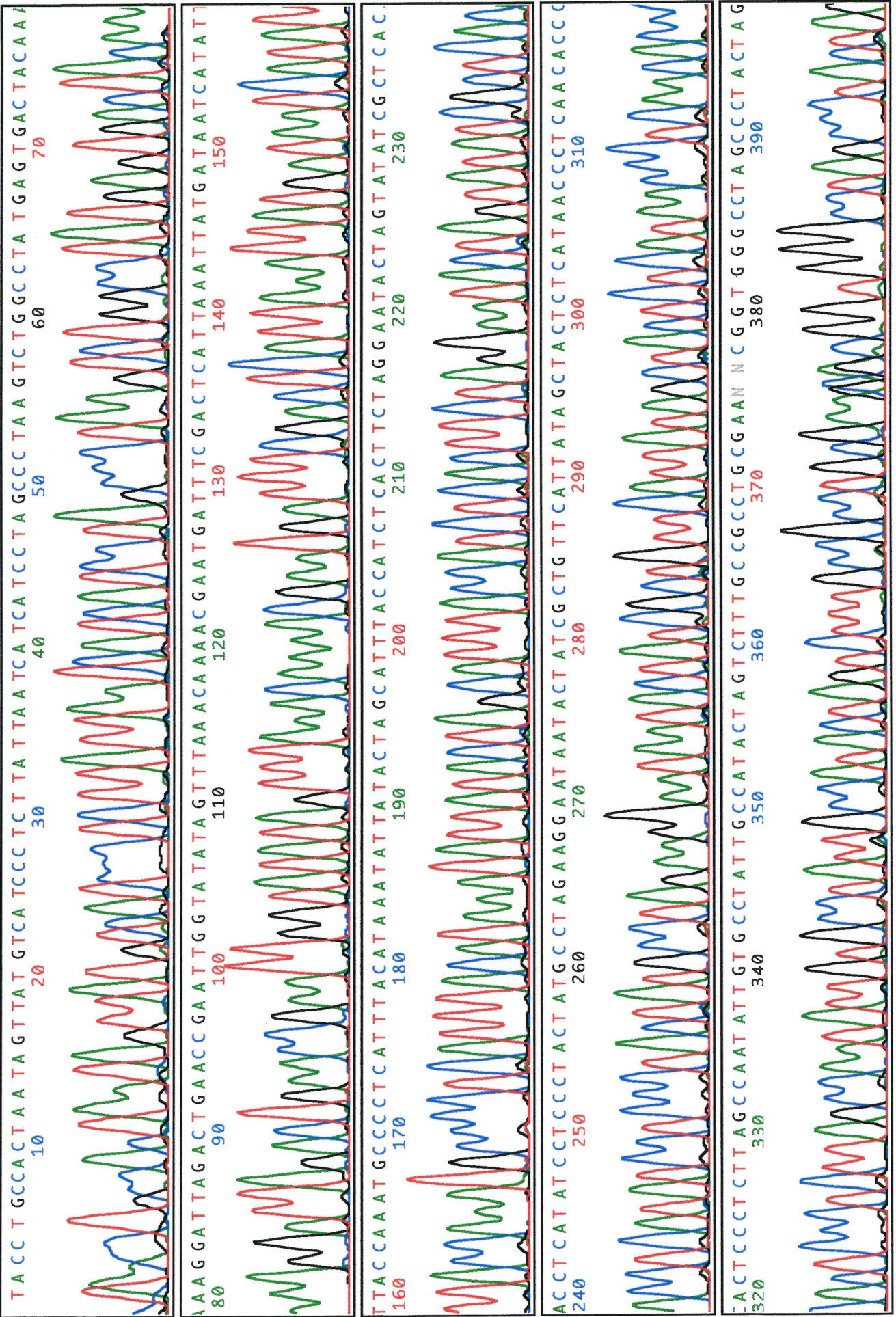


Model 377
Version 3.0
ABI100
Version 3.0

L 10297
L 10297
Lane 9

Signal C:521 A:618 G:298 T:655
DP4%Ac(-21M13)
matrix 415
Points 871 to 5035 Base 1: 871

Page 1 of 2
Merc 23 sept 1998 13:14
Lund 24 nove 1997 18:32
Spacing: 8.89(8.88)



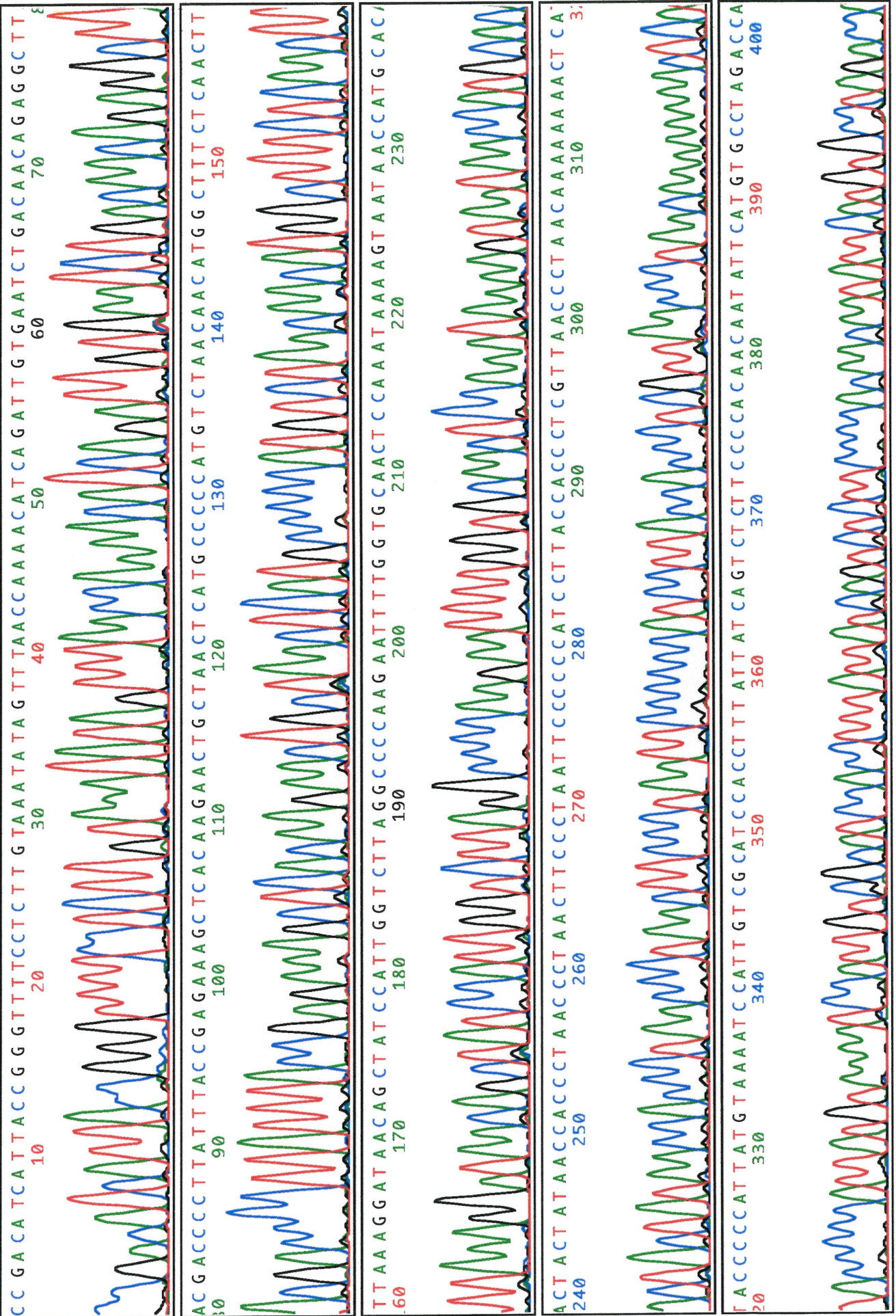


Model 377
Version 3.0
ABI100
Version 3.0

L 12105
L 12105
Lane 10

Signal C:576 A:438 G:283 T:773
DP4%Ac(-21M13)
matrix 408
Points 992 to 5086 Base 1: 992

Page 1 of 2
Merc 23 sept 1998 11:20
Mar 25 nove 1997 18:38
Spacing: 9.59(9.58)



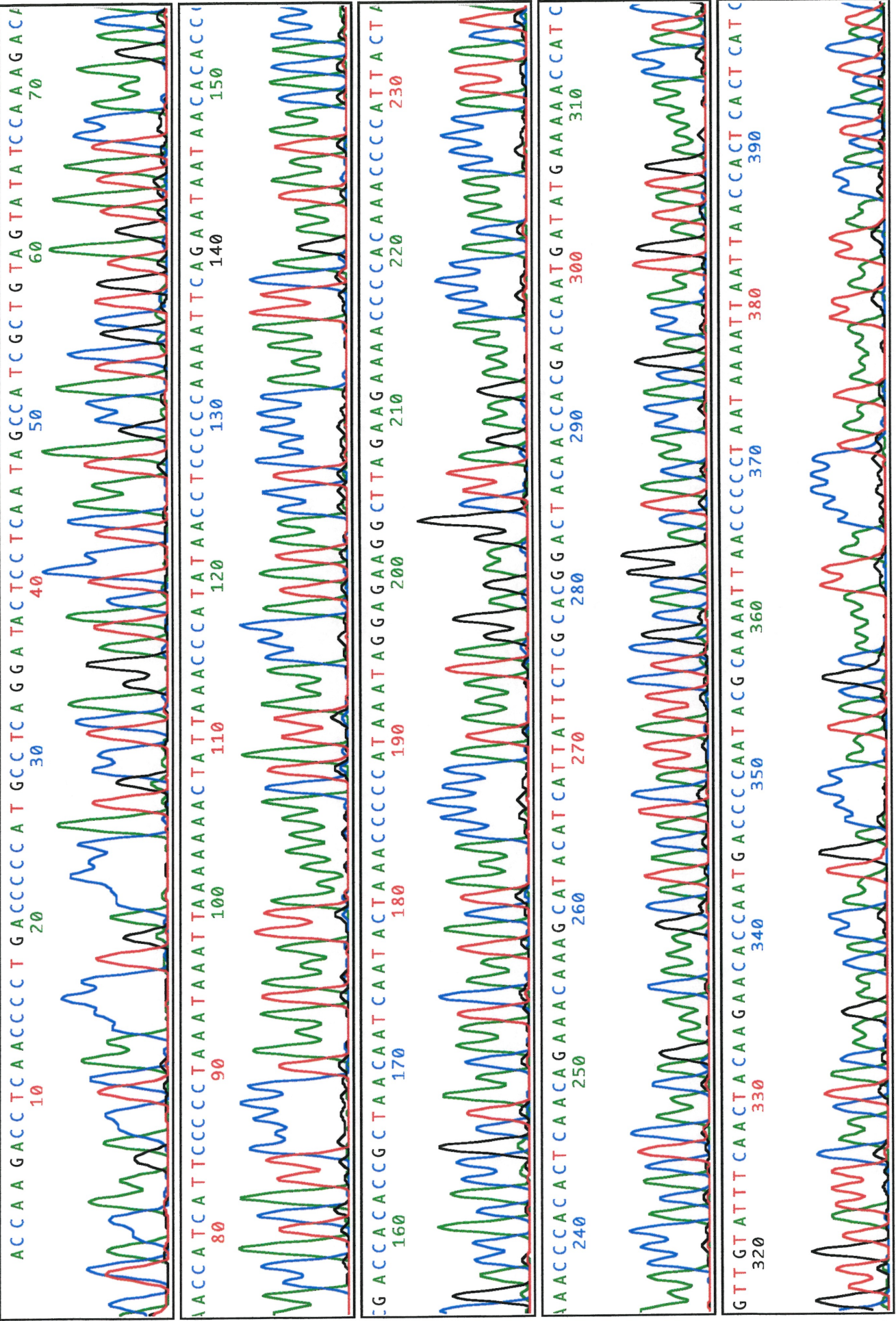


Model 377
Version 3.0
ABI100
Version 3.0

L 14395
L 14395
Lane 10

Signal C:586 A:479 G:322 T:880
DP4%Ac(-21M13)
matrix 408
Points 985 to 5332 Base 1: 985

Page 1 of 2
Merc 23 sept 1998 11:20
Merc 19 nove 1997 15:10
Spacing: 8.56(8.56)



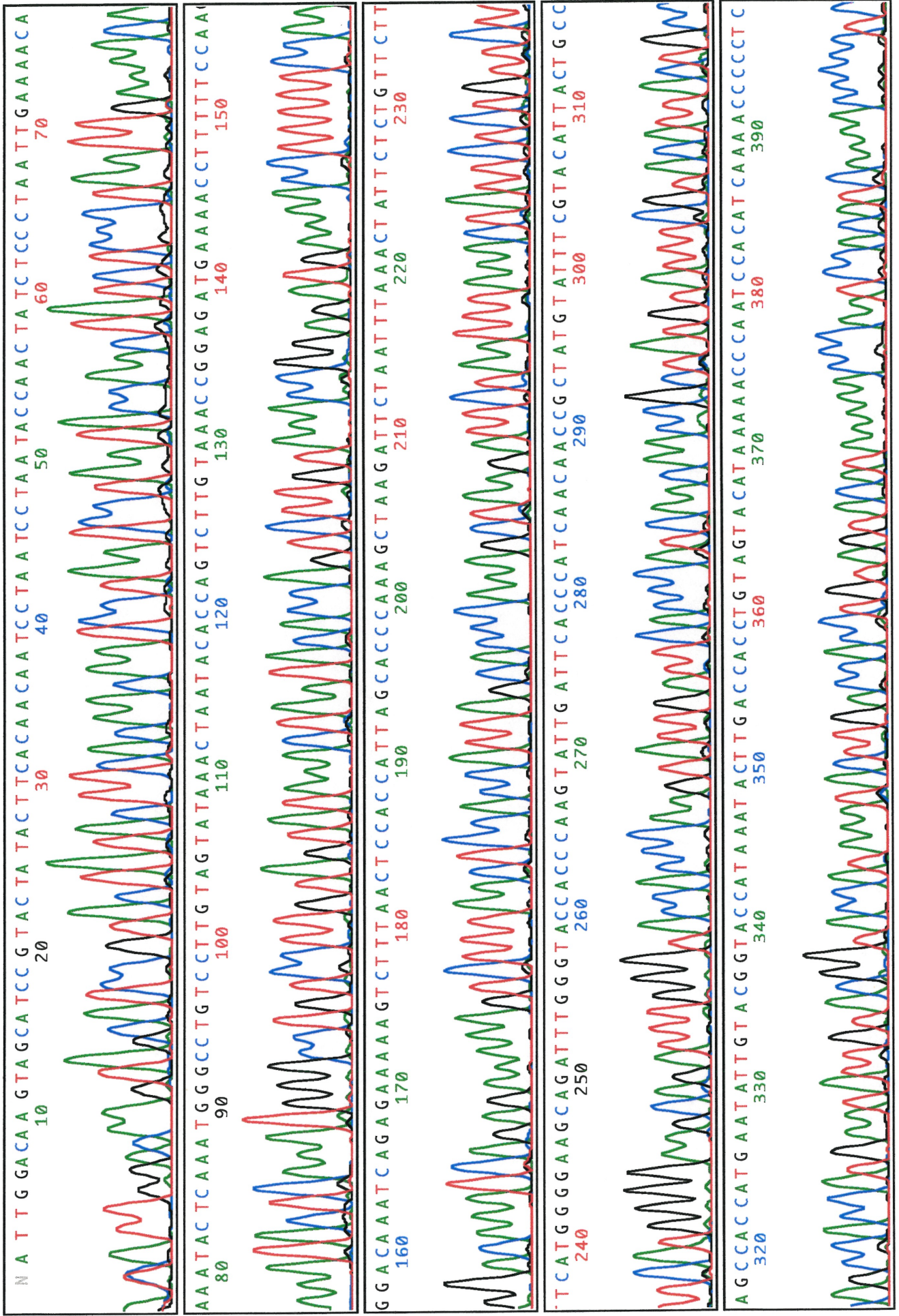


Model 377
Version 3.0
ABI100
Version 3.0

L 15786
L 15786
Lane 6

Signal C:431 A:364 G:230 T:468
DP4%Ac(-21M13)
matrix 415
Points 988 to 5339 Base 1: 988

Page 1 of 2
Merc 23 sept 1998 11:20
Jeu 20 nove 1997 16:40
Spacing: 8.85(8.85)



Annexe III. Alignement et comparaison de 50 séquences d'ADNmt (réaction L5343/H5903) à l'aide du logiciel «*Sequencher*».

Annexe IV. Position et nature des 95 modifications de l'ADNmt détectées suite au séquençage des trois gènes CO et de 22 ARNt chez 50 patients Alzheimer de type sénile et 18 individus témoins.

Réaction	FL398	FL398	FL398	FL398	FL398	FL398	FL398	FL398	FL398	FL398	FL398
Position	456	462	477	482	489	497	498	499	508	514-523	573
Gène	Non-codant	Non-codant	Non-codant	Non-codant	Non-codant	Non-codant	Non-codant	Non-codant	Non-codant	Non-codant	Non-codant
A.A.											
8705	C	C	T	T	T	C	C	G	A	5	C
8801	C	C	T	T	T	C	C	G	A	5	CCCCC
8809	C	C	T	T	T	C	C	G	A	5	C
8816	T	C	T	T	T	C	C	G	A	5	C
8906	C	C	T	T	T	C	C	G	A	4	C
8918	C	C	T	T	T	C	C	G	A	5	C
9001	C	C	T	T	T	C	C	G	A	5	C
9003	C	C	T	T	T	C	C	A	A	5	C
9004	C	C	T	T	T	C	C	G	A	5	C
9031	C	C	T	T	T	C	C	G	A	5	C
9034	C	C	T	T	T	T	C	G	A	7	C
9042	C	C	T	T	T	C	C	G	A	5	C
9101	C	C	T	T	T	C	C	G	A	5	C
9102	C	C	T	T	T	C	C	G	A	5	C
9114	C	C	C	T	T	C	C	G	A	6	C
9115	C	C	T	T	T	T	C	G	A	7	C
9118	C	C	T	T	T	C	C	G	A	5	C
9123	C	C	T	T	T	T	C	G	A	6	C
9125	C	C	T	T	T	C	C	G	A	5	CCC
9131	C	C	T	T	T	C	C	G	A	5	C
9132	C	C	T	T	T	T	C	G	A	7	C
9133	C	C	T	T	C	C	C	G	A	5	C
9137	C	C	T	T	T	C	C	G	A	5	C
9145	C	C	T	T	T	C	C	G	A	5	C
9212	C	C	T	T	T	T	C	G	A	7	C
9214	C	C	T	T	T	C	C	G	A	5	C
9215	C	C	T	T	T	C	C	G	A	5	C
9223	C	C	T	T	T	C	C	G	A	5	C
9242	C	C	T	T	T	C	C	G	A	5	C
9246	C	C	T	T	T	T	C	G	A	6	C
9247	C	C	T	T	T	C	C	G	A	5	CCCCC
9312	C	C	C	T	T	C	C	G	A	5	C
9321	C	C	T	T	T	T	C	G	A	7	C
9322	C	C	T	T	T	C	C	G	A	5	C
9329	C	C	T	T	T	C	C	G	A	5	C
9334	T	C	T	T	T	C	C	G	A	5	C
9337	C	C	T	T	T	C	C	G	A	5	CCC
9344	C	C	T	T	T	C	C	G	A	5	C
9346	C	C	T	T	C	C	C	G	A	5	C
9402	C	C	T	T	T	C	C	G	A	5	C
9403	C	C	T	T	T	C	C	G	A	5	C
9405	C	C	T	T	T	C	C	G	A	5	C
9407	C	C	T	T	T	C	C	G	A	5	C
9408	C	C	T	T	T	C	C	G	A	5	C
9409	C	C	T	T	T	T	C	G	A	6	C
9423	C	C	T	T	C	C	C	G	A	5	C
9427	C	C	T	T	T	C	C	G	A	5	CCCCC
9428	C	C	T	T	T	C	C	G	A	5	C
9429	C	C	T	T	T	C	C	G	A	5	C
9437	C	C	T	T	T	C	C	G	A	5	C
n=50	4%	0%	4%	0%	6%	16%	2%	2%	0%		10%
CT-1	C	T	T	T	T	C	C	G	A	5	C
CT-2	T	C	T	T	T	C	C	G	A	4	C
CT-3	C	C	T	T	T	C	C	G	A	6	C
CT-4	C	C	T	T	T	C	C	G	A	6	C
CT-5	C	C	T	T	T	C	:	G	A	5	C
CT-6	C	T	T	C	C	C	C	G	A	5	C
CT-7	C	C	T	T	T	C	C	G	A	5	C
CT-8	C	C	T	T	T	C	C	G	A	4	C
CT-9	C	C	T	T	T	C	C	G	A	5	C
CT-10	C	C	T	T	T	C	C	G	G	7	C
CT-11	C	C	T	T	T	C	C	G	A	5	C
CT-12	C	C	T	T	T	C	C	G	A	5	C
CT-13	C	C	T	T	T	C	C	G	A	6	C
CT-14	C	C	T	T	T	C	C	G	A	5	C
CT-15	C	C	T	T	T	C	C	G	A	5	C
CT-16	C	C	T	T	T	C	C	G	A	5	C
CT-17	C	C	T	T	T	C	C	A	A	7	C
CT-18	C	C	T	T	T	C	C	G	A	5	C
n=18	5,6%	11,1%	0%	5,6%	11,1%	0%	5,6%	5,6%	5,6%		0%

Réaction	FL398	FL398	FL398	FL398	FL398	FL1485	FL1485	FL1485	FL1485	FL1485	FL1485	FL2965
Position	593	678	709	750	801	1536	1646	1719	1809	1811	1888	3480
Gène	ARNt phe	ARNr 12S	ARNr 12S	ARNr 12S	ARNr 12S	ARNr 12S	ARNt Val	ARNr 16S	ARNr 16S	ARNr 16S	ARNr 16S	ND1
A.A.												
8705	T	T	G	G	A	A	T	G	T	G	G	A
8801	T	T	G	G	A	A	T	A	T	A	G	A
8809	T	T	G	G	A	A	T	G	T	A	G	A
8816	T	T	A	G	A	A	T	G	T	A	A	A
8906	T	T	G	G	A	A	T	G	T	A	G	A
8918	T	C	G	G	A	A	T	G	T	A	G	A
9001	T	T	G	G	A	A	T	G	T	A	G	A
9003	T	T	G	G	A	A	T	G	T	G	G	A
9004	T	T	A	G	A	A	T	G	T	A	A	A
9031	T	T	G	G	A	G	T	G	T	A	G	A
9034	T	T	G	G	A	A	T	G	T	G	G	G
9042	T	T	G	G	A	A	T	G	T	A	G	A
9101	T	T	G	G	A	A	T	G	T	A	G	A
9102	T	T	G	G	A	A	T	G	T	A	G	A
9114	T	T	G	G	A	A	T	G	T	A	G	A
9115	T	T	G	G	A	A	T	G	T	G	G	G
9118	T	T	G	G	A	A	T	G	T	A	G	A
9123	T	T	G	G	A	A	T	G	T	G	G	G
9125	T	T	G	G	A	A	T	A	T	A	G	A
9131	T	T	G	G	A	A	T	G	T	A	G	A
9132	T	T	G	G	A	A	T	G	T	G	G	G
9133	T	T	G	G	A	A	T	A	T	A	G	A
9137	T	T	G	G	A	A	T	G	T	G	G	G
9145	T	T	G	G	A	A	T	G	T	A	G	A
9212	T	T	G	G	A	A	T	G	T	G	G	G
9214	T	T	G	G	A	A	T	G	T	A	G	A
9215	T	T	G	G	A	A	T	G	T	A	G	A
9223	T	T	A	G	A	A	T	G	T	G	G	G
9242	T	T	G	G	A	A	T	G	T	A	G	A
9246	T	T	G	G	A	A	T	G	T	G	G	G
9247	T	T	G	G	A	A	T	A	T	A	G	A
9312	T	T	G	G	A	A	T	G	T	A	G	A
9321	T	T	G	G	A	A	T	A	T	A	G	G
9322	T	T	G	G	A	A	C	G	C	A	G	A
9329	T	T	G	G	A	A	T	G	T	G	G	A
9334	T	T	A	G	A	A	T	G	T	A	A	A
9337	T	T	G	G	A	A	T	A	T	A	G	A
9344	T	T	G	G	A	A	T	G	T	A	G	A
9346	T	T	G	G	A	A	T	A	T	A	G	A
9402	T	T	G	G	A	A	T	G	C	A	G	A
9403	T	T	G	G	A	A	T	G	T	A	G	A
9405	T	T	G	G	A	A	T	G	T	A	G	A
9407	T	T	G	G	A	A	C	G	C	A	G	A
9408	T	T	G	G	A	A	T	G	T	A	G	A
9409	T	T	G	G	A	A	T	G	T	G	G	G
9423	T	T	G	G	A	A	T	A	T	A	G	A
9427	T	T	G	G	A	A	T	A	T	A	G	A
9428	G	T	G	G	A	A	T	G	T	A	G	A
9429	T	T	A	G	G	A	T	G	T	A	A	A
9437	T	T	G	G	A	A	T	G	T	A	G	A
n=50	2%	2%	10%	0%	2%	2%	4%	18%	6%	24%	8%	20%
CT-1	T	T	G	G	A	A	T	G	T	A	G	A
CT-2	T	T	G	G	A	A	T	G	T	A	G	A
CT-3	T	T	G	G	A	A	T	G	T	A	G	A
CT-4	T	T	G	G	A	A	T	G	T	A	G	A
CT-5	T	T	G	G	A	A	T	G	T	G	G	G
CT-6	T	T	G	G	A	A	T	G	T	A	G	A
CT-7	T	T	G	A	A	A	T	G	T	A	G	A
CT-8	T	T	G	G	A	A	T	G	T	A	G	A
CT-9	T	T	G	G	A	A	T	G	T	A	G	A
CT-10	T	T	G	G	A	A	T	G	T	G	G	A
CT-11	T	T	A	G	A	A	T	G	T	A	G	A
CT-12	T	T	G	G	A	A	T	G	T	G	G	G
CT-13	T	T	G	G	A	A	T	G	T	A	G	A
CT-14	T	T	G	G	A	A	T	G	T	A	G	A
CT-15	T	T	A	G	A	A	T	G	T	A	A	A
CT-16	T	T	A	G	A	A	T	G	T	A	A	A
CT-17	T	T	G	G	A	A	T	G	T	G	G	A
CT-18	T	T	G	G	A	A	T	G	T	A	G	A
n=18	0%	0%	16,66	5,6%	0%	0%	0%	0%	0%	22,2%	11,1%	11,1%

Réaction	FL5860	FL5860	FL5860	FL5860	FL5860	FL5860	FL5860	FL5860	FL6250	FL6250	FL6250	FL6250	FL6250
Position	5911	5913	5999	6045	6047	6152	6221	6260	6296	6480	6518	6644	6734
Gène	CO1	CO1	CO1	CO1	CO1	CO1	CO1	CO1	CO1	CO1	CO1	CO1	CO1
A.A.	Ala-Val	Asp-Asn								Val-Ile			
8705	C	G	T	C	A	T	T	G	C	G	T	C	G
8801	C	G	T	C	A	T	T	G	C	A	C	C	G
8809	C	G	T	C	A	T	T	G	C	G	C	C	G
8816	C	G	T	C	A	C	T	G	C	G	C	C	G
8906	C	G	T	C	A	T	T	G	C	G	C	C	G
8918	C	G	T	C	A	T	T	G	T	G	C	C	G
9001	C	G	T	C	A	T	T	G	C	G	C	C	G
9003	C	G	C	C	G	T	T	G	C	G	C	C	G
9004	C	G	T	C	A	T	T	G	C	G	C	C	G
9031	C	G	T	C	A	T	T	G	C	G	C	C	G
9034	C	G	T	C	A	T	T	G	C	G	C	C	G
9042	C	G	T	C	A	T	T	G	C	G	C	C	G
9101	C	G	T	C	A	T	T	G	C	G	C	C	G
9102	C	G	T	C	A	T	T	G	C	G	C	C	G
9114	C	G	T	C	A	T	T	G	C	G	C	C	G
9115	C	G	T	C	A	T	T	G	C	G	C	C	G
9118	C	G	T	C	A	T	T	G	C	G	C	C	G
9123	C	G	T	C	A	T	T	A	C	G	C	C	G
9125	C	G	T	C	A	T	T	G	C	A	C	C	G
9131	C	G	T	C	A	T	T	G	C	G	C	C	G
9132	C	G	T	C	A	T	T	G	C	G	C	C	G
9133	C	G	T	C	A	T	T	G	C	G	C	C	G
9137	C	G	T	C	A	T	T	G	C	G	C	C	G
9145	T	G	T	C	A	T	T	G	C	G	C	C	G
9212	C	G	T	C	A	T	T	G	C	G	C	C	G
9214	C	G	T	C	A	T	T	G	C	G	C	C	G
9215	C	G	T	C	A	T	T	G	C	G	C	C	G
9223	C	G	T	C	A	T	T	G	C	G	C	C	G
9242	C	G	T	C	A	T	T	G	C	G	C	C	G
9246	C	G	T	C	A	T	T	A	C	G	C	C	G
9247	C	G	T	C	A	T	T	G	C	G	C	C	A
9312	C	G	T	C	A	T	T	G	C	G	C	C	G
9321	C	G	T	C	A	T	T	G	C	G	C	C	G
9322	C	G	T	C	A	T	T	G	C	G	C	C	G
9329	C	G	T	C	A	T	T	G	C	G	T	C	G
9334	C	G	T	C	A	C	T	G	C	G	C	C	G
9337	C	G	T	C	A	T	T	G	C	G	C	C	A
9344	C	G	T	C	A	T	T	G	C	G	C	C	G
9346	C	G	T	C	A	T	T	G	C	G	C	C	G
9402	C	G	T	C	A	T	T	G	C	G	C	C	G
9403	C	G	T	C	A	T	T	G	C	G	C	C	G
9405	C	G	T	C	A	T	T	G	C	G	C	C	G
9407	C	G	T	C	A	T	T	G	C	G	C	C	G
9408	C	G	T	C	A	T	T	G	C	G	C	C	G
9409	C	G	T	C	A	T	T	A	C	G	C	C	G
9423	C	G	T	C	A	T	T	G	C	G	C	C	G
9427	C	G	T	C	A	T	T	G	C	A	C	C	G
9428	C	G	T	C	A	T	T	G	C	G	C	C	G
9429	C	G	T	C	A	T	T	G	C	G	C	C	G
9437	C	G	T	C	A	T	T	G	C	G	C	C	G
n=50	2%	0%	2%	0%	2%	4%	0%	6%	2%	6%	4%	0%	4%
CT-1	C	G	T	C	A	T	T	G	C	G	C	C	G
CT-2	C	G	T	C	A	T	T	G	C	G	C	C	G
CT-3	C	G	T	C	A	T	T	G	C	G	C	C	G
CT-4	C	G	T	C	A	T	T	G	C	G	C	C	G
CT-5	C	G	T	C	A	T	T	G	C	G	C	C	G
CT-6	C	G	T	C	A	T	T	G	C	G	C	C	G
CT-7	C	G	T	C	A	T	T	G	C	G	C	C	G
CT-8	C	G	T	C	A	T	T	G	C	G	C	C	G
CT-9	C	G	T	C	A	T	T	G	C	G	C	C	G
CT-10	C	G	T	T	A	C	T	G	C	G	C	T	G
CT-11	C	G	T	C	A	T	C	G	C	G	C	C	G
CT-12	C	A	T	C	A	T	T	G	C	G	C	C	G
CT-13	C	G	T	C	A	T	T	G	C	G	C	C	G
CT-14	C	G	T	C	A	T	T	G	C	G	C	C	G
CT-15	C	G	T	C	A	T	T	G	C	G	C	C	G
CT-16	C	G	T	C	A	T	T	G	C	G	C	C	G
CT-17	C	G	C	C	G	T	T	G	C	G	C	C	G
CT-18	C	G	T	C	A	T	T	G	C	G	C	C	G
n=18	0%	5,6%	5,6%	5,6%	5,6%	5,6%	5,6%	0%	0%	0%	0%	5,6%	0%

Réaction	FL6250	FL6800	FL7310	FL7310	FL7900	FL9090	FL9090	FL9090	FL9090	FL9090	FL9090	FL9090
Position	6776	7028	7476	7705	8251	9115	9123	9254	9266	9293	9300	9389
Gène	CO1	CO1	ARNt Ser	CO2	CO2	ATPase 6	ATPase 6	CO3	CO3	CO3	CO3	CO3
A.A.											Ala-Thr	
8705	T	T	C	T	G	A	G	A	A	C	G	A
8801	T	T	C	T	A	A	G	A	G	C	G	A
8809	T	C	C	T	G	A	G	A	G	C	G	A
8816	T	T	C	T	G	A	G	A	G	C	G	A
8906	T	T	C	T	G	A	G	A	G	C	G	A
8918	T	C	C	T	G	A	G	A	G	C	G	A
9001	T	T	C	T	G	A	G	A	G	C	G	A
9003	T	T	C	C	A	A	G	A	G	C	G	A
9004	T	T	C	T	G	A	G	G	G	C	G	A
9031	C	C	C	T	G	A	G	A	G	C	G	A
9034	T	T	C	T	G	A	G	A	G	C	G	A
9042	T	C	C	T	G	A	G	A	G	C	G	A
9101	T	C	C	T	G	A	G	A	G	C	G	A
9102	T	T	C	T	G	A	G	A	G	C	G	A
9114	T	C	C	T	G	A	G	A	G	C	G	A
9115	T	T	C	T	G	A	G	A	G	C	G	A
9118	T	C	C	T	G	A	G	A	G	C	G	A
9123	T	T	C	T	G	A	G	A	G	C	G	A
9125	T	T	C	T	A	A	G	A	G	C	G	A
9131	T	C	C	T	G	A	G	A	G	C	G	A
9132	T	T	C	T	G	A	G	A	G	C	G	A
9133	T	T	T	T	G	A	G	A	G	C	G	A
9137	T	T	C	T	G	A	G	A	G	C	G	A
9145	C	C	C	T	G	A	G	A	G	C	G	A
9212	T	T	C	T	G	A	G	A	G	C	G	A
9214	T	T	C	T	G	A	G	A	G	C	G	A
9215	T	C	C	T	G	A	G	A	G	C	G	A
9223	T	T	C	T	G	A	G	A	G	C	G	A
9242	T	C	C	T	G	A	G	A	G	C	G	A
9246	T	T	C	T	G	A	G	A	G	C	G	A
9247	T	T	C	T	A	A	G	A	G	C	G/A 40%	A
9312	T	C	C	T	G	A	G	A	G	C	G	A
9321	T	T	C	T	G	A	G	A	G	C	G	A
9322	T	C	C	T	G	A	G	A	G	C	G	A
9329	T	T	C	T	G	A	G	A	A	C	G	A
9334	T	T	C	T	G	A	G	A	G	C	G	A
9337	T	T	C	T	A	G	G	A	G	C	G	A
9344	T	T	C	T	G	A	G	A	G	C	G	A
9346	T	T	T	T	G	A	G	A	G	C	G	A
9402	T	C	C	T	G	A	G	A	G	C	G	A
9403	T	C	C	T	G	A	G	A	G	C	G	A
9405	T	C	C	T	G	A	G	A	G	C	G	A
9407	T	C	C	T	G	A	G	A	G	C	G	A
9408	T	C	C	T	G	A	G	A	G	C	G	A
9409	T	T	C	T	G	A	G	A	G	C	G	A
9423	T	T	T	T	G	A	G	A	G	C	G	A
9427	T	T	C	T	A	A	G	A	G	C	G	A
9428	T	C	C	T	G	A	G	A	G	C	G	A
9429	T	T	C	T	G	A	G	A	G	C	G	A
9437	T	T	C	T	G	A	G	A	G	C	G	A
n=50	4%	38%	6%	2%	12%	2%	0%	2%	4%	0%	2%	0%
CT-1	T	T	C	T	G	A	G	A	G	C	G	A
CT-2	T	C	C	T	G	A	G	A	G	C	G	A
CT-3	T	C	C	T	G	A	G	A	G	C	G	A
CT-4	T	T	C	T	G	A	G	A	G	C	G	A
CT-5	T	T	C	T	G	A	G	A	G	C	G	A
CT-6	T	T	C	T	G	A	G	A	G	C	G	A
CT-7	T	C	C	T	G	A	G	A	G	C	G	A
CT-8	T	C	C	T	G	A	A	A	G	C	G	A
CT-9	T	C	C	T	G	A	G	A	G	C	G	A
CT-10	T	T	C	T	G	A	G	A	G	C	G	A
CT-11	T	T	C	T	G	A	G	A	G	A	G	G
CT-12	T	T	C	T	G	A	G	A	G	C	A	A
CT-13	T	C	C	T	G	A	G	A	G	C	G	A
CT-14	T	C	C	T	G	A	G	A	G	C	G	A
CT-15	T	T	C	T	G	A	G	A	G	C	G	A
CT-16	T	T	C	T	G	A	G	A	G	C	G	A
CT-17	T	T	C	C	G	A	G	A	G	C	G	A
CT-18	T	T	C	T	G	A	G	A	G	C	G	A
n=18	0%	38,9%	0%	5,6%	0%	0%	5,6%	0%	0%	5,6%	5,6%	5,6%

Réaction	FL9090	FL9090	FL9850	FL10297	FL10297	FL10297	FL10297	FL10297	FL12105	FL12105	FL12105	FL12105
Position	9477	9615	10034	10398	10463	10506	10550	10619	12308 CPEO	12310-11	12372	12406
Gène	CO3	CO3	ARNT Gly	ND3	ARNT Arg	ND4L	ND4L	ND4L	ARNT Leu2	ARNT Leu2	ND5	ND5
A.A.	Val-Ile			Thr-Ser		Thr-Ala						Val-Ile
8705	G	T	T	A	T	G	A	C	G	:	A	G
8801	G	T	C	G	T	A	A	C	A	:	G	G
8809	G	T	T	A	T	A	A	C	A	:	G	G
8816	G	T	T	A	C	A	A	C	A	:	G	A
8906	A	T	T	A	T	A	A	T	G	:	A	G
8918	G	T	T	A	T	A	A	C	A	:	G	G
9001	G	T	T	A	T	A	A	C	A	:	G	G
9003	G	T	T	A	T	A	A	C	G	:	A	G
9004	G	T	T	A	C	A	A	C	A	:	G	G
9031	G	T	T	A	T	A	A	C	A	:	G	G
9034	G	T	T	G	T	A	G	C	G	:	A	G
9042	G	T	T	A	T	A	A	C	A	:	G	G
9101	G	T	T	A	T	A	A	C	A	:	G	G
9102	G	T	T	A	T	A	A	C	A	:	G	G
9114	G	T	T	A	T	A	A	C	A	A	G	G
9115	G	T	T	G	T	A	G	C	G	:	A	G
9118	G	T	T	A	T	A	A	C	A	:	G	G
9123	G	T	T	G	T	A	G	C	G	:	A	G
9125	G	T	C	G	T	A	A	C	A	:	G	G
9131	G	T	T	A	T	A	A	C	A	:	G	G
9132	G	T	T	G	T	A	G	C	G	:	A	G
9133	G	T	T	G	T	A	A	C	A	:	G	G
9137	G	T	T	G	T	A	G	C	G	:	A	G
9145	G	T	T	A	T	A	A	C	A	:	G	G
9212	G	T	T	G	T	A	G	C	G	:	A	G
9214	G	T	T	A	T	A	A	C	A	:	G	G
9215	G	T	T	A	T	A	A	C	A	:	G	G
9223	G	T	T	A	T	A	G	C	G	:	A	G
9242	G	T	T	A	T	A	A	C	A	:	G	G
9246	G	T	T	G	T	A	G	C	G	:	A	G
9247	G	T	C	G	T	A	A	C	A	:	G	G
9312	G	T	T	A	T	A	A	C	A	:	G	G
9321	G	T	T	G	T	A	G	C	G/A 50%	:	G/A 40%	G
9322	G	T	T	A	T	A	A	C	A	:	G	G
9329	G	T	T	A	T	G	A	C	G	:	A	G
9334	G	T	T	A	C	A	A	C	A	:	G	A
9337	G	T	C	G	T	A	A	C	A	:	G	G
9344	G	T	T	A	T	A	A	C	A	:	G	G
9346	G	T	T	G	T	A	A	C	A	:	G	G
9402	G	T	T	A	T	A	A	C	A	:	G	G
9403	G	T	T	A	T	A	A	C	A	:	G	G
9405	G	T	T	A	T	A	A	C	A	:	G	G
9407	G	T	T	A	T	A	A	C	A	:	G	G
9408	G	T	T	A	T	A	A	C	A	:	G	G
9409	G	T	T	G	T	A	G	C	G	:	A	G
9423	G	T	T	G	T	A	A	C	A	:	G	G
9427	G	C	C	G	T	A	A	C	A	:	G	G
9428	G	T	T	A	T	A	A	C	A	:	G	G
9429	G	T	T	A	C	A	A	C	A	:	G	G
9437	G	T	T	A	T	A	A	C	A	:	G	G
n=50	2%	2%	10%	34%	8%	4%	20%	2%	28%	2%	28%	4%
CT-1	G	T	T	G	T	A	A	C	A	:	G	G
CT-2	G	T	T	A	T	A	A	C	A	:	G	G
CT-3	G	T	T	A	T	A	A	C	A	:	G	G
CT-4	G	T	T	A	T	A	A	C	A	:	G	G
CT-5	G	T	T	G	T	A	G	C	G	:	A	G
CT-6	G	T	T	G	T	A	A	C	A	:	G	G
CT-7	G	T	T	A	T	A	A	C	A	:	G	G
CT-8	G	T	T	A	T	A	A	C	A	:	G	G
CT-9	G	T	T	A	T	A	A	C	A	:	G	G
CT-10	G	T	T	A	T	A	A	C	G	:	A	G
CT-11	G	T	T	A	T	A	A	C	A	:	G	G
CT-12	G	T	T	G	T	A	G	C	G	:	A	G
CT-13	G	T	T	A	T	A	A	C	A	:	G	G
CT-14	G	T	T	A	T	A	A	C	A	:	G	G
CT-15	G	T	T	A	C	A	A	C	A	:	G	G
CT-16	G	T	T	A	C	A	A	C	A	:	G	G
CT-17	G	T	T	A	T	A	A	C	G	:	A	G
CT-18	G	T	T	A	T	A	A	C	A	:	G	G
n=18	0%	0%	0%	22,2%	11,1%	0%	11,1%	0%	22,2%	0%	22,2%	0%

Réaction Position Gène A.A.	FL12105 12414 ND5	FL12105 12501 ND5	FL14395 14470 ND6	FL14395 14569 ND6	FL14395 14587 ND6	FL14395 14620 ND6	FL14395 14766 Cyt. B Ile-Thr	FL14395 14793 Cyt. B His-Arg	FL14395 14798 Cyt. B Phe-Leu	FL14395 14870 Cyt. B Ile-Val	FL15786 15812 LHON Cyt. B Val-Ile
8705	T	G	T	G	A	C	T	A	T	G	G
8801	T	A	T	G	A	C	T	A	T	G	G
8809	T	G	T	G	A	C	C	A	T	G	G
8816	T	G	T	G	A	C	T	A	T	G	G
8906	T	G	T	G	A	C	T	G	T	G	G
8918	T	G	T	G	A	C	C	A	T	G	G
9001	T	G	T	G	A	C	C	A	T	G	G
9003	T	G	T	G	A	T	T	A	T	G	G
9004	T	G	T	G	A	C	T	A	T	G	G
9031	T	G	T	G	A	C	C	A	T	G	G
9034	T	G	T	G	A	C	T	A	C	G	G
9042	T	G	T	G	A	C	C	A	T	G	G
9101	T	G	T	G	A	C	C	A	T	G	G
9102	T	G	T	G	A	C	C	A	T	G	G
9114	T	G	T	G	A	C	C	A	T	G	G
9115	T	G	T	G	A	C	T	A	C	G	G
9118	T	G	T	G	A	C	C	A	T	G	G
9123	T	G	T	G	A	C	T	A	C	G	G
9125	T	A	T	G	A	C	T	A	T	G	G
9131	T	G	T	G	A	C	C	A	T	G	G
9132	T	G	T	G	A	C	T	A	C	G	G
9133	T	G	T	A	A	C	T	A	T	G	A
9137	T	G	T	G	A	C	T	A	C	G	G
9145	T	G	T	G	A	C	C	A	T	G	G
9212	T	G	T	G	A	C	T	A	C	G	G
9214	T	G	T	G	A	C	C	A	T	G	G
9215	T	G	T	G	A	C	C	A	T	G	G
9223	T	G	T	G	A	C	T	A	C	G	G
9242	T	G	A	G	A	C	C	A	T	G	G
9246	T	G	T	G	A	C	T	A	C	G	G
9247	T	A	T	G	A	C	T	A	T	G	G
9312	T	G	T	G	A	C	C	A	T	G	G
9321	T	G/A 40%	T	G	A	C	T	A	C	G	G
9322	T	G	T	G	A	C	C	A	T	G	G
9329	T	G	T	G	A	C	T	A	T	G	G
9334	T	G	T	G	A	C	T	A	T	G	G
9337	T	A	T	G	A	C	T	A	T	G	G
9344	T	G	T	G	A	C	C	A	T	G	G
9346	T	G	T	A	A	C	T	A	T	G	A
9402	T	G	T	G	A	C	C	A	T	G	G
9403	T	G	T	G	A	C	C	A	T	G	G
9405	T	G	T	G	A	C	C	A	T	G	G
9407	T	G	T	G	A	C	C	A	T	G	G
9408	T	G	T	G	A	C	C	A	T	G	G
9409	T	G	T	G	A	C	T	A	C	G	G
9423	T	G	T	A	A	C	T	A	T	G	A
9427	T	A	T	G	A	C	T	A	T	G	G
9428	T	G	T	G	A	C	C	A	T	G	G
9429	T	G	T	G	A	C	T	A	T	A	G
9437	T	G	T	G	A	C	C	A	T	G	G
n=50	0%	12%	2%	6%	0%	2%	48%	2%	20%	2%	4%
CT-1	T	G	T	G	A	C	T	A	C	G	G
CT-2	T	G	T	G	A	C	C	A	T	G	G
CT-3	T	G	T	G	A	C	C	A	T	G	G
CT-4	T	G	T	G	A	C	T	A	T	G	G
CT-5	T	G	T	G	A	C	T	A	C	G	G
CT-6	T	G	T	G	A	C	T	A	C	G	G
CT-7	T	G	T	G	A	C	C	A	T	G	G
CT-8	T	G	T	A	A	C	C	A	T	G	G
CT-9	T	G	T	G	A	C	C	A	T	G	G
CT-10	T	G	T	G	A	C	T	A	T	G	G
CT-11	C	G	T	G	A	C	T	A	T	G	G
CT-12	T	G	T	G	A	C	T	A	C	G	G
CT-13	T	G	T	G	A	C	C	A	T	G	G
CT-14	T	G	T	G	A	C	C	A	T	G	G
CT-15	T	G	T	G	A	C	T	A	T	G	G
CT-16	T	G	T	G	A	C	T	A	T	G	G
CT-17	T	G	T	G	A	C	T	A	T	G	G
CT-18	T	G	T	G	A	C	C	A	T	G	G
n=18	5,6%	0%	0%	5,6%	5,6%	0%	44,4%	0%	22,2%	0%	0%

Réaction	FL15786	FL15786	FL15786	FL15786	FL15786	FL15786	FL15786	FL15786	FL15786	FL15786	FL15786
Position	15884	15904	15907	15924LIMM	15928	15940	15946	16069	16093	16126	16129
Gène	Cyt. B	ARnt Thr	ARnt Thr	ARnt Thr	ARnt Thr	ARnt Thr	ARnt Thr	Non-codant	Non-codant	Non-codant	Non-codant
A.A.	Ala-Thr										
8705	G	C	A	A	G	T	C	C	T	T	G
8801	G	C	A	G	G	T	C	C	T	T	A
8809	G	C	A	A	G	T	C	C	T	T	G
8816	G	C	A	A	A	T	C	C	T	C	G
8906	G	C	A	A	G	T	C	C	T	T	G
8918	G	C	A	A	G	T	C	C	T/C 60%	T	A
9001	G	C	A	A	G	T	C	C	T	T	G
9003	G	C	A	A	G	T	C	C	T	T	G
9004	G	C	A	A	A	T	C	C	T	C	G
9031	G	C	A	A	G	T	C	C	T	T	G
9034	G	C	A	A	G	T	C	C	T/C 60%	T	G
9042	G	C	A	A	G	T	C	C	T	T	G
9101	G	C	A	A	G	T	C	C	T	T	G
9102	G	T	A	A	G	T	C	C	T	T	G
9114	G	C	A	A	G	T	C	C	T	T	G
9115	G	C	A	A	G	T	C	C	T/C 45%	T	G
9118	G	C	A	A	G	T	C	C	T	T	G
9123	G	C	A	A	G	T	C	C	T	T	G
9125	G	C	A	G	G	T	C	C	T	T	A
9131	G	C	A	A	G	T	C	C	T	T	G
9132	G	C	A	A	G	T	C	C	T/C 50%	T	G
9133	G	C	A	A	G	T	C	T	T	C	G
9137	G	C	A	A	G	T	C	C	T	T	G
9145	G	C	A	A	G	T	C	C	T	T	G/A 60%
9212	G	C	A	A	G	T	C	C	T/C 30%	T	G
9214	G	C	A	A	G	T	C	C	T	T	G
9215	G	C	A	A	G	T	C	C	T	T	G
9223	G	C	A	A	G	T	C	C	T	T	G
9242	G	C	A	G	G	T	C	C	T/C 50%	T	G
9246	G	C	A	A	G	T	C	C	T	T	G
9247	G	C	A	G	G	T	C	C	T	T	A
9312	G	C	A	A	G	T	C	C	T	T	G
9321	G	C	A	A	G	T	C	C	T/C 55%	T	G
9322	G	C	A	A	G	T	C	C	T	T	G
9329	G	C	A	A	G	T	C	C	T	T	G
9334	G	C	A	A	A	T	C	C	T	C	G
9337	G	C	A	G	G	T	C	C	T	T	A
9344	G	T	A	A	G	T	C	C	T	T	G
9346	G	C	A	A	G	T	C	C	T	T	G
9402	G	C	A	A	G	T	C	C	T	T	G
9403	G	C	A	A	G	T	C	C	T	T	G
9405	G	C	A	A	G	T	C	C	T	T	G
9407	G	C	A	A	G	T	C	C	T	T	G
9408	G	C	A	A	G	T	C	C	T	T	G
9409	G	C	A	A	G	T	C	C	T	T	G
9423	G	C	A	A	G	T	C	T	T	C	G
9427	G	C	A	G	G	T	C	C	T	T	A
9428	G	C	A	A	G	T	C	C	T	T	G
9429	G	C	A	A	A	T	C	C	T	C	G
9437	G	T	A	A	G	T	C	C	T	T	G
n=50	0%	6%	0%	12%	8%	0%	0%	4%	14%	12%	14%
CT-1	G	C	A	A	G	T	C	T	T	C	G
CT-2	G	C	A	A	G	T	C	C	T	T	G
CT-3	G	C	A	A	G	T	C	C	T	T	G
CT-4	G	C	A	A	G	T	C	C	T	C	G
CT-5	G	C	A	A	G	T	C	C	T	T	G
CT-6	G	C	A	A	G	C	C	T	T	C	G
CT-7	G	C	A	A	G	T	C	C	T	T	G
CT-8	A	C	A	A	G	T	C	C	T	T	G
CT-9	G	C	A	A	G	T	C	C	T	T	G
CT-10	G	C	G	A	G	T	C	C	T	T	C
CT-11	G	C	A	A	G	T	C	C	T	T	G
CT-12	G	C	A	A	G	T	T	C	T/C 50%	T	G
CT-13	G	C	A	A	G	T	C	C	T	T	G
CT-14	G	C	A	A	G	T	C	C	T	T	G
CT-15	G	C	A	A	A	T	C	C	T	C	G
CT-16	G	C	A	A	A	T	C	C	T	C	G
CT-17	G	C	A	A	G	T	C	C	T	T	G
CT-18	G	T	A	A	G	T	C	C	T	T	G
n=18	5,6%	5,6%	5,6%	0%	11,1%	5,6%	5,6%	11,1%	5,6%	27,8%	5,6%