

Mécanismes de maintenance de l'intégrité de l'ADN mitochondrial humain suite à des cassures double-brin Amandine Moretton

▶ To cite this version:

Amandine Moretton. Mécanismes de maintenance de l'intégrité de l'ADN mitochondrial humain suite à des cassures double-brin. Génétique humaine. Université Clermont Auvergne [2017-2020], 2017. Français. NNT : 2017CLFAC047 . tel-01729121

HAL Id: tel-01729121 https://theses.hal.science/tel-01729121

Submitted on 12 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers. L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Clermont Auvergne Année 2017

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE, SANTE, AGRONOMIE, ENVIRONNEMENT

Thèse

Présentée à l'Université Clermont Auvergne Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR d'UNIVERSITE

Spécialité : Physiologie et Génétique Moléculaire (Biologie Santé)

Présentée et soutenue publiquement par

Amandine MORETTON

le 8 décembre 2017

Mécanismes de maintenance de l'ADN mitochondrial humain suite à des cassures double-brin

Président :	Pr. Jean-Marc LOBACCARO, GReD, Clermont-Ferrand
Rapporteurs :	Dr. Anne DEVIN, Institut de Biochimie et Génétique Cellulaires, Bordeaux
	Dr. Guy LENAERS, PREMMi, CHU, Angers
Examinateurs :	Pr. Chantal WRUTNIAK-CABELLO, DMEM, Montpellier
	Dr. Emmanuel CHAUTARD, Centre Jean Perrin, Clermont-Ferrand
Membre invitée :	Dr. Aline Probst, GReD, Clermont-Ferrand
Directrice de thèse :	Dr. Géraldine FARGE , LPCplus, Clermont-Ferrand

Laboratoire LPCplus, équipe Radiobiologie - Intégrité des Génomes

Remerciements

Je tiens tout d'abord à exprimer mes remerciements à Géraldine Farge, ma directrice de thèse. Merci de m'avoir fait confiance pour ce projet et d'avoir partagé tes nombreuses connaissances expérimentales et théoriques. J'ai beaucoup apprécié l'autonomie que tu m'as laissée dans mon travail, tout en étant disponible pour mettre au point les expériences et analyser les résultats.

Merci également à Patrick Vernet de m'avoir accueilli dans son équipe. Je te remercie aussi pour ton optimisme, ta disponibilité et ton aide, surtout pour tous les préparatifs et formalités de fin de thèse.

Je remercie tous les membres du jury d'avoir évalué mon travail de thèse. Merci à Anne Devin et Guy Lenaers d'avoir accepté d'être rapporteurs et de donner de leur temps pour juger ce travail, ainsi qu'à Chantal Wrutniak-Cabello et Jean-Marc Lobaccaro pour leur contribution à ce jury de thèse. Aline Probst et Emmanuel Chautard, merci pour vos conseils tout au long de ma thèse, des comités de suivi à la soutenance.

Bien sûr je remercie toute l'équipe Radiobiologie - Intégrité des Génomes du LPCplus ainsi que les membres de l'ex-RGM. Vous m'avez tous aidée à un moment ou à un autre dans mes différentes expériences, et j'ai apprécié la bonne ambiance du labo! Layal je tiens à te remercier tout particulièrement pour ton aide et ta patience, c'est toi qui m'as formée sur la majorité des techniques et tu as été une collègue de bureau et d'ailleurs parfaite!

Je tiens également à remercier Maria Falkenberg et son équipe à Göteborg pour m'avoir accueillie à plusieurs reprises dans son labo, c'était très agréable de travailler dans cet environnement international et dynamique.

Merci aux membres du GReD et du LMGE qui m'ont aidée sur certaines techniques et dépannée lorsqu'il me manquait un produit, particulièrement Sophie Desset et Caroline Vacchias pour la microscopie, ainsi que Hermine Billard et Lia Leccia pour la cytométrie. Lia merci également pour tous les bons moments au labo et en-dehors, j'ai été heureuse de participer à des étapes importantes de ta vie!

Amandine, Houda, Judith, Layal, Lia : Merci Ragazze pour les pauses thé, c'est en grande partie grâce à vous que je vais garder un bon souvenir de cette épopée.

Enfin je remercie tous ceux qui m'ont soutenue en dehors du labo. Ma famille et mes amis qui m'ont envoyé des ondes positives pendant la soutenance et n'ont (presque!) pas dormi alors qu'ils n'y comprenaient rien, et tous ceux qui n'ont pas pu venir mais ont su me changer les idées et m'encourager. Maman ton soutien sans faille compte beaucoup, merci d'être toujours là pour moi et de savoir aussi bien me remonter le moral! JeanMi, merci pour tes encouragements pour mes projets professionnels bien que cela te demande des compromis, merci pour ta compréhension et ton soutien!

Résumé

Les mitochondries sont des organites qui possèdent leur propre ADN (ADNmt), codant pour des gènes de la chaine respiratoire. La réparation des dommages dus aux ROS, une réplication défectueuse ou d'autres sources exogènes tels des agents chimiothérapeutiques ou des irradiations ionisantes peuvent générer des cassures double-brin (CDB) de l'ADNmt. L'ADNmt code pour des protéines essentielles à la production d'énergie, et des systèmes de maintenance de l'intégrité de ce génome efficaces sont donc nécessaires pour la viabilité des cellules. En effet des mutations de l'ADNmt sont présentes dans de nombreuses pathologies comme les myopathies mitochondriales, les cancers et les maladies neurodégénératives. Cependant les processus responsables de la maintenance de l'ADNmt suite à des CDB restent controversés.

Pour élucider les mécanismes impliqués, nous avons généré des CDB mitochondriales en utilisant une lignée cellulaire humaine exprimant de manière inductible l'enzyme de restriction PstI liée à une séquence d'adressage mitochondrial. Nos résultats montrent, dans notre système, une première phase de dégradation de l'ADNmt lésé avec une cinétique rapide, n'impliquant pas l'autophagie ou l'apoptose, suivie de la ré-amplification d'ADNmt intact dans un deuxième temps. Contrairement à d'autres études nous n'avons pas pu détecter d'évènements de réparation des CDB mitochondriales générées. Nous avons ensuite cherché à identifier les protéines impliquées dans la dégradation de l'ADNmt lésé que nous observons, mais aucune nucléase testée ne semble responsable de ce processus. Des approches plus globales sont mises au point pour identifier de nouveaux acteurs, notamment un crible RNAi à grande échelle. Parallèlement nous nous intéressons aussi à une famille de phosphohydrolases, les Nudix, et à leur rôle protecteur en assainissant le réservoir de nucléotides libres.

Mots clés : ADN mitochondrial, cassures double-brin, dégradation de l'ADN, réparation de l'ADN

Abstract

Maintenance of human mitochondrial DNA after double-strand breaks

Mitochondria are organelles that possess their own genome, the mitochondrial DNA (mtDNA). Repair of oxidative damages, defective replication, or various exogenous sources, such as chemotherapeutic agents or ionizing radiations, can generate double-strand breaks (DSBs) in mtDNA. MtDNA encodes for essential proteins involved in ATP production and maintenance of integrity of this genome is thus of crucial importance. Mutations in mtDNA are indeed found in numerous pathologies such as mitochondrial myopathies, neurodegenerative disorders or cancers. However, the mechanisms involved in mtDNA maintenance after DSBs remain unknown.

To elucidate this question, we have generated mtDNA DSBs using a human inducible cell system expressing the restriction enzyme PstI targeted to mitochondria. Using this system, we could not find any support for DSBs repair of mtDNA. Instead we observed a loss of the damaged mtDNA molecules and a severe decrease in mtDNA content, followed by reamplification of intact mtDNA molecules. We have demonstrated that none of the known mitochondrial nucleases are involved in mtDNA degradation and that DNA loss is not due to autophagy, mitophagy or apoptosis but to a selective mechanism. Our study suggests that a still uncharacterized pathway for the targeted degradation of damaged mtDNA in a mitophagy/autophagy-independent manner is present in mitochondria, and might provide the main mechanism used by the cells to deal with DSBs. Global approaches are ongoing to identify proteins involved in degradation of damaged mtDNA following DSBs, mainly an RNAi screen targeting 80 nucleases. In parallel we are interested in a family of phosphohydrolases named Nudix and their putative protective role in sanitizing the nucleotides pool in mitochondria.

Key words : mitochondrial DNA, double-strand breaks, DNA degradation, DNA repair

Table des matières

Li	ste de	te des figures vi																	
Li	Liste des tableaux vii																		
Li	ste de	s figure	s supplémenta	ires															viii
Li	ste de	s abrévi	ations																ix
Ι	Int	roduct	ion bibliogr	aphique															1
1	Les	mitocho	ndries																2
	1.1 1.2 1.3 1.4	Origino Structu Voies r Apopto	e re et dynamiqu nétaboliques . ose		· · · · · ·	· · · · · ·	 		 	 		 	 	•	• • •	· · · ·		•	2 3 4 5
2	ADN	N mitocl	ondrial																7
	2.1 2.2 2.3	Organi Comm Transc	sation du géno unication noya ription mitocho	me mitocho u-mitochon ondriale	ondrial . ndries .	 	 		 	· ·	• •	•••	· ·	•		 		•	. 7 . 8 . 9
	2.42.5	Réplica 2.4.1 2.4.2 Régula	ation de l'ADN Modèles de ré Le réplisome tion	mitochond plication . mitochond	1rial rial	· · · · · ·	· · · · · ·		· · · · · ·	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	• • •	· · · · · ·	· ·			· · · ·		•	11 11 12 14
2	Mal	adias m	tachandrialac																16
5	3.1 3.2 3.3	Génétic Maladi 3.2.1 3.2.2 Diagno	que mitochondri es mitochondri Mutations de Mutations de	riale ales l'ADN mit gènes nucle	ochondr éaires	· · ial · ·	· · · · · ·		· · · · · ·	· · · · · ·		· · · · · ·	· · ·	•		 		•	16 16 17 17 17 19 21
4	Mai 4.1 4.2	ntenanc Mainte Répara 4.2.1 4.2.2	e de l'ADN m nance du réser tion des domm Réparation de Réparation de	itochondri voir de nuc ages de l'A es bases enc es cassures	al léotides ADN lommag simple-t	••• ••• ••rin	 		 	 		 	 			 		•	23 23 25 25 25 28
		4.2.3	Réparation de	s cassures (double-t	orin	• •	•			•	•••	• •	•	•		•	•	. 2

	4.4	Systèn	ne de génération expérimentale de cassures double-brin	35
		4.4.1	Non ciblées	35
		4.4.2		36
0	bject	tifs du	projet de recherche	38
II	Μ	atérie	l et Méthodes	39
1	Cult	ture cell	lulaire	40
	1.1	Entreti	ien des cellules	40
	1.2	Etablis	ssement du système de cassures inductibles	40
	1.3	Transf	ection de siRNA	41
	1.4	Transf	ection de plasmides (localisation)	42
2	Ana	lvses su	r les acides nucléiques	43
	2.1	Extrac	tion d'ADN	43
	2.2	Extrac	tion d'ARN et transcription inverse	43
	2.3	Southe	ern Blot	43
	2.4	PCR q	uantitative en temps réel	44
	2.5	Etude	des sites PstI résistants par digestion in vitro	44
	2.6	Next C	Jeneration Sequencing	45
	2.7	Séque	nçage par clonage et analyse des colonies	45
3	Ana	lyses pr	otéiques	47
	3.1	Extrac	tion de protéines	47
	3.2	Wester	m Blot	47
	3.3	Fractio	onnement	47
	3.4	Dosag	e de l'activité du complexe IV	48
4	Mic	roscopi	e et cytométrie en flux	50
	4.1	Micros	scopie en épifluorescence	50
	4.2	Cytom	iétrie en flux	51
5	Etno	de de pr	rotéines recombinantes	53
e	5.1	Expres	ssion et purification des protéines recombinantes	53
	5.2	Dosag	e de l'activité NTPase	54
6	Ana	lyses sta	atistiques	55
II	I R	lésulta	ıts	56
1	Gén	ération	de cassures double-brin mitochondriales	57
	1.1	Induct	ion de cassures double-brin mitochondriales	57

Dégradation de l'ADN mitochondrial

33

4.3

2	Rép	onses cellulaires aux CDBmt	59
	2.1	Dégradation de l'ADNmt	59
		2.1.1 Elimination de l'ADNmt lésé	59
		2.1.2 Impacts mitochondrial et cellulaire	60
		2.1.3 Fonctionnement de la chaine respiratoire	62
	2.2	Ré-amplification de l'ADNmt	63
	2.2	2.2.1 Ré-amplification de molécules d'ADNmt intactes	63
		2.2.1 Re unprincipal de horecules à Abrant inductes	65
		2.2.3 Analyse des sites de restriction après ré-amplification	66
3	Acte	eurs de la maintenance de l'ADNmt après CDB	68
U	3.1	Approche protéines candidates	68
	2.11	3.1.1 Nucléases mitochondriales	68
		3.1.2 POL \propto	70
		3.1.2 Nucléases potentiellement mitochondriales	71
		3.1.4 Protéines potentiellement impliquées dans la réparation mitochondriale	73
	32	Approche globale	74
	5.2	3.2.1 Protéomique	74
		$3.2.1 \text{Froteomque} \qquad \dots \qquad $	74
	22	5.2.2 Choic NNAI \ldots 5.2.2 Choic NNAI \ldots 5.2.2 Choic NNAI \ldots 5.2.2 Detantial rôle protecteur des Nudix \cdot NUDT6 at NUDT10	75 77
	5.5	3.3.1 Localization	יי דד
		3.3.1 Localisation	78
		3.3.2 Activité à hydrolyse des nucleondes	78
			70
IV	D	viscussion et perspectives	81
1	Syst	ème de génération de CDBmt	82
	1.1	Un système inductible à adressage mitochondrial	82
	1.2	Choix de l'enzyme de restriction	83
	1.3	Perte de l'expression de PstI	84
•	D/		07
2	Кер	onses cellulaires aux CDBmt	85
	2.1	Resultats controverses sur la reparation des CDBmt	85
	2.2		86
	2.3	Quantité de CDBmt et réponses cellulaires	87
	2.4	Elimination de l'ADNmt endommagé	88
		2.4.1 Implication de l'autophagie et de l'apoptose	88
	_	2.4.2 Etude de la dégradation enzymatique de l'ADNmt	89
	2.5	Ré-amplification d'ADNmt intact	91
3	Pers	spectives	93
	3.1	Présence de protéines de la réparation nucléaire dans les mitochondries	93
	3.2	EXD2 : rôle mitochondrial ou nucléaire?	93
	3.3	Rôles des Nudix mitochondriales	94
	3.4	Crible RNAi	95

Annexes	97
Article 1	97
Article 2	115
Article 3	125
Figures supplémentaires	139

147

Bibliographie

Table des figures

1	Structure d'une mitochondrie	3
2	Dynamique mitochondriale	3
3	Acteurs de la dynamique mitochondriale	4
4	Phosphorylation oxydative	4
5	Apoptose	5
6	Voies extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose	5
7	ADN mitochondrial humain	7
8	Transcription mitochondriale	10
9	Modèles de la réplication mitochondriale	11
10	Réplisome mitochondrial	12
11	Structure de la principale région non codante de l'ADNmt	14
12	Corrélation ADNmt-TFAM	15
13	Goulet d'étranglement mitochondrial	17
14	Carte génétique des maladies liées à des mutations de l'ADNmt	18
15	Voies de synthèse des nucléotides	23
16	Assainissement du réservoir de nucléotides par MTH1	25
17	Réparation par excision de base dans la mitochondrie	26
18	Réparation des CDB nucléaires par HR	30
19	Réparation des CDB nucléaires par NHEJ	31
20	Autophagie	33
21	Mitophagie	34
22	Système Tet	36
23	Objectifs de la thèse	38
24	Plan de plaque du crible RNAi	42
25	Exemple de courbe étalon pour le gène mtCYTB en qPCR	45
26	Séquençage du site PstI par clonage et analyse des colonies	46
27	Analyse de la masse mitochondriale par cytométrie en flux	51
28	Analyse de l'apoptose par cytométrie en flux	51
29	Analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux	52
30	Plasmide utilisé pour le clonage des protéines recombinantes Nudix	53
31	Pureté de la protéine NUDT19 purifiée sur colonne de nickel	53
32	Purification de la protéine NUDT19 par gel filtration	54
33	Purification de la protéine NUDT19 sur colonne héparine	54
34	Dosage du phosphate libre à l'aide du kit Malachite Green Phosphate Assay	54
35	Stratégie d'induction de CDBmt	57
36	Induction de CDBmt suite à différents temps de traitement avec la doxycycline	57
37	Etude des CDB nucléaires lors de l'induction de l'expression de PstI	58
38	Evolution du système PstI au cours du temps	58
39	Dégradation de l'ADNmt après CDB	59

40	Expression du transcrit PstI	59
41	Impact des CDBmt sur la structure mitochondriale	60
42	Impact des CDBmt sur le réseau mitochondrial	60
43	Impact des CDBmt sur l'expression de protéines de la maintenance de l'ADNmt	61
44	Visualisation de la perte d'ADNmt par microscopie en épifluorescence	61
45	Analyse de la mitophagie et de l'autophagie après génération de CDBmt	61
46	Etude de la survie cellulaire après induction de CDBmt	62
47	Impact des CDBmt sur les protéines de la chaine respiratoire	62
48	Ré-amplification d'ADNmt après la dégradation d'ADNmt suite à des CDBmt .	63
49	Mesure de l'activité du complexe IV après dégradation de l'ADNmt	63
50	Etude de la réplication suite à des CDBmt	64
51	Visualisation de la réplication de l'ADN	64
52	Ré-amplification d'ADNmt après deux inductions de PstI	65
53	Expression du transcrit PstI après une deuxième induction	65
54	Analyse des sites de restriction PstI par digestion <i>in vitro</i>	66
55	Variation des niveaux des nucléases mitochondriales après génération de CDBmt	68
56	siRNA des gènes de nucléases mitochondriales : effet sur la dégradation de	
	l'ADNmt	69
57	Efficacité des siRNA ciblant les nucléases mitochondriales	69
58	Blocage de la réplication nucléaire par traitement avec le ddC	70
59	Effet du blocage de POL γ sur la dégradation rapide de l'ADNmt suite à des CDB	70
60	Localisation de protéines à activité nucléase potentiellement mitochondriales	71
61	siRNA des gènes des protéines SND1, DFFB et EXD2 : effet sur la dégradation	
	de l'ADNmt	72
62	Localisation d'EXD2 après génération de cassures de l'ADN nucléaire	73
63	Localisation de protéines de la réparation des CDB nucléaires	73
64	Localisation de protéines de réparation nucléaires par microscopie	74
65	Représentation graphique des résultats de protéomique	74
66	Test crible RNAi	76
67	Vérification manuelle du test crible RNAi	76
68	Localisation de NUDT6 en microscopie	77
69	Localisation de NUDT19 en microscopie	77
70	Activités d'hydrolyse de nucléotides des Nudix NUDT6 et NUDT19	78
71	Activité d'hydrolyse de nucléotides de NUDT19, en variant cofacteur et pH	78
72	Quantification de l'ADNmt dans les cellules KO NUDT6	79
73	Temps de doublement des cellules KO NUDT19	79
74	Quantification de l'ADNmt dans les cellules KO NUDT19	79
75	Structure et fonctionnement des mitochondries dans les cellules KO NUDT19.	80
76	Etude de l'apoptose dans les cellules KO NUDT19	80
77	Etude du cycle cellulaire dans les cellules KO NUDT19	80
78	Cassures de l'ADNmt suite à un traitement par la bléomycine	82
79	Test d'induction de CDBmt avec l'enzyme de restriction PvuII	84
80	Délétions de l'ADNmt obtenues après induction de CDBmt dans un modèle murin	85
81	Analyse <i>in vitro</i> de la capacité de réparation des CDBmt humaines	85
82	Localisation de NUDT19 à l'aide du microscope Zeiss LSM 800	94
83	Crible RNAi partiel et implication de MGME1 dans la dégradation de l'ADNmt	96

Liste des tableaux

1	siRNA utilisés	41
2	Sondes utilisées pour les Southern Blots	44
3	Amorces PCR et qPCR utilisées	44
4	Amorces utilisées pour l'amplification des fragments PstI	45
5	Amorces utilisées pour l'amplification des fragments PstI avant NGS	45
6	Anticorps primaires utilisés	47
7	Anticorps secondaires utilisés	48
8	Séquençage NGS du site de restriction PstI situé dans le gène COX1	66
9	Séquençage des sites de restriction PstI par clonage de l'ADN dans des plas-	
	mides et transfection de bactéries	67
10	Bilan de la localisation de protéines de la réparation des CDB nucléaires	73

Liste des figures supplémentaires

Analyse du profil d'ADNmt de 5 clones de cellules HEK PstI	140
Vérification de la reproductibilité de l'induction de PstI	140
Activité aspécifique de PstI in vitro	141
Expression de protéines mitochondriales jusqu'à 6 jours post-induction	141
Visualisation de la perte d'ADNmt par microscopie en épifluorescence	142
Croissance des cellules après induction des CDBmt	142
Localisation des nucléases par Western Blot	143
Structure de la didéoxycytidine (ddC)	143
Efficacité des siRNA ciblant les candidates de la dégradation de l'ADNmt suite	
à des CDB	143
Fractions mitochondriales analysées en protéomique	144
Impact de la composition du fond des plaques 96 puits sur les ratios d'intensités	
de fluorescence TFAM/ DAPI	144
Impact du nombre de cellules analysées sur les ratios d'intensités de fluores-	
cence TFAM/ DAPI	145
Vérification de l'absence d'expression de NUDT6 dans les cellules HAP1 KO	
NUDT6	145
Vérification de l'absence d'expression de NUDT19 dans les cellules HAP1 KO	
NUDT19	146
	Analyse du profil d'ADNmt de 5 clones de cellules HEK PstI

Liste des abréviations

5 -POA 5 -phospho α , β -unsaturated aldenyde	
5' dDD 5' dágovurihogonhogonhota	
S -ukr S -uesoxy1100sophosphate	
8-0x0-(u)011 8-0x0-2 (des0xy)guallosilie-5 inpliosphate	
A additional additiona	
ADN acida désovuribonucléique	
ADN actue desoxynoondererque	
ADNC ADN complementatie	
ADINIIII ADIN IIII Ocholiuliai ADD adánosina dinhosnhata	
ADP autosome upnosphate	
AdPEO autosomai dominant progressive external opnialmopleg	gia
AGO argonaute	
AIF apoptosis inducing factor	
AMP adenosine monophosphate	
A-NHEJ alternative non-homologous end-joining	
ANT adenine nucleotide translocase	
AP apurinic/apyrimidinic	
Apaf1 apoptotic protease activating factor 1	
APE1 AP endonuclease	
APP amyloid beta precursor protein	
APTX aprataxin	
ARN acide ribonucléique	
ARNm ARN messager	
ARNr ARN ribosomique	
ARNt ARN de transfert	
ATG autophagy-related protein	
ATM ataxia telangiectasia mutated protein	
ATP adénosine triphosphate	
ATR ataxia telangiectasia and Rad3-related protein	
Bad Bcl-2- associated agonist of cell death	
Bak Bcl2 - homologous antagonist/ killer	
BamHI Bacillus amyloliquefaciens H restriction enzyme	
Bax Bcl-2 - associated X protein	
Bcl2 B-cell lymphoma 2 protein	
Bcl-xl B-cell lymphoma - extra large protein	
BECN1 beclin-1	
BER base excision repair	
Bid BH3 interacting-domain death agonist	
Bim Bcl-2-like protein 11	

BIR	break-induced repair
BLM	Bloom syndrome protein
BNIP3	BCL2 and adenovirus E1B 19-kDa-interacting protein 3
BNIP3L	BNIP3-like protein
BRCA2	breast cancer type-2 susceptibility protein
Brin H	brin heavy
Brin L	brin light
BrU	5-bromouridine
BSA	bovine serum albumin
С	cytosine
CAD	caspase-activated DNase
CCCP	carbonylcyanure m-chlorophénylhydrazone
CDB	cassure double-brin
CDBmt	cassure double-brin de l'ADNmt
C-NHEJ	classic non-homologous end-joining
CoA	coenzyme A
COX	cytochrome c oxidase
CPEO	chronic progressive external ophtalmoplegia
CSB	cassure simple-brin
CSB1/2	conserved sequence block 1/2
Ct	cycle threshold
CtIP	C-terminal interacting protein
СТР	cytosine Triphosphate
CytB	cytochrome B
dĂ	désoxyadenosine
DAPI	4', 6-diamidino-2-phenylindole
dC	désoxycytidine
dCK	désoxycytidine kinase
dCTP	désoxycytosine triphosphate
DFFB	DNA fragmentation factor subunit beta
dG	désoxyguanosine
dGK	désoxyguanosine kinase
dGK	désoxyguanosine kinase
dL	désoxyribolactone
D-loop	displacement loop
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	dimethyl sulfoxide
DNA2	DNA replication helicase/nuclease 2
DNA-PKcs	DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit
DNase	désoxyribonucléase
dNMP	désoxynucléoside monophosphate
dNTP	désoxynucléotide triphosphate
dRP	désoxyribosophosphate
Drp1	dynamin-related protein 1
dT	désoxythymidine
DTT	dithiothreitol
dTTP	désoxythymidine triphosphate
dU	désoxyuridine

EDTA	ethylène diamine tétraacétique
EcoRI	E. Coli restriction enzyme
EdU	5-ethynyl-2'-deoxyuridine
ENDOG	endonuclease G
ERCC1	excision repair cross-complementing protein 1
EXD2	exonuclease 3'-5' domain—containing protein 2
Exo1	exonuclease 1
EXOG	exonuclease G
FADH	flavine adénine dinucléotide
FADH ₂	forme réduite de la flavine adénine dinucléotide
FBXL4	F-box and leucine-rich repeat protein 4
FEN1	flap structure-specific endonuclease 1
Flp	flipase
FokI	<i>Flavobacterium okeanokoites</i> 1 restriction enzyme
FRT	Fin recombination target
FSC	forward scatter
FUNDC1	FUN14 domain-containing protein 1
G	guanine
GEP	green fluorescent protein
GMP	guanine monophosphate
GTP	guanine triphosphate
GTPasa	guannie triphosphate
UTFASE	bistone 2.4. member V
	historie 2A, member A
	hapioid cell life 1
HEK293	A (2 hydrowysthyl) 1 ninerozinaetheneoylfania asid
HEPES	4-(2-nydroxyetnyi)-i-piperazineetnanesuironic acid
HMG	high mobility group
HK	nomologous recombination
HSP	heavy strand promoter
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Media
IMP	inosine monophosphate
KSS	Kearns-Sayre syndrome
LC3	microtubule-associated protein 1A/1B light chain 3
Leu	leucine
LHON	Leber hereditary optic neuropathy
LIR	LC3-interacting region
LONP1	Lon protease-like protein
LP-BER	long patch-BER
LRPPRC	leucine-rich pentatricopeptide repeat containing protein
LSP	light strand promoter
Lys	lysine
MELAS	mitochondrial encephalomyopathy with lactic acidosis and stroke-like episodes
MERRF	myoclonic ataxia and epilepsy with ragged red fibers
Mfn	mitofusin
MGME1	mitochondrial genome maintenance exonuclease 1
MGMT	O6-methyl-guanine ADN methyl transferase
miARN	microARN
MID	multiplex identifier

MILS	maternally inherited Leigh syndrome
MLH	MutL homolog 1
MMEJ	microhomology-mediated end-joining
M-MLV	Moloney murine leukemia virus
MMR	mismatch repair
MNGIE	mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy
MPP	mitochondrial processing peptidase
Mre11	meiotic recombination 11 homolog 1
MRG	mitochondrial RNA granule
MRN	Mre11-RAD50-Nbs1 complex
MRP	mitochondrial RNA-processing enzyme
MSH	MutS protein homolog
MTH1	MutT homolog 1
MTORC1	mechanistic target of rapamycin complex 1
MTS	mitochondria targeting sequence
mtSSB	mitochondrial single stranded DNA-binding protein
mtTOP	mitochondrial topoisomerase
MUTYH	MutY homolog
NAD ⁺	nicotinamide adénine dinucléotide
NADH	forme réduite de NAD ⁺
NARP	neuropathy, ataxia and retinis pigmentosa
Nbs1	nibrin
ND	NADH dehydrogenase subunit
NEIL	Nei(<i>E. Coli</i> endonuclease VIII)-like
NER	nucleotid excision repair
NGS	next generation sequencing
NHEI	non-homologous end-joining
NRF	nuclear transcription factor
N-ter	N-terminal
NTH1	Nth(F_{Coli} endonuclease III)-like 1
Nudix	nucleoside diphosphate linked to X
NUDT1	Nudix hydrolase
OGG1	8-oxoguanine DNA glycosylase
OPA 1	ontic atrophy 1
OriH	origine de réplication du brin H
OriI	origine de réplication du brin I
OXPHOS	ovidative phosphorylation
DAR	noly(ADP ribose)
	presentlin-associated rhomboid-like protease
	poly(ADP ribose) polymerase
DRS	phosphote buffered soline
	proliferating cell nuclear antigen
DCD	polymerase chain reaction
PCK PCC1	porymerase chain reaction
DI DI	perovisione promerator-activated receptor gamma coactivator 1
rı Di	propidium iodide
	phosphate morganique
FISK DINK 1	prosphandylinositol 3-kinase-related kinase
PINKI	PTEN-induced putative kinase T

phenylmethane sulfonyl fluoride
polynucleotide Kinase 3'-Phosphatase
Polymerase
RNA polymerase, mitochondrial
pentatricopeptide
primase and polymerase
proline
5-phospho- α -D-ribosyl 1-pyrophosphate
Pearson syndrome
Providencia stuartii restriction enzyme
phosphatidylinositol 3-kinase complex
permeability transition pore
quantitive PCR
radiation sensitive protein
RB1-inducible coiled-coil protein 1
ribonucleotide excision repair
RNA-induced silcencing complex
ribonucleotide incorporation throughout the lagging strand
résonnance magnétique nucléaire
ribonuclease
RNA interference
ribonucleotide reductase
reactive oxygen species
replication protein A
reverse tetracycline-controlled transactivation protein
SAM domain and HD domain-containing protein 1
Streptomyces caespitosus restriction enzyme
cytochrome c oxidase assembly protein
sodium dodecyl sulfate
synthesis-dependent strand annealing
silencing RNA
solute carrier
Serratia marcescens 1 restriction enzyme
staphylococcal nuclease domain-containing protein 1
single-nucleotide polymorphism
short-patch BER
single-strand annealing
single-strand break repair
side scatter
succinyl-CoA ligase
surfeit locus protein 1
sérum de veau foetal
thymine
transcription activator-like effector
ranscription activator-like effector nuclease
TATA box binding protein
Tris-buffered saline + Tween20
tyrosyl-ADN phosphodiesterase

TEFM	transcription elongation factor, mitochondrial
Tet	tetracycline
TetR	tetracycline repressor
TFAM	transcription factor A, mitochondrial
TFB1/2M	transcription factor B1/2, mitochondrial
TK1	thymidine kinase
TLS	translesion synthesis polymerase
TNF	tumor necrosis factor
TOMM20	translocase of outer mitochondrial membrane 20
TP	thymidine phosphorylase
TRE	tetracycline response element
TS	thymidylate synthase
tTa	tetracycline-controlled transactivator protein
TTP	thymine triphosphate
U2OS	human bone osteosarcoma epithelial cell line
ULK	unc-51 like autophagy activating kinase
UMP	uracil monophosphate
UNG1	uracil-DNA glycosylase 1
UTP	uracil triphosphate
UV	ultraviolet
VDAC	voltage-dependent anion channels
WRN	Werner syndrom protein
WT	wild-type
XLF	XRCC4- like factor
XPF	xeroderma pigmentosum, group F complementing protein
XRCC	X-ray repair cross-complementing protein
YB-1	Y-box binding protein 1
ZFN	zinc finger nuclease
Première partie

Introduction bibliographique

Chapitre 1

Les mitochondries

Les mitochondries sont des organites présents dans le cytoplasme de presque toutes les cellules eucaryotes, en nombre très variable d'un tissu et d'un type cellulaire à l'autre. Ainsi les hématies sont dépourvues de mitochondries alors que les cellules musculaires peuvent en contenir plus de 2000. La majeure partie de l'énergie nécessaire à la cellule est produite dans ces organites sous forme d'adénosine triphosphate (ATP), grâce au cycle de Krebs, à la phosphorylation oxydative (OXPHOS) et à la β -oxydation des acides gras. Les mitochondries jouent aussi un rôle crucial dans d'autres processus cellulaires, notamment l'apoptose. La particularité de ces organites est qu'ils possèdent leur propre ADN, double-brin et circulaire chez l'Homme. Il est présent en plusieurs exemplaires dans chaque mitochondrie et code pour un nombre restreint de protéines essentielles à la chaine respiratoire et d'ARNs nécessaires à leur traduction. La majorité des protéines présentes dans les mitochondries est codée par le génome nucléaire et ensuite importée, un dialogue entre les deux génomes est donc nécessaire. De nombreuses maladies impactant le fonctionnement des mitochondries ont été identifiées, avec des causes génétiques pouvant venir de défauts du génome mitochondrial ou nucléaire, touchant directement les gènes impliqués dans la production d'énergie ou altérant la maintenance de l'ADN mitochondrial (ADNmt).

1.1 Origine

La présence d'un génome propre aux mitochondries ainsi que les nombreuses similitudes entre ces organites et des bactéries supportent l'hypothèse de la théorie endosymbiotique : il y a environ 2 milliards d'années, lorsque l'atmosphère primitive s'est enrichie en oxygène, des cellules procaryotes (α -Protéobactérie) auraient fusionné avec des cellules hôtes de type Archae et établi une relation endosymbiotique (Sagan-Margulis, 1967). Au cours de l'évolution la majorité des gènes de l'endosymbiote a été transférée vers le génome nucléaire, avec en parallèle le développement de translocases pour amener les protéines à l'intérieur de la mitochondrie après synthèse dans le cytosol, et les gènes redondants ont été perdus. Plusieurs hypothèses existent pour expliquer que tous les gènes mitochondriaux n'ont pas été transférés alors que la cellule doit maintenir un système spécifique pour la réplication et l'expression de l'ADNmt. Tout d'abord certaines protéines codées par l'ADNmt, comme COX1 et CytB, ne pourraient peut-être pas être importées à travers les membranes mitochondriales à cause de leur nature fortement hydrophobe (von Heijne, 1986). Ensuite la comparaison entre les séquences génétiques et protéiques des protéines codées par l'ADNmt a révélé un code génétique légèrement différent du code génétique nucléaire standard, comprenant des différences dans l'usage de codons et un nombre réduit d'ARN de transfert (ARNt), ce qui a pu limiter le transfert de gènes





En haut : Cellule humaine de fibroblaste observée par microscopie en épifluorescence. Les mitochondries sont marquées à l'aide d'un anticorps dirigé contre la protéine TOMM20 (rouge), localisée dans la membrane externe et l'ADNmt à l'aide d'un anticorps dirigé contre l'ADN (vert). L'ADN nucléaire est marqué à l'aide de DAPI (bleu). Adapté de (Kukat *et al.*, 2011). En bas à gauche : Mitochondrie de foie observée au microscope électronique. En bas à droite : Représentation schématique d'une mitochondrie. Adapté de (Alberts *et al.*, 2002).



FIGURE 2 – Dynamique mitochondriale

Observation de cardiomyocytes en microscopie confocale. Les mitochondries ont été marquées à l'aide de la sonde MitoTracker Green, sur des cellules traitées avec la norepinephrine pour 0 ou 24h, un composé qui induit la fission mitochondriale. Les images de droite sont des grossissements des images de gauche (barre d'échelle : 10μ m) (Pennanen *et al.*, 2014).

vers le noyau (Huot *et al.*, 2014). Une dernière hypothèse, la plus probable, propose que la colocalisation dans la mitochondrie de certains gènes et de leurs produits permet une régulation directe de l'expression de ces gènes, notamment par les niveaux de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) produits, et donc un avantage sélectif grâce à une adaptation rapide à la demande bioénergétique (Allen, 2003, 2017).

1.2 Structure et dynamique

Les mitochondries comportent deux membranes qui délimitent trois compartiments : le milieu extra-mitochondrial, c'est-à-dire le cytoplasme de la cellule, l'espace intermembranaire et la matrice mitochondriale (Alberts et al., 2002) (Figure 1). La membrane mitochondriale externe contient un grand nombre de protéines membranaires, les porines, formant des canaux aqueux permettant aux petites molécules hydrophiles de traverser la bicouche lipidique. L'import de protéines possédant des signaux d'adressage mitochondrial se fait lui grâce à des translocases (Herrmann et Neupert, 2000). La membrane interne est repliée et forme des invaginations appelées « crêtes mitochondriales ». Ces crêtes augmentent la surface de la membrane interne par rapport à celle de la membrane externe et permettent une plus grande capacité respiratoire. La morphologie des mitochondries, et notamment des crêtes, est variable d'un type cellulaire à l'autre et influe sur le fonctionnement mitochondrial (Mannella, 2006). Il a été montré que les cellules produisant beaucoup d'énergie, comme les cellules musculaires ou neuronales, possèdent une membrane interne avec plus de replis. Cette membrane est peu perméable, la majorité des molécules et des protéines doivent être transportées activement. Les différents complexes de la chaine respiratoire ainsi que l'ATP synthase sont ancrées dans la membrane interne. La matrice mitochondriale contient quant à elle la majorité des protéines mitochondriales, dont des ribosomes spécifiques, ainsi que des ARNs de transfert et plusieurs copies d'ADNmt (Fox, 2012).

Les mitochondries sont organisées en un réseau dynamique dans le cytosol de la cellule. La morphologie du réseau mitochondrial est régulée par les phénomènes de fission et de fusion et est cruciale pour de nombreux processus biologiques (Figure 2). La fission est nécessaire avant la division cellulaire afin de répartir les mitochondries dans les cellules filles, elle permet aussi d'isoler les organites défectueux afin qu'ils soient par exemple éliminés par autophagie (Twig et al., 2008). La fusion quant à elle permet une meilleure répartition des métabolites et des protéines ainsi que de l'énergie cellulaire produite, les cellules avec un métabolisme très actif ont fréquemment un réseau mitochondrial très connecté. Ce processus permet aussi de mélanger le contenu des différentes mitochondries de la cellule et notamment les molécules d'ADNmt. Celles-ci peuvent exister sous différentes formes, un état connu sous le nom d'hétéroplasmie. La fusion des mitochondries permet de contrer les déficiences de la chaine respiratoire dues à des molécules d'ADNmt mutées en permettant la complémentation par des protéines ou des ARNs codés par des molécules d'ADNmt où les gènes sont fonctionnels (Youle et Van Der Bliek, 2012; Ishihara et al., 2015). Des guanosines triphosphatases (GTPases) appartenant à la famille des dynamines sont principalement impliquées dans les mécanismes de fusion ou fission mitochondriales. Elles sont relativement bien conservées entre levure, Drosophile et Homme. Drp1 est le principal acteur de la fission : cette protéine est localisée dans le cytosol et est recrutée à la membrane externe mitochondriale à l'aide de protéines adaptatrices, où elle s'oligomérise et permet la constriction des membranes suivie par la fission en deux mitochondries (Otera et al., 2013). Le mécanisme de fusion nécessite quant à lui la fusion des membranes externes puis des membranes internes. Les mitofusins Mfn1 et Mfn2, ancrées à la membrane externe par des domaines transmembranaires, permettent de fusionner les bicouches lipidiques de deux mito-



FIGURE 3 – Les acteurs de la dynamique mitochondriale

Mfn1/2 sont responsables de la fusion des membranes externes mitochondriales et Opa1 des membranes internes. Drp1 est la principale protéine impliquée dans la fission, elle est localisée dans le cytoplasme et recrutée à la membrane externe mitochondriale (van der Bliek *et al.*, 2013).





Les complexes respiratoires de la chaine de transport des électrons et l'ATP synthase sont schématisés. Des protons sont expulsés par les complexes I, III et IV dans l'espace intermembranaire. Le gradient de protons ainsi généré permet ensuite leur retour dans la matrice à travers l'ATP synthase, produisant de l'ATP (Mohamed Yusoff, 2015).

chondries adjacentes (Westermann, 2010). La protéine clé de la fusion des membranes internes est la GTPase Opa1. Opa1 comporte 8 isoformes chez les mammifères, possédant chacun un à trois sites de clivages protéolytiques, et la balance forme courte - forme longue régule la fusion. L'un des sites est clivé par la protéine Oma1, uniquement quand les mitochondries perdent leur potentiel membranaire ou ont un autre défaut, ce qui empêche la fusion et permet un contrôle qualité du réseau mitochondrial (Baker *et al.*, 2014; van der Bliek *et al.*, 2013) (**Figure 3**).

1.3 Voies métaboliques

La majeure partie de l'énergie nécessaire à la cellule est produite dans les mitochondries, grâce à la phosphorylation oxydative, aussi appelée respiration cellulaire. Lors de ce processus l'oxydation de donneurs d'électrons par la chaine respiratoire permet la phosphorylation de l'ADP en ATP. L'ATP permet d'accumuler l'énergie chimique. Ces molécules peuvent ensuite sortir de la mitochondrie et participer à des réactions endothermiques où elles fournissent l'énergie nécessaire en perdant un phosphate, l'hydrolyse des liaisons phosphoanhydrides libérant une importante quantité d'énergie. Les transporteurs d'électrons sont les coenzymes réduits NADH et FADH₂, obtenus par le cycle de Krebs ou la β -oxydation. Elles libèrent des électrons de haut potentiel de transfert qui sont ensuite transférés à la chaine respiratoire localisée dans la membrane mitochondriale interne, entrainant une cascade de réactions d'oxydoréduction. Ce mouvement électronique induit un mouvement de protons de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire, grâce à des pompes à protons, créant un gradient. Celui-ci est la force motrice permettant aux protons de revenir dans la matrice mitochondriale par reflux, entrainant un rotor moléculaire dans le complexe V, l'ATP synthase, déclenchant la production d'ATP à partir d'adénosine diphosphate (ADP) et de phosphate inorganique (Pi). Le rendement énergétique de la phosphorylation oxydative est plus élevé que celui de la glycolyse ou de la fermentation anaérobie (Papa et al., 2012).

Le complexe I (NADH déshydrogénase) accepte les électrons du coenzyme NADH et les transfère au coenzyme Q (ubiquinone), ce qui entraine un flux de protons vers l'espace intermembranaire. Ensuite le complexe III (coenzyme Q-cytochrome c réductase) catalyse l'oxydation du coenzyme Q réduit à l'étape précédente (ubiquinol) et la réduction de deux molécules de cytochrome c, ce qui est de nouveau associé à une expulsion de protons dans l'espace intermembranaire. Enfin le complexe IV (Cytochrome c oxydase) termine la chaine respiratoire en utilisant les électrons du cytochrome c réduit pour réduire l'oxygène moléculaire en eau. Lors de cette étape des protons sont consommés pour la réduction de l'O₂ mais aussi expulsés vers l'espace intermembranaire par le complexe. Le complexe II (succinate déshydrogenase), quant à lui, catalyse l'oxydation du succinate en fumarate et la réduction du coenzyme Q, mais sans flux de protons. De la même manière que pour le complexe I les électrons sont ensuite transférés au complexe III puis IV, permettant la réduction de l'O₂ (**Figure 4**).

Un gradient de protons se met ainsi en place entre la matrice mitochondriale et l'espace intermembranaire grâce à l'expulsion des protons par les complexes et leur consommation lors de la réduction de l'O₂. Un flux de protons a ensuite lieu en sens inverse, à travers l'ATP synthase, entrainant la production d'ATP. L'ATP produit dans la matrice mitochondriale est transporté dans l'espace intermembranaire grâce à l'adénine nucléotide translocase (ANT), un antiport qui permet l'export d'ATP en échange de l'import d'ADP. Il est ensuite libéré dans le cytosol où il peut participer aux réactions biochimiques nécessitant de l'énergie. La concentration en ADP, qui est corrélée à l'utilisation d'ATP, régule l'OXPHOS, et par exemple l'inhibition de la translocase ANT inhibe la phosphorylation oxydative (Schirris *et al.*, 2015).



FIGURE 5 – Apoptose

La cellule subit différents changements morphologiques lors de l'apoptose, jusqu'à son élimination par phagocytose des corps apoptotiques. Adapté de (Abou-Ghali et Stiban, 2015).



FIGURE 6 – Voies extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose

Schéma simplifié des voies de l'apoptose suite à un signal externe (voie extrinsèque) ou un signal intracellulaire lié à un stress, comme des dommages de l'ADN ou une augmentation des ROS (voie intrinsèque). Adapté de (UCLouvain - Virologie). La chaine respiratoire génère des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS), potentiellement dangereux pour la cellule. En effet la réduction de l'oxygène en eau nécessite deux protons et quatre électrons, si seulement un ou deux électrons sont transférés l'ion superoxyde O_2^{-} et l'ion peroxyde O_2^{2-} sont produits. Ces ions ainsi que leurs dérivés tels le peroxyde d'hydrogène H₂O₂ ou le radical hydroxyl HO[.] sont instables et très réactifs, ils peuvent oxyder les protéines, l'ADN et les lipides des membranes cellulaires, endommageant la cellule (Kong *et al.*, 2014).

D'autres voies métaboliques ont lieu dans les mitochondries, comme le cycle de Krebs et la β -oxydation. Le cycle de Krebs transforme l'acétyl CoA, provenant de la conversion du pyruvate obtenu par glycolyse ou par β -oxydation grâce à une succession de réactions enzymatiques, produisant notamment du CO₂, du GTP et les coenzymes NADH et FADH₂. Des bases azotées et des acides aminés proviennent aussi de métabolites du cycle de Krebs (Akram, 2014). La dégradation des acides gras se fait également dans la matrice mitochondriale grâce à la β -oxydation, après activation en acyl-CoA dans le cytosol ou la mitochondrie. Cette réaction métabolique permet la production d'acétyl CoA utilisé dans le cycle de Krebs mais aussi des coenzymes réducteurs NADH et FADH₂, dont les électrons alimentent la chaine respiratoire (Aon *et al.*, 2014).

1.4 Apoptose

Mis à part leur fonction dans le métabolisme énergétique les mitochondries sont impliquées dans de nombreux autres processus cellulaires. Elles ont notamment un rôle crucial dans l'apoptose. Ce processus de mort cellulaire entraine la condensation du cytoplasme, le bourgeonnement des membranes cytoplasmiques et nucléaires et la compaction de la chromatine. L'ADN est ensuite fragmenté, les phosphatidylserines de la membrane plasmique sont externalisées et la cellule est segmentée en vésicules, appelées corps apoptotiques, qui sont phagocytées par les macrophages (**Figure 5**). L'apoptose possède deux voies d'activation, la voie extrinsèque ou mort programmée, et intrinsèque ou mort accidentelle (**Figure 6**).

La première est activée en réponse à un signal externe, par activation de récepteurs de mort présents sur la membrane plasmique, comme le récepteur du TNF (tumor necrosis factor) ou le récepteur FAS, ce qui déclenche une série de mécanismes conduisant à l'activation des caspases. Ces protéines à cystéines reconnaissent chacune une séquence protéique particulière et clivent leurs substrats au niveau d'un résidu aspartate situé en P1 du site de clivage. La voie extrinsèque peut par exemple être déclenchée par des lymphocytes cytotoxiques (Martínez-Lostao *et al.*, 2015).

Les mitochondries sont principalement impliquées dans la seconde voie, la voie apoptotique intrinsèque. Elle est majoritairement déclenchée par des signaux d'origine intracellulaire, lorsque les cellules sont lésées ou soumises à un stress, par exemple lors de dommages de l'ADN ou de l'augmentation de la quantité de ROS. Suite à ces stimuli les protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl2, normalement localisées dans le cytosol, s'insèrent dans la membrane mitochondriale externe. Les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl2, comme Bcl2 et Bcl-XL, sont, quant à eux, constitutivement présents dans la membrane externe, séquestrant les molécules proapoptotiques activatrices et effectrices et inhibant donc la perméabilisation de cette membrane. Le rapport molécules pro-apoptotiques/ molécules anti-apoptotiques détermine ainsi l'entrée de la cellule dans le programme d'apoptose (Gibson et Davids, 2015). En effet des protéines proapoptotiques sensibilisatrices comme Bad vont inhiber les protéines anti-apoptotiques. Cela va permettre l'activation des protéines pro-apoptotiques effectrices telles Bax et Bak par les activatrices comme Bid et Bim (Bhola et Letai, 2016). La perméabilisation des mitochondries peut se faire selon deux mécanismes. Les protéines pro-apoptotiques effectrices vont former

des pores sur la membrane externe en s'oligomérisant, ce qui permet l'export du cytochrome c de l'espace intermembranaire vers le cytosol (Ma *et al.*, 2013; Westphal *et al.*, 2014). Elles vont aussi interagir avec les pores de transition de perméabilité (PTP), déclenchant leur ouverture. La composition des PTP reste incertaine et pourrait comporter l'ANT et l'ATP synthase sur la membrane interne et une protéine matricielle, la cyclophiline D (Siemen et Ziemer, 2013; Jonas *et al.*, 2015). Ces pores non spécifiques vont perméabiliser la membrane interne en s'ouvrant, permettant le passage de molécules jusqu'à 1,5kDa et détruisant le gradient de protons, ce qui va diminuer le potentiel membranaire mitochondrial. En conséquence les mitochondries vont gonfler, menant à la rupture de la membrane externe et à la libération non spécifique dans le cytosol de molécules auparavant localisées dans l'espace intermembranaire, et notamment du cytochrome c, des procaspases 2, 3 et 9 et du facteur AIF (Apoptosis inducing factor).

Le cytochrome c cytosolique se fixe à une protéine adaptative, Apaf1 (Apoptotic protease activating factor -1), et va l'activer. Un complexe trimoléculaire appelé apoptosome peut alors se former, comprenant le cytochrome c, Apaf1 et la procaspase 9, permettant l'activation de cette dernière en caspase 9 par protéolyse en présence de dATP. La caspase 9 initiatrice est alors active et peut à son tour cliver la procaspase 3 effectrice. Il s'ensuit une cascade d'activations de caspases qui ont une activité protéolytique et vont dégrader des protéines cytosoliques (actine, kératine...) et nucléaires (lamine...) mais aussi activer des nucléases qui vont fragmenter l'ADN (Goldar et al., 2015). L'une des protéines impliquée dans la dégradation de l'ADN nucléaire lors de l'apoptose est l'endonucléase ENDOG. Elle est localisée dans l'espace intermembranaire mitochondrial et est relocalisée vers le noyau dans certaines conditions. L'étude de sa structure cristallographique en complexe avec de l'ADN a récemment démontré que son activité endonucléase non spécifique est forte (Lin et al., 2016). ENDOG a aussi un rôle régulateur des nucléases apoptotiques puisque sa surexpression induit une augmentation de l'expression de DFFB (DNA fragmentation factor subunit beta, aussi appelé CAD pour Caspase-Activated DNase) et des nucléases du groupe DNaseI, augmentant la fragmentation de l'ADN (Zhdanov et al., 2015).

Une autre voie indépendante des caspases participe à l'apoptose. Le facteur AIF, suite à son relargage dans le cytosol après perméabilisation de la membrane externe mitochondriale, est relocalisé dans le noyau où il induit l'apoptose nucléaire par condensation de la chromatine et fragmentation de l'ADN (Candé *et al.*, 2002).

Outre ses fonctions dans le métabolisme énergétique et l'apoptose la mitochondrie participe à d'autres processus biologiques, qui ne seront pas étudiés dans le cadre de ce projet de recherche. Elle joue par exemple un rôle important dans l'homéostasie du calcium. Elle permet notamment son stockage en cas d'élévation importante de la concentration en ions calciques cytosoliques durant diverses circonstances anormales, telle l'ischémie, protégeant la cellule (Fonteriz *et al.*, 2016). Elle est aussi le siège de la synthèse de nombreux composés comme les hormones stéroïdiennes ou les pyrimidines.





L'ADNmt porte 37 gènes codant pour 13 protéines, 22 ARNt et 2 ARNr. Les sous unités du complexe I sont en jaune, du complexe IV en orange et du complexe V en rouge. Les régions en noir représentent les chevauchements de gènes. La région contrôle, non codante, est visualisée en gris. Image Emmanuel Douzery.

Chapitre 2

ADN mitochondrial

2.1 Organisation du génome mitochondrial

Bien que les mitochondries des plantes et des animaux dérivent d'une même bactérie ancestrale leurs génomes ont évolué différemment. Ceux des plantes sont relativement larges, de 200 à 2000kb environ, et comportent des introns, des pseudogènes et des fragments d'ADN chloroplastique et nucléaire (Morley et Nielsen, 2017). Au contraire l'ADNmt animal est plus petit, avec une taille relativement constante de 14-20kb, des gènes sans introns et peu de régions non codantes.

L'ADN mitochondrial humain est une molécule double-brin et circulaire de 16569pb, qui a été séquencée pour la première fois en 1981 (Anderson *et al.*, 1981). La composition en bases des deux brins diffère et ceux-ci peuvent être séparés sur un gradient dénaturant de chlorure de sodium en un brin lourd riche en guanines (brin H pour « heavy ») et un brin léger riche en cytosines (brin L pour « light »). L'ADNmt comporte deux régions non codantes, la plus longue comporte l'origine de réplication du brin H (OriH) et les promoteurs transcriptionnels (LSP et HSP) ainsi que la D-loop (displacement loop) et permet la régulation à la fois de la réplication et de réplication du brin L (OriL). Ce génome code pour 13 protéines qui sont des sous-unités de la chaine respiratoire et 22ARNt et 2 ARNr (12S et 16S) qui sont les composants ARN du système de traduction mitochondrial. La plupart des gènes sont codés par le brin H, le brin L étant la matrice de l'ARNm ND6 et de 8 ARNt uniquement. Les autres protéines mitochondriales sont codées par le noyau, traduites dans le cytosol et importées dans les mitochondriales par des transporteurs (Fox, 2012) (**Figure 7**).

Une cellule somatique contient généralement 1000 à 10 000 copies d'ADNmt, qui sont répliquées indépendamment du cycle cellulaire (Falkenberg *et al.*, 2007). L'ADNmt n'est pas distribué de manière homogène dans la matrice mitochondriale, il est concentré en complexes protéines-ADN, les nucléoides, d'environ 100nm de diamètre chez les mammifères (Kukat *et al.*, 2011). Ces structures macromoléculaires sont ancrées à la membrane mitochondriale interne. Le nombre de molécules par nucléoide a été longuement débattu et il est maintenant estimé qu'en moyenne un nucléoide contient un unique ADNmt (Kukat *et al.*, 2015). L'une des protéines clé de ce complexe est le facteur de transcription mitochondrial A (TFAM). La structure cristallographique de TFAM lié à la région promotrice de l'ADNmt a montré que cette protéine comporte 2 domaines HMG (High Mobility Group). TFAM a la capacité de se lier à l'ADN de façon non spécifique et peut recouvrir entièrement l'ADNmt, en augmentant sa flexibilité par un mécanisme de « charnières flexibles » qui provoque la formation d'un ensemble d'angles de repliements de l'ADNmt, le compactant (Farge *et al.*, 2012). La quantité

de TFAM est corrélée à la quantité d'ADNmt, sa surexpression résultant par exemple en une augmentation du nombre de copies (Ekstrand, 2004). TFAM peut être dégradée par la protéase mitochondriale AAA LONP1, ce qui régule la compaction de l'ADNmt. Le nucléoide comporte un grand nombre d'autres protéines, en plus faibles quantités, et notamment des protéines associées à la réplication de l'ADNmt (mtSSB, POL γ et TWINKLE) et à sa transcription (POLRMT et TFB2M) dont les rôles seront détaillés ultérieurement, ainsi que des protéines de la réparation et du métabolisme de l'ADNmt en général, mais l'ensemble des protéines présentes dans les nucléoides n'est pas connu (Hensen et al., 2014). La composition des nucléoides est également dynamique et varie en fonction des conditions cellulaires, par exemple la nucléase DNA2 est recrutée en cas de blocage de la réplication (Duxin et al., 2009). La distribution des nucléoides dans le réseau mitochondrial est importante, car par exemple la transmission de l'ADNmt lors de la réplication cellulaire en dépend. Il a été montré que les nucléoides sont répartis de manière équidistante lorsque les mitochondries sont fusionnées, alors qu'ils se regroupent lors de la fission, les mitochondries fragmentées recevant le plus souvent au moins 2 nucléoides (Tauber et al., 2013). Les nucléoides servent de plateforme de recrutement pour la réplication et la transcription de l'ADNmt et la structure de ces complexes se relâche alors afin de faciliter l'accès de protéines additionnelles comme des facteurs de transcription (Lee et Han, 2017). L'ADNmt est au centre du nucléoide et les protéines l'entourant permettent donc également de le protéger des dommages, de manière un peu similaire aux histones pour l'ADN nucléaire (Guliaeva et al., 2006).

2.2 Communication noyau-mitochondries

Chez l'Homme l'ADNmt code pour seulement 13 protéines alors que le mitoprotéome en comporte plus de 1000 (Calvo *et al.*, 2016). La majorité des protéines présentes dans les mitochondries sont donc codées par le noyau. Les gènes sont transcrits dans cet organite, les ARNm traduits dans le cytoplasme et les protéines sont ensuite importées dans la mitochondrie. Cet import peut par exemple se faire grâce à une séquence d'adressage mitochondrial (MTS), située à l'extrémité N-terminale, qui sera reconnue par une translocase qui permettra le passage de la protéine à travers les membranes mitochondriales. Le MTS peut ensuite être clivé par une protéolyse (Maccecchini *et al.*, 1979).

Une communication noyau-mitochondries est donc nécessaire pour coordonner la synthèse des protéines codées par les deux génomes afin que les sous unités des complexes respiratoires soient présentes en proportions stœchiométriques. Les protéines de la maintenance de l'ADNmt (transcription, réplication, réparation...) sont aussi codées au niveau nucléaire, nécessitant de même le dialogue entre ces organites. Il existe une communication antérograde, du noyau vers la mitochondrie, une communication rétrograde, de la mitochondrie au noyau, ainsi que d'autres voies impliquant des échanges d'informations entre organites ou avec le milieu extracellulaire (Quirós *et al.*, 2016).

La signalisation antérograde permet aux mitochondries de s'adapter à l'environnement cellulaire. Cette régulation est basée sur l'expression de protéines mitochondriales codées par le noyau, qui vont soit permettre l'expression des gènes mitochondriaux soit directement participer au métabolisme mitochondrial. Elle permet aussi d'informer les mitochondries d'un stress nucléaire, comme des dommages chromosomiques, induisant une diminution du métabolisme énergétique mitochondrial. Par exemple l'activation de la poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1) et de PARP2 en réponse aux cassures d'ADN nucléaire entraine une déplétion en NAD⁺ cellulaire, inhibant l'activité de la sirtuine 1, qui régule positivement PGC1- α . Ce coactivateur active des facteurs de transcription comme les NRF (nuclear respiratory factors). S'il

n'est pas activé le métabolisme énergétique et la biogenèse mitochondriale sont donc inhibés. La restauration du niveau de NAD⁺, par exemple par traitement avec des précurseurs de NAD⁺, permet d'activer ce signal antérograde et de restaurer le métabolisme (Cantó *et al.*, 2012).

Les mitochondries envoient aussi des signaux permettant par exemple de se protéger contre les dysfonctionnements en activant l'expression de gènes nucléaires impliqués dans la reprogrammation métabolique ou les défenses contre le stress, c'est la signalisation rétrograde. Les gènes nucléaires activés dépendent fortement du type d'anomalie mitochondriale (Cagin et Enriquez, 2015). On peut toutefois déterminer trois classes de dysfonctionnements dans la régulation rétrograde : le stress énergétique, l'augmentation de la concentration calcique cytosolique et le stress oxydant. Par exemple, pour la réponse au stress énergétique, une baisse du niveau d'ATP due à l'exercice ou au jeûne entraine une augmentation du ratio AMP/ATP et active la protéine kinase activée par l'AMP (AMPK). L'augmentation du NAD⁺ cellulaire qui s'ensuit mène à l'activation de la sirtuine 1, donc de PGC1- α , entrainant l'augmentation du métabolisme énergétique et de la biogenèse mitochondriale (Cantó *et al.*, 2010). De même un signal rétrograde est mis en place en cas de production excessive mais non délétère de ROS, pour activer des enzymes détoxifiantes et des protéines anti-oxydantes (Lu *et al.*, 2012).

La communication mitochondries-noyau passe aussi par une régulation posttranscriptionnelle des ARNm mitochondriaux par des microARN (miARN) nucléaires. Les miARN sont des ARN non codants qui sont maturés dans le cytoplasme. Ils s'associent notamment avec des protéines Argonautes (AGO) pour former un complexe ribonucléoprotéique, RISC (RNA-induced silcencing complex). Ce complexe affecte la stabilité ou la traduction de l'ARNm cible complémentaire au miARN, empêchant la synthèse de la protéine correspondante. Il a été montré que 13 miARN sont spécifiquement localisés dans les mitochondries, ainsi que la protéine Argonaute 2 (Bandiera *et al.*, 2011). Dans la mitochondrie la régulation *via* miARN peut permettre d'ajuster rapidement et précisément l'expression des gènes mitochondriaux en fonction des conditions cellulaires.

Il est crucial pour la cellule de coordonner l'expression des gènes nucléaires et le fonctionnement mitochondrial et de nombreuses voies de signalisation permettent cette communication. Le mitoprotéome est ainsi régulé suivant les nécessités énergétiques et l'intégrité des deux génomes.

2.3 Transcription mitochondriale

La transcription de l'ADNmt humain implique un nombre réduit de protéines, dont les principales sont l'ARN polymérase POLRMT et les facteurs de transcription TFAM et TFB2M. Elle est relativement différente de la transcription nucléaire puisqu'elle produit des précurseurs ARN polycistroniques comportant presque toutes les informations codées par chaque brin. Ces transcrits sont ensuite modifiés pour produire les molécules d'ARNm, ARNt et ARNr individuelles, notamment par clivage endonucléolytique au niveau des ARN de transfert (Ojala *et al.*, 1981). Ensuite la poly(A) polymérase mitochondriale ajoute une queue poly(A) de 50 nucléotides sur les ARNm. Pour certains ARNm cette polyadénylation est nécessaire pour générer le codon stop UAA (Chang et Tong, 2012).

La synthèse d'ARN dans les mitochondries humaines peut commencer en différents sites d'initiation qui se trouvent dans la région non codante de la D-loop, un pour la transcription du brin L, le promoteur LSP et deux pour la transcription du brin H, les promoteurs HSP1 et HSP2. HSP1 se trouve 16pb avant l'ARNt Phe et produit un transcrit se terminant à l'extrémité 3' du gène ARNr 16S. HSP2 se trouve environ 80pb après HSP1 et exclut l'ARNt Phe, il produit un transcrit polycistronique qui correspond quasiment à l'intégrité du brin H. La transcription



FIGURE 8 – Transcription mitochondriale

Les complexes d'initiation de la transcription, composés de l'ARN polymérase mitochondriale POLRMT, de TFAM et de TFB1M ou TFB2M, sont assemblés dans la région de la D-loop, au niveau des promoteurs. La transcription du brin L, qui débute à LSP, peut soit continuer sur toute la longueur de la matrice, soit être stoppée à un site de transition ARN/ADN, et servira alors d'amorce pour la réplication débutant à OriH (cf 2.4.1). La transcription du brin H commence soit à HSP1, soit à HSP2. L'initiation à HSP1 permet la formation d'un transcrit jusqu'à un terminateur de transcription (TERM) situé au niveau du gène codant pour l'ARNtLeu, ce transcrit permet de produire les ARNr 12S et 16S nécessaires à la traduction mitochondriale. L'initiation à HSP2 permet quant à elle de transcrire l'intégralité du brin H (Scarpulla, 2008).

à partir de LSP peut s'arrêter, formant un transcrit court appelé ARN 7S, ce qui permet de contrôler la quantité de transcrit total du brin L produite (**Figure 8**).

L'ARN polymérase POLRMT est composée d'une seule sous-unité et comporte une séquence d'adressage mitochondrial qui est clivée après import. Son extrémité C-terminale présente des similarités de séquence avec les ARN polymérases de bactériophages, alors que son extrémité N-terminale est unique et porte, chez l'Homme, 2 motifs à répétitions pentatricopeptides (PPR) (Lightowlers et Chrzanowska-Lightowlers, 2008). Il a été démontré que les protéines comportant des motifs PPR se lient à l'ARN et facilitent les interactions entre ARN et protéines impliquées dans le métabolisme de l'ARN, notamment dans les mitochondries et les chloroplastes.

Contrairement aux ARN polymérases des bactériophages, notamment du phage T7, POLRMT ne peut pas initier seule la transcription. Ainsi l'un des deux facteurs de transcription paralogues B (TFB1M et TFB2M) et le facteur de transcription mitochondrial A (TFAM) sont nécessaires pour l'interaction de POLRMT avec le promoteur. TFB1M et TFB2M sont semblables à des ARNr dimethyltransferases, et des analyses phylogénétiques suggèrent que ces facteurs ont pour origine une ARNr methyltransferase de l'endosymbiont mitochondrial (Cotney et Shadel, 2006). Les deux protéines ont conservé cette activité, mais elle est faible pour TFB2M. Il a donc été montré que TFB1M est principalement impliquée dans la biogenèse de la petite sous unité ribosomique par son activité ARNr méthyltransférase alors que TFB2M est principalement un facteur d'initiation de transcription mitochondrial (Cotney et al., 2009). Ainsi TFB2M facilite la transition de conformation du promoteur («promoter melting»), permettant la transcription, et agit de manière transitoire dans le site catalytique lors de la polymérisation de l'ARN (Posse et Gustafsson, 2017). TFAM quant à lui se lie aspécifiquement à l'ADN, par exemple pour le compacter (cf 2.1), mais aussi spécifiquement, avant les sites d'initiation de transcription des promoteurs (Gaspari et al., 2004). Récemment la structure cristallographique de cette protéine liée à la région promotrice de l'ADNmt a été déterminée : TFAM comporte 2 domaines HMG, chaque domaine imposant à l'ADN une courbure de près de 90°, résultant en un demi-tour complet de l'ADN au niveau du promoteur, ce qui formerait un agencement favorable pour l'initiation de la transcription (Ngo et al., 2011). Il a été suggéré in vitro que POLRMT et TFB2M peuvent être suffisants pour initier la transcription, mais uniquement dans certaines conditions expérimentales, une concentration en sel qui permet un «promoter breathing» (Shi et al., 2012). TFAM est donc probablement nécessaire pour la transcription mitochondriale in vivo. De plus ce facteur de transcription est aussi capable in vitro d'activer différemment les promoteurs HSP1et LSP, en fonction du ratio protéine/ADN, et de réprimer HSP2 à des concentrations qui activent les deux autres promoteurs. Il permet donc probablement de réguler l'activation des promoteurs mitochondriaux et donc la transcription de gènes spécifiques en fonction des besoins de la cellule (Bestwick et Shadel, 2013).

Au niveau mécanistique, il a été suggéré que TFAM recrute d'abord POLRMT au promoteur, puis que TFB2M se lie à son tour et induit la transition de conformation du promoteur, permettant la transcription (Posse et Gustafsson, 2017). POLRMT, TFB2M et TFAM sont le cœur de la machinerie transcriptionnelle mitochondriale, mais d'autres facteurs, qui ne seront pas détaillés, sont nécessaires pour une transcription efficace, comme par exemple TEFM, un facteur d'élongation de la transcription (Minczuk *et al.*, 2011).

En 2004 il a été montré que les ARN mitochondriaux nouvellement synthétisés s'aggloméraient en structures ponctuées dans les mitochondries, par marquage avec un analogue de l'uridine, le 5-bromouridine (BrU) (Iborra *et al.*, 2004). Ainsi des granules d'ARN mitochondriaux (MRGs), ressemblant aux granules d'ARN cytoplasmiques, compartimentent les ARN dans des corps non délimités par des membranes, à l'intérieur de la matrice mitochondriale, ce qui



FIGURE 9 – Modèles de la réplication mitochondriale

(A) Dans le modèle par déplacement de brin la synthèse du brin L commence à OriH et le brin L matrice est déplacé, la synthèse du brin H est initiée lorsque OriL se retrouve simple-brin. (B) Le modèle RITOLS fonctionne sur le même principe que le modèle par déplacement de brin mais le brin L matrice déplacé n'est pas laissé simple-brin, il est recouvert d'ARN, qui sera ensuite remplacé par de l'ADN par un mécanisme non élucidé. (C) Le modèle de réplication couplée correspond à une réplication «conventionnelle» où les deux brins sont répliqués simultanément en sens opposés. Les lignes pleines représentes l'ADN et les lignes pointillées l'ARN, les amorces ARN ne sont pas représentées. Adapté de (McKinney et Oliveira, 2013). joue un rôle important dans l'expression des gènes par modifications post-transcriptionnelles. Il a notamment été démontré que de nombreuses protéines impliquées dans la maturation des ARN colocalisent avec les MRGs, par exemple les RNases clivant les ARN polycistroniques ou la poly(A) polymérase (Antonicka *et al.*, 2013). Les MRGs sont assemblés autour des ARN nouvellement synthétisés en association avec les nucléoides, puis, après dissociation, les ARN sont maturés et les mitoribosomes sont associés dans ces sous compartiments mitochondriaux (Jourdain *et al.*, 2016).

2.4 Réplication de l'ADN mitochondrial

2.4.1 Modèles de réplication

La réplication de l'ADNmt a lieu dans la matrice mitochondriale, indépendamment du cycle cellulaire. Elle n'est pas limitée à la phase S. Différents modèles ont été proposés (**Figure 9**).

Le premier modèle et le plus admis est le modèle de Clayton ou modèle de déplacement de brin (« strand-displacement») (Clayton, 1982). Il a été développé à partir d'images de microscopie électronique où des intermédiaires de réplication contenaient de longues parties où le brin H était simple-brin. D'après ce modèle la réplication de l'ADNmt est initiée à l'origine OriH et continue dans une seule direction, déplaçant le brin parental H qui se trouve alors simplebrin. Lorsque la synthèse du brin H atteint l'origine OriL celui-ci est activé et la réplication du brin déplacé peut commencer, en sens inverse. Les deux brins sont donc répliqués en continu mais de manière asymétrique et asynchrone. Des expériences de microscopie à force atomique ont démontré l'existence de sites supplémentaires d'initiation de réplication sur le brin L. Cependant, individuellement, ces sites d'initiation sont rarement utilisés, raison pour laquelle seul OriL avait été identifié comme site d'initiation de la synthèse du brin L lors de la cartographie en 5' (Brown *et al.*, 2005).

L'initiation de la réplication du brin H nécessite une amorce ARN, transcrite à partir du promoteur du brin L et résultant de la terminaison prématurée de la transcription. Cette amorce est l'ARN 7S et fait environ 200pb. Pour l'initiation de la réplication l'ARN doit rester hybridé à l'ADN et former un complexe ARN-ADN stable, sous forme d'une structure G-quadruplex, appelée R-loop (Wanrooij et al., 2012a). Cette structure, grâce à sa stabilité, conduirait à un arrêt de l'ARN polymérase et à sa dissociation de l'ADN, permettant ensuite la synthèse d'ADN. Ainsi la réplication du génome mitochondrial de mammifères est liée à sa transcription. Il a été montré in vitro que le facteur d'élongation de transcription mitochondrial (TEFM) empêche la terminaison de la synthèse d'ARN à CSB2 (conserved sequence block 2), une région riche en guanines commune à tous les vertébrés, empêchant la génération d'une amorce pour la réplication. TEFM serait donc un interrupteur moléculaire qui contrôlerait la balance entre transcription et réplication, en interférant directement avec la formation de la structure G-quadruplex, diminuant sa stabilité (Agaronyan et al., 2015). Le clivage de la R-loop pourrait se faire via la ribonucléoprotéine endoribonucléase MRP (mitochondrial RNA-processing enzyme) (Chang et Clayton, 1987) ou via d'autres protéines restant à identifier. L'ARN est ensuite allongé par l'ADN polymérase POL γ .

L'initiation de la réplication du brin L se passe lorsque l'origine OriL est rendue simple-brin. Elle adopte alors une structure tige-boucle (stem-loop), comportant dans la boucle un polydT reconnu par une primase, POLRMT, qui synthétise alors une amorce de réplication (Fusté *et al.*, 2010). L'amorce peut ensuite de la même manière être utilisée par POL γ pour synthétiser l'ADN. Il reste ensuite, une fois que la synthèse des deux brins est complète, à séparer les deux molécules d'ADNmt, à éliminer les primers ARN et à suturer l'ADN pour obtenir la molécule





POLRMT a le rôle de primase et synthétise les amorces ARN. L'ADN polymérase POL γ comprend trois sous unités, une sous unité POL γ A qui porte l'activité catalytique et deux sous unités POL γ B qui servent de facteur de processivité. TWINKLE est une hélicase qui déroule l'ADN au niveau de la fourche de réplication et mtSSB est une protéine de liaison à l'ADN simple-brin qui le stabilise (Wanrooij et Falkenberg, 2010). circulaire.

Le modèle de réplication de l'ADNmt par déplacement de brin a été remis en cause par des données d'électrophorèse bidimensionnelle mettant en évidence la présence, dans des tissus humains et murins, d'intermédiaires de réplication en forme « d'arc Y », correspondant à des fourches de réplication caractéristiques de la réplication « conventionnelle » synchrone et symétrique (Holt *et al.*, 2000). Cependant ces résultats pourraient être dus aux conditions expérimentales et aux multiples origines de réplication du brin L normalement peu utilisées (Brown *et al.*, 2005).

Un troisième modèle a été proposé, le modèle RITOLS (Ribo-nucléotide incorporation throughout the lagging strand). Dans ce modèle la réplication est asynchrone comme pour le modèle de réplication par déplacement de brin mais le brin H déplacé ne demeure pas simplebrin. Des ARN sont déposés sur ce brin pendant la synthèse du brin H fils, et sont ensuite remplacés par de l'ADN par un mécanisme inconnu, pour produire l'ADN double-brin (Yasukawa *et al.*, 2006; Reyes *et al.*, 2013).

2.4.2 Le réplisome mitochondrial

La majorité des acteurs de la réplication mitochondriale a été identifiée et caractérisée, le réplisome mitochondrial étant beaucoup plus simple que le réplisome nucléaire.

Les facteurs clés sont l'ADN polymérase POL γ , l'hélicase TWINKLE, la protéine de liaison à l'ADN simple-brin mtSSB et l'ARN polymérase POLRMT (**Figure 10**). Toutes ces protéines sont codées par le génome nucléaire. La plupart ont une structure proche des protéines codées par le bactériophage T7, son système de réplication ayant donc souvent servis de modèle pour comprendre la réplication mitochondriale. La reconstruction *in vitro* du réplisome mitochondrial (POL γ , TWINKLE et mtSSB) incubé avec de l'ADN double-brin permet de mimer la synthèse du brin H et d'obtenir la synthèse d'ADN simple-brin d'environ 16kb, soit la longueur de l'ADNmt humain (Korhonen *et al.*, 2004). La synthèse du brin L est obtenue *in vitro* avec les mêmes composants plus POLRMT (Fusté *et al.*, 2010).

L'ADN polymérase POL γ est uniquement localisée dans les mitochondries. Chez les mammifères c'est une enzyme hétérotrimérique composée d'une sous-unité catalytique de 140kD, POL γ A et de deux sous-unités accessoires de 53kD, POL γ B (Yakubovskaya et al., 2006). POL γ A possède trois activités distinctes : une activité 5'-3' polymérase, une activité 3'-5' exonucléase et une activité 5'-désoxyribose phosphate lyase impliquée dans la réparation par excision de base (BER). Elle a une organisation typique de la famille A des ADN polymérases telles que la polymérase POL1 de E. coli ou la polymérase du phage T7, bien qu'elle possède une importante région « spacer » de 400aa entre le domaine polymérase et le domaine exonucléase, qui n'est pas retrouvé chez les autres protéines de la famille A (Kaguni, 2004). L'activité exonucléase de POL γ A lui permet de dégrader quelques nucléotides pour corriger d'éventuelles erreurs lors de l'insertion des bases. Cette relecture est cruciale car chez des souris où l'activité exonucléase de POL γ est inactivée, des mutations de l'ADNmt s'accumulent et un phénotype de vieillissement précoce apparait (Trifunovic *et al.*, 2004). Les sous-unités POL γ B, présentes chez la majorité des eucaryotes mais pas chez les levures, agissent comme des facteurs de processivité. Elles augmentent l'affinité de la polymérase POL γ pour l'ADN ainsi que la vitesse de polymérisation. En l'absence de POL γ B, POL γ A est incapable de synthétiser l'ADN à partir d'un substrat double-brin, ces sous-unités accessoires sont nécessaires pour coordonner les activités polymérase de POL γ et hélicase de TWINKLE à la fourche de réplication (Farge *et al.*, 2007).

Le gène codant pour l'hélicase TWINKLE a été découvert durant l'analyse des mutations

causant une pathologie neuromusculaire associée à des délétions multiples de l'ADNmt, l'ophtalmoplégie externe progressive autosomique dominante (adPEO) (Spelbrink et al., 2001). La séquence d'acides aminés de TWINKLE est similaire à celle de gp4, l'hélicase-primase réplicative du bactériophage T7. De manière similaire à la protéine gp4, TWINKLE forme des structures hexamériques et heptamériques, avec un canal central où se lie l'ADN simple-brin. Elle possède aussi trois régions : un domaine N-terminal, un petit domaine « linker » de 27aa et un domaine C-terminal hélicase (Ziebarth et al., 2010; Farge et al., 2008). Des analyses bioinformatiques ont suggéré que TWINKLE est une primase active chez la plupart des eucaryotes mais que cette activité a été perdue chez les métazoaires (Shutt et Gray, 2006). La primase mitochondriale, chez l'Homme et la plupart des métazoaires, est ainsi une autre enzyme, POLRMT. Pour ce qui est de l'activité hélicase, TWINKLE peut séparer l'ADN double-brin avec une polarité 5'-3', un processus qui nécessite l'hydrolyse d'ATP. Elle peut dérouler seulement 20pb d'ADN double-brin lorsqu'elle est seule en présence d'une fourche de réplication, et environ 16kb en présence de POL γ et de mtSSB (Korhonen *et al.*, 2003, 2004). TWINKLE ne nécessite pas de facteurs protéiques pour s'assembler sur un ADN circulaire, même en présence de mtSSB (Jemt et al., 2011).

La protéine de liaison à l'ADN simple-brin mtSSB a un rôle essentiel dans la réplication mitochondriale puisqu'elle stimule la vitesse de déroulement de l'ADN par TWINKLE, stabilise l'ADN simple-brin obtenu par déplacement de brin et stimule l'activité de POL γ (Korhonen *et al.*, 2004). C'est une protéine de 13-15kD qui forme des tétramères en solution (Yang *et al.*, 1997). De la même manière que la protéine SSB chez E. coli, mtSSB a une forte affinité pour l'ADN simple-brin.

L'ARN polymérase mitochondriale POLRMT a aussi le rôle de primase, pour la synthèse du brin L qui débute à OriL (Fusté *et al.*, 2010). *In vitro* POLRMT synthétise des amorces d'environ 25 nucléotides à OriL en présence de mtSSB, qui sont ensuite utilisées par POL γ pour initier la synthèse d'ADN. La structure tige-boucle et le poly-dT de cette boucle à OriL sont nécessaires pour le fonctionnement de cette primase (Wanrooij *et al.*, 2012b). Une autre protéine à activité primase et polymérase a été découverte dans les mitochondries, PrimPol. PrimPol peut générer des amorces ADN et ARN sur de l'ADN simple-brin, mais aussi continuer la synthèse après l'amorce. Elle possède aussi une activité TLS polymérase (translesion synthesis). Il a donc été proposé que PrimPol joue un rôle dans la réplication de l'ADNmt suite à un blocage de la fourche de réplication, soit en synthétisant une nouvelle amorce après le blocage, afin que la synthèse de l'ADNmt continue pendant que différents processus spécifiques répliquent l'ADN au niveau de la lésion grâce à son activité TLS (Bailey et Doherty, 2017). Cette protéine a surtout été étudiée *in vitro* et d'autres analyses sont nécessaires pour confirmer son rôle dans les mitochondries.

D'autres facteurs, non présents directement à la fourche de réplication, sont aussi nécessaires pour le bon déroulement de la réplication mitochondriale. Ce sont notamment des topoisomérases, des ligases et des RNases. Les topoisomérases mtTOP1, mtTOP2B et mtTOP3A ont notamment été localisées à la mitochondrie, mais leurs rôles exacts restent indéterminés (Sobek et Boege, 2014). La ligase 3 est la seule ligase qui a été montrée mitochondriale, elle est produite à partir d'un codon start alternatif comparé à la version nucléaire, ce qui la dote d'une séquence d'adressage mitochondrial à l'extrémité N-terminale (Lakshmipathy et Campbell, 1999). La RNase H1 dégrade l'ARN des hybrides ARN-ADN et est responsable de la dégradation des amorces lors de la réplication de l'ADNmt (Cerritelli *et al.*, 2003; Holmes *et al.*, 2015). Cependant, elle est incapable de dégrader les deux derniers ribonucléotides à la jonction ARN-ADN. L'ARN restant est donc probablement déplacé sous forme d'intermédiaire « flap » qui pourra être clivé par les nucléases DNA2, FEN1 ou MGME1 (Uhler et Falkenberg,



FIGURE 11 – Structure de la principale région non codante de l'ADNmt

La principale région non codante de l'ADNmt comprend la D-loop, une structure triple brin comportant un ADN simple-brin, l'ADN 7S, intercalé entre les deux brins du génome mitochondrial. L'origine de réplication OriH se trouve dans la D-loop. Chez l'Homme l'extrémité 3' de l'ADN 7S est fixe et l'extrémité 5' varie, donnant lieu à des fragments de différentes tailles (Nicholls et Minczuk, 2014). 2015). En effet la délétion de MGME1 cause la formation de molécules d'ADN 7S allongées à l'extrémité 5' et finissant notamment proche de CSB1. Cette exonucléase est donc requise pour éliminer l'ADN 7S entre CSB1 et OriH, et d'autres nucléases, comme FEN1 ou DNA2, sont probablement impliquées dans la dégradation de l'ARN et l'ADN entre LSP et CSB1 (Nicholls et Minczuk, 2014).

2.5 Régulation

Une importante séquence régulatrice de l'ADNmt est la région non codante qui comporte les promoteurs de transcription et OriH. Cette région peut comprendre une D-loop stable, constituée d'une copie du brin H ARN-ADN d'environ 650 nucléotides hybridée à sa matrice, appelée ADN 7S, ce qui forme une structure triple brin. La D-loop s'étend approximativement de OriH à son extrémité 5' jusqu'à la séquence associée à la terminaison (TAS) proche du gène de l'ARNt Pro à son extrémité 3'. L'extrémité 5' peut varier chez l'Homme et les molécules d'ADN 7S ont donc des tailles légèrement différentes (Kang *et al.*, 1997). La proportion d'ADNmt contenant une D-loop dépend de l'espèce et du tissu et peut varier de 10 à 90% (**Figure 11**).

La D-loop est la conséquence d'une terminaison prématurée de la synthèse d'ADN. La synthèse de l'ADN 7S est amorcée par la molécule d'ARN 7S (cf 2.4.1) et nécessite les protéines TFAM, mtSSB, TWINKLE et POL γ , notamment POL γ B qui possède une activité de liaison à l'ADN double-brin et une affinité pour les structures D-loop. Le mécanisme précis de la terminaison de la synthèse d'ADN à la séquence TAS n'est pas encore élucidé (Nicholls et Minczuk, 2014). L'ADN 7S a une demi-vie relativement courte, 45 min à 1 heure dans des cellules de rongeur, et est probablement éliminé par une nucléase. MGME1 est une exonucléase mitochondriale qui dégrade efficacement l'ADN simple-brin. Des mutations de ce gène causent des déplétions d'ADNmt ainsi qu'une augmentation du niveau d'ADN 7S suggérant l'implication de MGME1 dans la dégradation de l'ADN 7S (Szczesny *et al.*, 2013). Cependant le mécanisme n'est pas clairement élucidé puisque cette exonucléase a une faible activité sur l'ADN double-brin.

La fonction de la D-loop n'est pas totalement élucidée mais elle est probablement cruciale dans la régulation du métabolisme de l'ADNmt puisque la synthèse de l'ADN 7S nécessite l'utilisation de ressources énergétiques importantes. In vitro l'ADN 7S peut servir d'amorce à la polymérase β afin de continuer la synthèse d'ADNmt, mais ce mécanisme n'a pas été montré in vivo (Eichler et al., 1977). Il a été proposé que les évènements de terminaison prématurée de la réplication permettent de réguler le nombre de copies d'ADNmt. Cependant même en cas de déplétion importante en ADNmt, où la réplication totale de la molécule serait favorable, la formation de structures D-loop est encore détectée (Brown et Clayton, 2002). Une autre hypothèse est que la présence d'ADN 7S permet de changer la conformation de l'ADNmt et de le rendre plus accessible, augmentant par exemple l'accès à des sites de liaison pour des protéines de la réplication ou de la transcription, régulant de ce fait ces mécanismes. En effet il a été montré que l'ADNmt présente des sites charnières de délétions immédiatement après l'extrémité 3' de la D-loop, dans certaines pathologies ou après cassures induites par des enzymes de restriction ailleurs dans le génome (Bacman et al., 2009). De plus la diminution d'ADN 7S entraine un surenroulement des molécules d'ADNmt (Ruhanen et al., 2010). Une troisième hypothèse lie la synthèse d'ADN 7S avec le cycle cellulaire et la disponibilité en nucléotides. Une étude in vitro a ainsi montré qu'une haute concentration en nucléotides entraine une augmentation de la synthèse d'ADN 7S sans faire varier la synthèse d'ADNmt total. De même, bien que la réplication de l'ADNmt soit indépendante du cycle cellulaire, la synthèse d'ADN 7S est plus importante en phase S. Ainsi la synthèse d'ADN 7S puis sa dégradation rapide pourraient permettre aux mito-





L'ADNmt a été quantifié dans des embryons de souris de différents génotypes, exprimant plus ou moins le facteur de transcription TFAM. (A) Quantification de l'ADNmt par Southern Blot. L'hybridation par une sonde ciblant le gène nucléaire 18S sert de témoin de charge. (B) Quantification par phosphorimager des signaux obtenus par Southern blot. Les ratios ADNmt/ 18S sont présentés en pourcentage de la moyenne obtenue pour les embryons sauvages exprimant pleinement TFAM. Les barres d'erreurs représentent les erreurs standards sur la moyenne (Ekstrand, 2004).

chondries de maintenir un réservoir de nucléotides tout au long du cycle cellulaire, permettant à l'ADNmt d'être répliqué indépendamment (Antes *et al.*, 2010).

La balance transcription/réplication évoquée au 2.4.1 est un autre aspect de la régulation du métabolisme de l'ADNmt, avec notamment l'implication de TEFM.

Le nombre de copies d'ADNmt dépend fortement du type cellulaire et du stade de développement mais est finement régulé, avec un équilibre synthèse-dégradation des molécules d'ADN. La diminution du nombre de copies, et plus rarement son augmentation, sont retrouvées dans plusieurs pathologies mitochondriales (Blokhin *et al.*, 2008; Bai et Wong, 2005). Les mécanismes de régulation sont cependant encore largement inconnus. Comme détaillé précédemment, la synthèse d'ADN 7S au lieu d'une molécule d'ADNmt totale lors d'une réplication terminée prématurément peut permettre de contrôler le nombre de copies, mais les protéines impliquées ne sont pas clairement identifiées. D'après une autre hypothèse la disponibilité en nucléotides influe aussi sur la réplication de l'ADNmt et donc sur le nombre de copies. De plus, la quantité d'ADNmt est aussi contrôlée par régulation des protéines du réplisome, par exemple avec la méthylation du gène nucléaire de POL γ A sur l'exon 2 (Lee *et al.*, 2015), et la quantité d'ADNmt est corrélée à la quantité du facteur de transcription TFAM (Clay Montier *et al.*, 2009) (**Figure 12**).

Chapitre 3

Maladies mitochondriales

3.1 Génétique mitochondriale

Le génome mitochondrial est hérité de manière non mendélienne, uniquement maternellement, les nucléoides étant l'unité transmise. Différents mécanismes permettent l'élimination de l'ADNmt paternel chez les mammifères. Tout d'abord les spermatozoïdes contiennent beaucoup moins de molécules d'ADNmt que l'ovule, environ 100 molécules dans les cellules spermatiques contre 100 000 pour l'ovule. Dans un deuxième temps les mitochondries paternelles sont spécifiquement éliminées après fertilisation, probablement par une ubiquitinylation, peut être de la prohibitine, une protéine de la membrane interne, pendant la spermatogenèse. Les mitochondries sont ensuite dégradées sélectivement après fertilisation, entre le stade 4 cellules et le stade 8 cellules de l'embryon, impliquant les protéosomes ou les lysosomes (Sato et Sato, 2013). D'autres mécanismes supplémentaires peuvent exister car lors de croisement inter espèces l'élimination de l'ADNmt paternel n'est pas totale alors que le processus d'ubiquitinylation est bien conservé chez les mammifères (Gyllensten *et al.*, 1991).

Tout au long de l'évolution, des mutations neutres de l'ADNmt ont été transmises et ont créé des sous populations qui se différencient par des variations de séquences communes, appelées haplogroupes. La majorité de ces sous divisions ont eu lieu il y a 10 000 ans et elles sont ainsi actuellement utilisées pour étudier les migrations de populations ancestrales. Plus de 95% des Européens appartiennent à l'un des 10 haplogroupes principaux : H, J, T, U, K, M, I, V, W et X (Torroni *et al.*, 1996). De par leur neutralité sélective ces variants d'ADNmt communs ont été fixés dans les populations.

Dans la plupart des cas les molécules d'ADNmt d'une cellule sont identiques, une situation appelée homoplasmie, mais il est aussi possible que différentes populations d'ADNmt coexistent dans une même cellule, en cas d'hétéroplasmie. Les patients atteints de maladies mitochondriales sont souvent hétéroplasmiques, avec une population d'ADNmt sauvage, sans mutation, et une population mutée responsable de la pathologie. L'apparition et la sévérité des symptômes dépendent de la proportion d'ADNmt muté. Un individu hétéroplasmique développera des symptômes uniquement lorsque le taux d'ADNmt muté dépasse un certain seuil, qui est variable en fonction des mutations. Par exemple pour des ADNmt présentant des délétions le seuil est souvent autour de 50-60% alors que pour des mutations ponctuelles d'ARNt il est supérieur à 90% (Chinnery et Hudson, 2013).

La transmission des maladies mitochondriales dues à des mutations de l'ADNmt se fait donc maternellement. Une mère non atteinte mais hétéroplasmique et porteuse d'une mutation pathogénique peut donner naissance à des enfants sains et des enfants sévèrement atteints, car le ratio ADNmuté/ ADN sauvage hérité ne sera pas le même entre les enfants. En effet



FIGURE 13 – Goulet d'étranglement mitochondrial

La figure du haut présente l'évolution de l'ADNmt durant la différenciation germinale embryonnaire murine. L'ADNmt n'est pas répliqué entre l'ovocyte et le blastocyste, ce qui résulte en sa dilution au cours des divisions cellulaires qui suivent la fécondation. La réplication reprend au stade post-implantatoire, alors que les cellules germinales primordiales comportent un faible nombre de molécules d'ADNmt par cellule, augmentant fortement la quantité d'ADNmt à partir de quelques molécules. Il existe donc un goulet d'étranglement (Stewart et Larsson, 2014). La figure du bas tente d'expliquer le changement de ratio ADNmt muté/ ADNmt sauvage qui peut survenir lors de la formation des cellules germinales femelles, expliquant les différences de phénotypes observées entre la mère et les différents enfants. D'après le modèle (A), les molécules d'ADNmt sont ségrégées aléatoirement lors des différentes divisions cellulaires, et la réduction du nombre de copies puis la ré-amplification entrainent une augmentation de ces différences. Dans le modèle (B), des sous-groupes de molécules sont préférentiellement répliqués lors de la ré-amplification du nombre de copies. Adapté de (Carling *et al.*, 2011). d'après la théorie du goulet d'étranglement mitochondrial (mitochondrial bottleneck) l'ADNmt de l'ovocyte n'est pas répliqué pendant les premiers stades de développement de l'embryon. Il est ainsi redistribué entre les cellules filles, le contenu d'ADNmt par cellule étant drastiquement réduit, jusqu'à moins de 200 molécules par cellule. Dans un deuxième temps la réplication est amplifiée pour restaurer un taux d'ADNmt normal. Ce phénomène de réduction – amplification permet un changement du ratio ADN muté/ ADN sauvage entre les cellules, et notamment entre les cellules germinales primaires. Les ovules matures ont donc des taux d'ADNmt muté différents entre eux et par rapport aux cellules somatiques, expliquant les différences de phénotypes observées entre la mère et les différents enfants. Les mécanismes permettant ce changement ne sont pas totalement élucidés et plusieurs hypothèses sont avancées : la variation d'hétéroplasmie pourrait être due à une ségrégation mitotique inégale de l'ADNmt ou des nucléoides durant les divisions cellulaires ou à une réplication sélective d'une sous population d'ADNmt (Stewart et Larsson, 2014) (**Figure 13**).

3.2 Maladies mitochondriales

Des dysfonctionnements mitochondriaux peuvent être dus à des mutations de l'ADNmt mais aussi à des mutations de l'ADN nucléaire puisque celui-ci code pour des protéines essentielles dans la chaine respiratoire et dans la maintenance de l'ADNmt. Les maladies mitochondriales consistent principalement en un défaut de la phosphorylation oxydative et donc en une perte chronique d'énergie cellulaire, avec des symptômes divers. Les tissus les plus affectés sont souvent ceux où la demande énergétique est élevée, tels le système nerveux central, le cœur ou les muscles. La prévalence des maladies mitochondriales, lorsque l'on considère à la fois les pathologies dues à des mutations de l'ADNmt et du génome nucléaire, est d'environ 1/5000 (DiMauro et Davidzon, 2005).

3.2.1 Mutations de l'ADN mitochondrial

Les pathologies mitochondriales peuvent être causées directement par des mutations de l'ADNmt, impactant donc des gènes codant pour des protéines de la chaine respiratoire ou des ARNr ou ARNt nécessaires à la traduction mitochondriale. Plus de 150 maladies ont à ce jour été reliées à des mutations de l'ADNmt (DiMauro et Davidzon, 2005) (Figure 14 *page suivante*). Ces mutations peuvent être hétéroplasmiques ou homoplasmiques. Le plus souvent les mutations rares et graves, causant des maladies monogéniques multisystémiques, sont hétéroplasmiques et apparaissent *de novo* sur deux ou trois générations, voire une génération pour les délétions. Au contraire les pathologies moins sévères affectant seulement un organe peuvent provenir d'une mutation homoplasmique, qui nécessite des facteurs environnementaux pour déclencher le phénotype. Certains variants homoplasmiques vieux de plusieurs milliers d'années sont aussi associés à des risques augmentés de développer des maladies communes, comme Parkinson.

Les délétions d'ADNmt ont été les premières mutations d'ADNmt qui ont été montrées associées à une pathologie mitochondriale (Holt *et al.*, 1988). Il existe des délétions d'une seule paire de bases comme de plusieurs milliers et elles sont le plus souvent localisées dans l'arc majeur de l'ADNmt, c'est-à-dire entre OriH et OriL. Il a été suggéré que ces délétions proviennent d'erreurs de réplication : dans le modèle de réplication par déplacement de brin, lors du déplacement de l'ADN simple-brin, deux séquences répétées qui se suivent peuvent être mal appariées, résultant en un glissement qui conduit à une délétion (Phillips *et al.*, 2017). Il est aussi possible que ces mutations soient dues à des erreurs de réparation des cassures double-brin



FIGURE 14 - Carte génétique des maladies liées à des mutations de l'ADNmt

Les mutations ponctuelles sont représentées par des flèches et la délétion commune est indiquée au centre de la molécule (CPEO : ophtalmoplégie externe progressive chronique, KSS : syndrome de Kearns Sayre, LS : syndrome de Leigh, MELAS : mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis, stroke-like episodes, MERRF : myoclonic epilepsy and ragged red fibres, MILS : syndrome de Leigh hérité maternellement, NARP : neurogenic weakness, ataxia and retinitis pigmentosa, PS : syndrome de Pearson (Russell et Turnbull, 2014).

(Chen *et al.*, 2011). Les délétions uniques sont souvent considérées comme le résultat d'un évènement sporadique apparu dans l'ovocyte et affectant l'embryon, elles ne sont pas directement transmises. Ainsi toutes les cellules d'un tissu sont affectées par la même mutation (Schapira, 2006). Ces délétions existent sous forme hétéroplasmique et le ratio ADNmt délété/ ADNmt sauvage peut varier entre tissus et au cours du temps, impliquant des modifications de phénotypes. Certains patients présentent de multiples délétions de l'ADNmt provenant de mutations dans des gènes nucléaires codant pour des protéines impliquées dans la réplication ou le métabolisme des nucléotides mitochondriaux. Les trois phénotypes cliniques principaux associés à de larges délétions d'ADNmt sont le syndrome de Pearson, le syndrome de Kearns-Sayre et l'ophtalmoplégie externe progressive.

Le syndrome de Pearson est une maladie infantile caractérisée par une atteinte hématologique, avec une anémie macrocytaire sidéroblastique, mais aussi par une insuffisance pancréatique et un déficit de la phosphorylation oxydative avec augmentation des lactates (ORPHA 699). Le syndrome de Kearns-Sayre est une pathologie neuromusculaire caractérisée par l'apparition précoce d'une ophtalmoplégie et d'une rétinite pigmentaire. Certains patients développent aussi une atteinte cérébrale, cardiaque ou musculaire. Le dysfonctionnement mitochondrial se manifeste par des altérations morphologiques dans le muscle squelettique avec des fibres présentant une accumulation de mitochondries dysfonctionnelles (Ragged Red Fibers) et des fibres déficitaires en activité cytochrome c oxydase (ORPHA 480). L'ophtalmoplégie externe progressive se caractérise par un ptosis et une paralysie oculomotrice douloureuse, et est souvent associée à d'autres symptômes comme des troubles de la motricité (ORPHA 254892 et 254886).

Plus de 100 mutations ponctuelles de l'ADNmt associées à des pathologies ont aussi été décrites, à la fois dans des gènes codant pour des protéines de la chaine respiratoire et dans des ARNt et ARNr. Les phénotypes cliniques sont très variés et comprennent par exemple le syndrome de MELAS (mitochondrial encephalomyopathy with lactic acidosis and stroke-like episodes), le syndrome de MERRF (myoclonic ataxia and epilepsy with ragged red fibres), et la neuropathie optique héréditaire de Leber (LHON).

Le syndrome de MELAS est typiquement dû à une mutation ponctuelle, dans 80% des cas une transition A>G en m.3243, dans le gène de l'ARNt Leu, les patients sont généralement hétéroplasmiques. La maladie est multisystémique et débute souvent dans l'enfance ou chez le jeune adulte. Les symptômes se composent d'une myopathie mitochondriale, d'une encéphalopathie, d'une acidose lactique et d'épisodes neurologiques aigus ressemblant à des accidents ischémiques cérébraux. L'activité biochimique des complexes I et IV est souvent altérée chez les patients (ORPHA 550). Le syndrome de MERRF est une encéphalomyopathie mitochondriale caractérisée par des crises d'épilepsie myocloniques, causée à 80% par une transition A>G en m.8344, dans le gène de l'ARNt Lys. Les symptômes additionnels varient, avec une possible faiblesse musculaire, une atrophie optique, une atteinte cérébrale... Les fibres musculaires des patients présentent là aussi une accumulation de mitochondries dysfonctionnelles (Ragged Red Fibers) et des fibres déficitaires en activité cytochrome c oxydase. Comme pour le syndrome de MELAS la gravité dépend du taux d'hétéroplasmie et les complexes respiratoires I et IV sont atteints (ORPHA 551). La maladie de LHON est quant à elle souvent due à une mutation homoplasmique. Elle se manifeste par une baisse rapide de l'acuité visuelle centrale, survenant chez le patient jeune et 5 patients sur 6 sont des hommes. Elle est principalement due à trois mutations ponctuelles relativement communes : m.3460G>A, m.11778G>A et m14484T>C, qui affectent des gènes codant pour des sous unités du complexe I de la chaine respiratoire. Le dysfonctionnement mitochondrial dû à ces mutations cause une perte sélective des cellules ganglionnaires de la rétine puis une dégénérescence du nerf optique. Actuellement la raison pour laquelle les mutations affectent seulement la vision, bien qu'elles soient généralement ho-
moplasmiques et touchent toutes les cellules du patient, n'est pas expliquée. Tous les patients possédant une mutation liée à la neuropathie de Leber ne développent pas la pathologie, l'haplotype mitochondrial, le contexte génétique nucléaire ainsi que des facteurs environnementaux comme le tabagisme influencent la pénétrance de la maladie (ORPHA 104).

Le lien entre mutations mitochondriales et phénotypes est très complexe. Par exemple, la mutation m.3245A>G, caractéristique du syndrome de MELAS, a été retrouvée chez des patients atteints du syndrome de Kearns-Sayre ou d'ophtalmoplégie externe progressive, tout comme des patients atteints du syndrome de MELAS présentent des délétions d'ADNmt (Schapira, 2006). Une mutation peut générer différents phénotypes pathologiques et un même phénotype peut être causé par différentes mutations. Il n'y a pas non plus de lien entre le site de la mutation et le phénotype clinique.

Une accumulation de mutations somatiques de l'ADNmt est aussi observée chez les personnes âgées, avec différentes mutations ponctuelles et délétions. Même si la charge globale de mutations par organe est faible les mutations peuvent s'accumuler au sein d'une même cellule, menant à des défauts de la production énergétique. La proportion de cellules déficientes peut ensuite augmenter au cours du temps, ce qui suggère l'implication de ces mutations somatiques de l'ADNmt dans le processus de vieillissement.

3.2.2 Mutations de gènes nucléaires

Les mutations de gènes nucléaires causant des maladies mitochondriales peuvent être classées en deux types : les mutations qui affectent des gènes impliqués dans le métabolisme de l'ADNmt et celles qui affectent directement des gènes responsables de l'assemblage et de la stabilité des protéines de la chaine respiratoire.

Le premier type de mutations induit généralement de multiples délétions de l'ADNmt ou une déplétion en ADNmt. Des mutations des gènes du réplisome mitochondrial, notamment POL γ A, POL γ B et TWINKLE sont impliquées dans de nombreuses maladies mitochondriales. La première mutation découverte dans la sous unité alpha de la polymérase a été associée à l'ophtalmoplégie externe progressive (Van Goethem *et al.*, 2001). Lorsque la protéine POL γ A est mutée dans son domaine polymérase les pathologies qui en résultent sont le plus souvent dominantes, puisque la capacité de la protéine à se lier à l'ADN n'est pas altérée et qu'elle est donc en compétition avec la protéine sauvage active. Au contraire les maladies sont généralement récessives lorsqu'une mutation affecte le domaine « linker » ou le domaine exonucléase et diminue de ce fait la capacité de liaison à l'ADN ainsi que l'interaction avec POL γ B (Chan et Copeland, 2009). Presque un patient sur deux présentant de multiples délétions de l'ADNmt possède une mutation de POL γ (Ferreira *et al.*, 2011) et, par exemple, des souris homozygotes déficientes en activité exonucléase de POL γ A portent 90 fois plus de délétions de l'ADNmt que des souris sauvages au même âge (Vermulst et al., 2008). Ces délétions pourraient provenir d'un glissement du brin d'ADN lors de la réplication, dû à un amorçage de la réplication en aval de la cible, ce qui est évité par l'activité exonucléase de POL γ A, mais le mécanisme n'est pas clairement élucidé (Stumpf et al., 2013). D'autres mutations affectant l'activité polymérase de POL γ A ont été reliées à des mutations de l'ADNmt, délétions mais aussi mutations ponctuelles. Par exemple la tyrosine 955 est un acide aminé très conservé de la polymérase, qui joue un rôle critique dans l'incorporation des nucléotides et la fidélité de la réplication. La mutation de cette tyrosine en cystéine produit une protéine qui possède moins d'1% de l'activité polymérase comparée à la protéine sauvage et cause une réplication infidèle et des blocages de la fourche de réplication. Les patients hétérozygotes Y955C présentent une accumulation de mutations ponctuelles et de délétions de l'ADNmt ainsi qu'un phénotype d'ophtalmoplégie externe

progressive (Graziewicz *et al.*, 2004). Il a récemment été montré que cette même tyrosine peut aussi être mutée en histidine, résultant en un phénotype multi-systémique encore plus marqué, Le remplacement du groupe phényl hydrophobique de la tyrosine par la chaine polaire de l'histidine affecte fortement la stabilité de la protéine et la liaison à l'ADN, car la polymérase forme normalement à cet endroit une poche hydrophobique dont le solvant est exclu grâce à l'encombrement du groupe phényl (Siibak *et al.*, 2017). La mutation du gène POL γ peut aussi entrainer une déplétion en ADNmt, par exemple pour les patients atteints du syndrome d'Alpers. Des mutations de la sous-unité bêta de la polymérase ont également été identifiées chez des patients atteints d'ophtalmoplégie externe progressive autosomale dominante (Walter *et al.*, 2010). Cette maladie peut aussi être causée par des mutations de la protéine TWINKLE, qui suppriment soit son activité hélicase, soit sa capacité à se lier à l'ADN ou soit son aptitude à former des hexamères/ heptamères (Longley *et al.*, 2010). Les mutations récessives de TWINKLE sont quant à elles associées à une déplétion d'ADNmt et non pas à des délétions (Ylikallio et Suomalainen, 2012).

D'autres mutations de gènes nucléaires impliqués dans la réplication et la transcription de l'ADNmt ont des conséquences très délétères. Une mutation homozygote entrainant la perte de fonction de la nucléase MGME1, impliquée dans le clivage du «flap» lors de la réplication de l'ADNmt, a par exemple été identifiée chez plusieurs patients présentant une maladie mitochondriale multi-systémique sévère (Kornblum et al., 2013). La perte de MGME1 a plusieurs conséquences au niveau de l'ADNmt : la présence d'ADN 7S rallongé et une diminution du nombre de copies, une accumulation d'un fragment d'ADNmt linéaire de 11kb provenant de cassures de l'ADN lors de la réplication, ainsi que des réarrangements de l'ADNmt, notamment des duplications et des délétions (Nicholls et al., 2014). Des mutations hétérozygotes de l'hélicase/ nucléase DNA2 ont aussi été découvertes chez des patients souffrant de maladies mitochondriales associées à des délétions de l'ADNmt (Ronchi et al., 2013). Il est possible que ces mutations affectent la réplication, car DNA2 joue elle aussi un rôle dans le clivage du « flap », mais également dans la réparation par excision de base (BER), qui sera détaillée dans la partie 4.2.1. Il a aussi été montré que des mutations du domaine catalytique de la RNase H1, qui dégrade l'ARN dans les duplex ARN/ ADN, causent une ophtalmoplégie externe progressive et une intolérance à l'exercice chez des patients adultes. In vitro les variants RNase H1 ont une capacité réduite à dégrader l'ARN et le phénotype observé est donc probablement dû à une mauvaise élimination des amorces ARN lors de la réplication de l'ADNmt, et à l'accumulation de délétions (Reyes et al., 2015). Enfin, des mutations du facteur de transcription mitochondrial TFAM sont aussi responsables de pathologies. Un variant faux sens homozygote est par exemple associé à des déplétions d'ADNmt (Stiles et al., 2016), et des mutations décalant le cadre de lecture et produisant des protéines tronquées ont aussi été détectées dans des cellules du cancer colorectal, entrainant également une déplétion en ADNmt (Guo et al., 2011). Le dysfonctionnement de protéines impliquées dans le métabolisme mitochondrial des nucléotides a aussi des conséquences désastreuses pour la cellule, impliquant généralement une déplétion d'ADNmt dans les tissus atteints. Le syndrome de déplétion de l'ADNmt a un phénotype hétérogène, comportant notamment des formes hépatocérébrales, myopathiques et cardiomyopathiques, mais résulte souvent en une mort précoce du patient. Des mutations de trois gènes impliqués dans les voies de synthèse du réservoir mitochondrial de nucléotides, qui seront détaillées dans la partie 4, ont été associées à des déplétions mitochondriales : la thymidine kinase 2 (TK2) (Saada et al., 2001), la désoxyguanosine kinase (dGK) (Mandel et al., 2001) et la ribonucléotide réductase (RNR) (Bourdon et al., 2007). Un déséquilibre dans la composition du réservoir de nucléotides peut aussi être délétère. Par exemple une mutation de la thymidine phosphorylase (TP), qui dégrade normalement la thymide, cause une encéphalopathie myo-

neuro-gastrointestinale (MNGIE), associée à des délétions de l'ADNmt, une déplétion et des mutations ponctuelles (Ylikallio et Suomalainen, 2012). La liste des gènes nucléaires dont le dysfonctionnement entraine un syndrome de déplétion d'ADNmt n'est ici pas exhaustive.

Bien que la majorité des sous unités des complexes respiratoires soit codée par le noyau peu de mutations ont été identifiées. Elles sont probablement souvent délétères et fatales à l'embryon. Quelques mutations de sous unités du complexe I, entrainant le syndrome de Leigh et une leucodystrophie, et du complexe II, induisant le syndrome de Leigh, une ataxie et des tumeurs sécrétrices de catécholamines, ont été décrites. Aucune mutation de sous unités nucléaires du complexe IV n'a été identifiée (Schapira, 2006). Cependant le dysfonctionnement de protéines mitochondriales codées par le noyau et impliquées dans la maintenance et l'assemblage du complexe IV est impliqué dans des déficiences de ce complexe héritées de manière récessive et causant syndrome de Leigh, myopathie, encéphalopathie et acidose lactique. C'est le cas par exemple de mutations des protéines SCO2, SURF1, COX10, COX15 et LRPPRC.

3.3 Diagnostic

Un dysfonctionnement mitochondrial doit être considéré lors du diagnostic différentiel d'une maladie progressive multisystémique. Les signes cliniques évocateurs peuvent parfois correspondre à des syndromes bien définis tels ceux de MERRF, MELAS, Pearson ou Kearns Sayre, mais sont souvent des atteintes touchant plusieurs organes, fréquemment le muscle et le système nerveux. Le diagnostic clinique est compliqué, les symptômes étant très variables d'un patient à l'autre et les maladies mitochondriales nombreuses. Il faut aussi tenir compte de l'âge du patient car les manifestations pathologiques ne seront pas les même (Auré et al., 2005). Classiquement la première étape du diagnostic consiste en une analyse biochimique pour évaluer des biomarqueurs mitochondriaux et notamment les niveaux de lactate et de pyruvate dans le sang, l'urine et le liquide rachidien. L'imagerie est aussi utilisée, à la recherche de signes évocateurs telles une atteinte des noyaux gris centraux, la calcification des ganglions de la base ou des lésions occipitales de type ischémique, avec parfois la présence d'un pic de lactate en spectroscopie RMN cérébrale. L'étude morphologique et histochimique des muscles peut permettre de mettre en évidence la présence de fibres musculaires présentant une accumulation de mitochondries dysfonctionnelles (Ragged Red Fibers), par coloration au trichrome de Gomori, et de fibres déficitaires en activité cytochrome c oxydase, signalant la myopathie mitochondriale. Cependant ce diagnostic n'est pas suffisant car la morphologie musculaire peut par exemple être normale chez un enfant malade. La mesure de l'activité des complexes respiratoires est aussi une étape du diagnostic, plus informative chez l'enfant que chez l'adulte, car chez celui-ci le déficit d'OXPHOS est souvent beaucoup moins important. Cette mesure peut se faire par spectrophotométrie sur tissus congelés ou par polarographie en mesurant la consommation d'oxygène sur mitochondries isolées ou tissus perméabilisés vivants (Liang et al., 2014).

L'analyse génétique au niveau mitochondrial ou nucléaire peut permettre d'identifier la pathologie. Elle est cependant compliquée à cause du grand nombre de gènes potentiellement impliqués, en effet 83 gènes codent pour des sous unités des complexes et plus d'une centaine pour des protéines impliquées dans la maintenance, l'assemblage ou la régulation de l'ADNmt et de la chaine respiratoire. Les analyses génétiques moléculaires peuvent être réalisées sur de l'ADN extrait du sang mais il est préférable d'extraire l'ADN à partir d'un tissu atteint, notamment pour étudier les mutations de l'ADNmt, car les mutations pathogéniques sont souvent moins détectées dans le sang (Rahman *et al.*, 2001). Une analyse de l'histoire familiale est importante en premier lieu. Une transmission purement maternelle indique un défaut primaire

de l'ADNmt alors qu'une transmission autosomale orientera vers une mutation d'un gène nucléaire.

Généralement l'analyse génétique débute par une étude de l'ADNmt. Des analyses par Southern Blot peuvent permettre d'identifier des réarrangements de l'ADNmt et notamment des délétions. La présence de multiples délétions orientera vers l'étude de gènes nucléaires impliqués dans la maintenance de l'ADNmt, par exemple POL γ ou TP. L'ADNmt est aussi quantifié par PCR quantitative, ce qui permet de mettre en évidence les déplétions, dues à des mutations dans des gènes nucléaires tels POL γ , TWINKLE ou TK2, ou au contraire les amplifications, qui peuvent correspondre à une prolifération mitochondriale visant à compenser un déficit dû à une mutation ponctuelle de l'ADNmt. Lorsque le phénotype du patient ainsi que les analyses biochimiques et morphologiques permettent de suspecter une maladie classique, par exemple le syndrome de MELAS, les mutations communes responsables de cette pathologie peuvent être testées par séquençage Sanger. Ensuite l'étude génétique est orientée par l'analyse de l'activité des complexes réalisée précédemment. En présence d'un déficit isolé, on étudiera en priorité les gènes codant pour les sous unités protéiques du complexe correspondant, alors qu'un déficit de plusieurs complexes orientera vers les gènes d'ARNt, notamment l'ARNt Leu et l'ARNt Lys qui sont des hot-spots de mutations. Le séquençage total du génome mitochondrial par NGS est maintenant réalisable du point de vue technique, et remplace souvent le séquençage Sanger, ciblé, ainsi que les analyses de réarrangement par Southern Blot, peu sensibles (McCormick et al., 2013; Ye et al., 2014). Cependant son analyse est complexe. Le séquençage doit être réalisé de préférence sur le tissu atteint, car tous les tissus n'ont pas la même charge en ADNmt muté, et la technique doit permettre de détecter les mutations même à un faible taux d'hétéroplasmie. De plus, l'ADNmt est très polymorphe. Il faut donc analyser les variants détectés, s'ils ne sont pas déjà répertoriés, afin d'évaluer leur rôle pathogène, par exemple en étudiant la conservation de la séquence au cours de l'évolution.

La détection de mutations de l'ADN nucléaire peut être faite par séquençage ciblé des gènes couramment impliqués dans les pathologies mitochondriales, comme POL γ ou TWINKLE, mais aussi par séquençage total de l'exome (Carroll et al., 2014). L'exome, c'est-à-dire les régions codantes, comprend environ 1,6% du génome nucléaire humain. Le séquençage total de l'exome est donc beaucoup plus facile que le séquençage du génome entier, et permet d'identifier la grande majorité des mutations pathogéniques. Un filtrage des mutations détectées est nécessaire, en éliminant les SNPs (single-nucleotide polymorphism) communs, et éventuellement en se focalisant sur les gènes codant pour des protéines dont la localisation mitochondriale a été prouvée. Il est aussi possible de cibler le NGS directement sur les protéines mitochondriales (Calvo et al., 2012). Le séquençage de l'exome est disponible en clinique depuis 2011 et est de plus en plus utilisé dans le diagnostic de patients potentiellement atteints par une maladie mitochondriale (Parikh et al., 2015). Cette technique a permis de détecter de nouvelles mutations pathogéniques des gènes nucléaires, mais aussi d'identifier de nouvelles protéines du protéome mitochondrial. Par exemple la protéine FBXL4, considérée auparavant uniquement nucléaire, a été associée à une encéphalopathie mitochondriale avec déplétion d'ADNmt par séquençage de l'exome (Lightowlers et al., 2015).



FIGURE 15 – Voies de synthèse des nucléotides

Les nucléotides peuvent être synthétisés *de novo*, ou à partir des bases obtenues par recyclage de l'ADN et l'ARN par la voie de sauvetage. Un échange de nucléotides a lieu entre les mitochondries et le cytoplasme. TS : thymidylate synthase, TK : thymidine kinase, dCK : désoxycytidine kinase, dGK : désoxyguanine kinase.

Chapitre 4

Maintenance de l'ADN mitochondrial

4.1 Maintenance du réservoir de nucléotides

La réplication de l'ADNmt a lieu dans la matrice mitochondriale, séparée du cytosol par une double membrane, ce qui nécessite un réservoir de nucléotides spécifique, de composition particulière. La présence dans la mitochondrie des quatre nucléotides dans des proportions précises est nécessaire pour une réplication fidèle de l'ADNmt. Un déséquilibre dans la composition du pool de nucléotides est en effet la cause de plusieurs maladies mitochondriales liées à une déplétion en ADNmt, comme vu au 3.2.2. Les nucléotides sont produits dans la cellule grâce à deux voies de synthèses (**Figure 15**). La voie *de novo*, cytosolique, convertit les ribonucléotides en désoxyribonucléotides et est active uniquement pendant la phase S du cycle cellulaire. Comme l'ADNmt est répliqué indépendamment du cycle cellulaire ainsi que dans les cellules post-mitotiques comme les neurones et les cellules du muscle squelettique, la deuxième voie de synthèse, la voie de sauvetage, est cruciale pour fournir des dNTPs lors de la réplication mitochondriale. Dans ce cas les désoxyribonucléosides, obtenus par dégradation de l'ARN et de l'ADN, et par exemple de l'ADN 7S, sont phosphorylés en dNTPs.

Les voies de synthèse de novo des nucléotides puriques (ATP et GTP) et pyrimidiques (CTP, UTP et TTP) sont différentes et comprennent chacune plus d'une dizaine d'étapes. Elles utilisent toutes les deux le sucre activé 5-phospho- α -D-ribosyl 1-pyrophosphate (PRPP). Lors de la synthèse des nucléotides puriques le PRPP est transformé en inosine monophosphate (IMP) suite à plusieurs réactions nécessitant 5 ATP, 2 glutamines, 1 glycine, 1 molécule de CO₂, 1 aspartate et 2 molécules d'acide formique. L'IMP permettra ensuite de synthétiser soit l'AMP, grâce à l'utilisation d'énergie sous forme de GTP, soit le GMP, grâce à l'utilisation d'ATP. L'IMP, l'AMP et le GMP inhibent la PRPP synthase et permettent donc d'effectuer un rétrocontrôle sur la voie de synthèse *de novo* des nucléotides puriques. Pour la synthèse *de novo* des nucléotides pyrimidiques le carbamyl phosphate et l'aspartate sont transformés en orotate par trois réactions consécutives. L'orotate, après réaction avec le PRPP, donne ensuite l'UMP. Celui-ci est phosphorylé en UTP, qui peut être transformé en CTP. La synthèse de dTTP, elle, requiert l'activité de la thymidylate synthase (TS) qui catalyse la méthylation réductrice du dUMP en dTMP, en utilisant le methylène tétrahydrofolate comme donneur de méthyl. Il n'y a donc pas de branchement dans la synthèse comme pour la synthèse des nucléotides puriques avec l'IMP (Lane et Fan, 2015). Les ribonucléotides formés sont réduits en désoxyribonucléotides par une ribonucléotide réductase (RNR), et sont ensuite importés dans les mitochondries par des transporteurs (Nordlund et Reichard, 2006). La synthèse de novo des nucléotides est couteuse en énergie et soumise au cycle cellulaire car plusieurs enzymes comme TS ou une petite sous-unité de RNR sont régulés négativement en dehors de la phase S.

Au contraire la voie de sauvetage recycle les nucléosides et désoxynucléosides pour synthétiser les nucléotides correspondants. Cette voie de synthèse opère à la fois dans le cytosol et les mitochondries. Quatre désoxynucléosides kinases sont présentes chez les mammifères. La thymidine kinase 1 (TK1), nucléaire, phosphoryle la thymidine (dT) et la désoxyuridine (dU), la désoxycytidine kinase (dCK), elle aussi nucléaire, phosphoryle la désoxycytidine (dC), la désoxyadenosine (dA) et la désoxyguanosine (dG). Les deux enzymes restantes sont mitochondriales, la thymidine kinase 2 (TK2) phosphoryle dC, dT et dU alors que la désoxyguanosine kinase (dGK) phosphoryle dG et dA. Les désoxynucléosides monophosphates (dNMPs) obtenus sont ensuite phosphorylés en dNTPs par des kinases (Wang, 2016).

De nombreuses autres protéines sont impliquées dans la régulation des nucléotides au niveau mitochondrial. Par exemple la désoxynucléotide triphosphohydrolase SAMHD1 a un rôle important dans l'homéostasie du réservoir de dNTPs, puiqu'elle peut hydrolyser les dNTPs qui seront ensuite recyclés par les nucléosides kinases (Franzolin *et al.*, 2015). Des transporteurs sont aussi impliqués dans les échanges de nucléotides entre compartiments nucléaire et mitochondriaux, comme les protéines de la famille des transporteurs de solutés (SLC) (Di Noia *et al.*, 2014). De plus des enzymes du métabolisme énergétique, comme SUCLG1 ou SUCLA2, jouant un rôle dans le cycle de Krebs, influent également sur l'homéostasie des nucléotides. En effet elles catalysent la synthèse du succinyl-CoA en utilisant préférentiellement le GTP ou l'ATP, ce qui induit un déséquilibre lorsque l'une des protéines est mutée (Ostergaard *et al.*, 2007).

La composition du réservoir de nucléotides mitochondriaux est asymétrique, les quatre nucléotides n'étant pas présents dans les mêmes proportions. Cette asymétrie peut venir du fait que les enzymes mitochondriales TK2 et dGK n'ont pas la même efficacité en fonction de leur substrat. Par exemple TK2 phosphoryle dT avec une meilleure efficacité que dC, entrainant un niveau de dTTP plus élevé que celui du dCTP dans les mitochondries (Eriksson *et al.*, 2002).

Il a récemment été montré que la composition du réservoir de nucléotides est aussi importante dans l'incorporation potentiellement dommageable de ribonucléotides lors de la réplication de l'ADNmt. En effet l'ADNmt comprend 10 à 30 ribonucléotides par molécule (Grossman et al., 1973), pouvant provenir soit de restes d'amorces ARN partiellement enlevées, soit d'une erreur de POL γ qui ajouterait un ribonucléotide à la place d'un désoxyribonucléotide lors de la réplication. Une récente étude indique que l'incorporation de ribonucléotides serait plutôt dépendante de POL γ (Berglund *et al.*, 2017). POL γ a une affinité beaucoup plus importante pour les dNTPs que pour les NTPs mais une perturbation de la composition nucléotidique dans les mitochondries, avec par exemple une accumulation de NTPs, entraine une augmentation de l'incorporation de ribonucléotides dans l'ADNmt (Copeland et Longley, 2014). Lorsque le réservoir de dNTPs est limitant cette incorporation peut permettre d'éviter le blocage de la réplication, qui serait dommageable pour la cellule. Il a cependant été montré qu'une accumulation de ribonucléotides dans l'ADN cause une instabilité génomique pouvant induire des cassures simple-brin ou double-brin (Williams *et al.*, 2016). POL γ est capable de contourner un ribonucléotide lors de la réplication, mais une série de quelques ribonucléotides entraine un blocage de la fourche de réplication. Il n'existe pas de réparation par excision de ribonucléotide (RER) dans les mitochondries, et POL γ n'a pas d'activité relecture, grâce à son activité exonucléase, vis-à-vis des NTPs (Berglund et al., 2017). Dans des cellules de patients présentant une altération du réservoir de nucléotides la quantité de ribonucléotides dans l'ADNmt est plus élevée. L'incorporation d'une série de NTPs est alors envisageable, ce qui pourrait causer des problèmes de transcription et de réplication.

Un aspect important de la maintenance du réservoir de nucléotides dans la mitochondrie est la gestion des dommages oxydants. En effet comme dit précédemment (1.3) la phosphoryla-



FIGURE 16 – Assainissement du réservoir de nucléotides par MTH1 En hydrolysant les nucléotides libres oxydés MTH1 empêche leur incorporation lors de la synthèse d'ADN, ce qui pourrait sinon induire des mutations. Adapté de (Dominissini et He, 2014).

tion oxydative est une source de production de ROS. Ceux-ci peuvent endommager l'ADN mais aussi réagir avec les dNTPs libres et les oxyder. Les dNTPs oxydés peuvent ensuite être incorporés dans l'ADN, créant une instabilité génomique et une diminution de la fidélité de réplication. Par exemple POL γ peut incorporer le 8-oxo-dGTP, même à l'état de traces, à la place du dTTP, induisant une transversion A-T -> C-G (Pursell et al., 2008). La cellule a mis en place des mécanismes pour éliminer les nucléotides libres oxydés. Principalement dans le cytoplasme, mais aussi dans la mitochondrie, la protéine MTH1 (MutT homolog-1), aussi appelée NUDT1, une triphosphatase de nucléosides purines oxydés, est capable d'hydrolyser les nucléotides GTP, dGTP, ATP et dATP oxydés comme le 8-oxo-(d)GTP ou le 2-OH-(d)ATP (Nakabeppu et al., 2006) (Figure 16). Elle a donc un rôle protecteur en diminuant la concentration de nucléotides oxydés, ce qui empêche leur incorporation dans l'ADN lors de la réplication. MTH1 fait partie de la famille des hydrolases Nudix qui catalysent l'hydrolyse de nucléosides diphosphates liés à un autre groupement, X (Mildvan et al., 2005). Les protéines de cette famille présentent un motif consensus qui facilite l'activité phosphohydrolase : Gx5Ex2[UA]xREx2EExGU (où « U » est un résidu aliphatique hydrophobique et « x » un acide aminé quelconque). Elles hydrolysent une grande diversité de substrats et ne sont pas toutes impliquées dans l'assainissement des nucléotides oxydés. Par exemple NUDT15 a une faible efficacité d'hydrolyse des nucléotides oxydés alors qu'elle hydrolyse relativement efficacement le dGTP et le 6-thio(d)GTP (Rudd et al., 2016). Certaines autres protéines de la famille NUDIX sont localisées à la mitochondrie, mais leur rôle dans la maintenance du réservoir de nucléotides n'est pas connu. Par exemple NUDT9 α , cytosolique, comporte une séquence d'adressage mitochondrial et est une pyrophosphatase de l'ADP ribose, son activité d'hydrolyse de nucléotides n'a pas été étudiée (Long et al., 2017). Dans les mitochondries l'assainissement du réservoir de nucléotides pourrait être crucial à la cellule du fait du haut taux de ROS produits dans cet organite.

4.2 Réparation des dommages de l'ADN

L'ADN peut être endommagé par de nombreux agents exogènes, tels les radiations ionisantes ou les agents chimiothérapeutiques, ainsi que par des réactions spontanées endogènes, comme des mésappariements de bases lors de la réplication, des désaminations, dépurinations ou dépyrimidations de bases, et des dommages oxydatifs dus à la réaction des ROS produits par la chaine respiratoire sur l'ADN.

Au niveau nucléaire les mécanismes de réparation qui permettent de réparer les dommages de l'ADN chromosomique sont relativement bien caractérisés et certains mécanismes sont retrouvés au niveau mitochondrial. Ainsi des voies de réparation par excision de base (BER), réparation par excision de nucléotides (NER), réparation des mésappariements (MMR) et réparation des cassures double-brin (CDB) ont été mises en évidence dans le noyau. Le BER, une voie de réparation très conservée, a été le premier mécanisme de réparation décrit dans la mitochondrie. Depuis il a été montré que des acteurs du MMR et de la réparation des CDB sont aussi présents au niveau mitochondrial. Au contraire le NER n'a probablement pas lieu pour réparer l'ADNmt (Kazak *et al.*, 2012).

4.2.1 Réparation des bases endommagées

La réparation par excision de base permet de réparer les lésions non encombrantes produites par oxydation, alkylation, désamination ou cassure simple-brin (CSB) (Krokan et Bjørås, 2013). Le mécanisme est le même pour la réparation nucléaire et mitochondriale, seuls certains acteurs diffèrent. Il peut être résumé par les étapes suivantes : Tout d'abord la base endommagée est



FIGURE 17 – Réparation par excision de base dans la mitochondrie

reconnue et excisée par une ADN glycosylase spécifique de chaque dommage, par clivage de la liaison N-glycosidique entre la base et son désoxyribose. Puis le site abasique (AP) qui en résulte est supprimé par clivage du squelette phosphodiester. Ensuite les extrémités libérées sont modifiées et le vide est comblé par l'ajout de nucléotide(s) par la polymérase. Enfin la ligation entre le(s) nucléotide(s) ajouté(s) et le reste de la molécule d'ADN, par la ligase 3 dans la mitochondrie, termine le processus de réparation.

Deux voies existent pour la réparation par excision de bases : une voie courte («short-patch», SP-BER) où un seul nucléotide est synthétisé et une voie longue («long patch», LP-BER) où deux nucléotides ou plus sont synthétisés (**Figure 17**).

La voie SP-BER est la première à avoir été mise en évidence dans la mitochondrie. Dans cette voie le clivage du site AP peut être réalisé soit directement par la glycosylase si elle possède une activité lyase (glycosylase bifonctionnelle) soit par l'AP endonucléase (APE1) dans le cas d'une glycosylase monofonctionnelle. Les glycosylases bifonctionnelles sont au nombre de quatre dans la mitochondrie. Elles peuvent avoir une activité β -lyase, comme la 8-oxoguanine DNA glycosylase (OGG1) et la nth (E.coli endonucléase III)-like-1 (NTH1), ou β , δ -lyase, comme les Nei (E.coli endonucléase VIII)-like-1 et -2 (NEIL1 et NEIL2). Elles reconnaissent les dommages de type oxydatif et nécessitent l'intervention d'APE1 pour modifier les extrémités de l'ADN avant l'insertion de nouveaux nucléotides par POL γ dans le cas de OGG1 et NTH1, ou de la polynucléotide kinase phosphate (PKNP) pour NEIL1 et NEIL2. Les glycosylases monofonctionnelles, elles, sont au nombre de trois dans la mitochondrie : l'uracil ADN glycosylase 1 (UNG1 aussi appelée UDG1), l'alkyladenine ADN glycosylase (AAG) et la glycosylase MUTYH (aussi appelée MYH). Elles sont principalement impliquées dans la réparation des bases alkylées ou désaminées. Le groupe 5'-désoxyribosophosphate (5'-dRP) généré par APE1 après l'action d'une glycosylase monofonctionnelle est éliminé grâce à l'activité dRP lyase de POL γ . Quelle que soit la glycosylase impliquée pour éliminer la base endommagée et les autres protéines responsables du clivage du site abasique et de sa modification, le vide obtenu est un manque d'un seul nucléotide, avec des extrémités 5'-P et 3'-OH. POL γ comble ce vide en ajoutant le nucléotide complémentaire au brin opposé et la ligase 3 relie ce nucléotide au reste de la molécule d'ADNmt (Akhmedov et Marín-García, 2015; Prakash et Doublié, 2015).

FIGURE 17 : Réparation par excision de base dans la mitochondrie

Le système du BER est mis en place pour réparer les dommages des bases de l'ADN, comme des oxydations ou des alkylations. La base endommagée est reconnue et éliminée par une glycosylase. Les glycosylases monofonctionnelles suppriment la base puis APE1 clive l'ADN, alors que les glycosylases bifonctionnelles possèdent ces deux activités, et la cassure qu'elles génèrent est ensuite modifiée par APE1 ou PNKP. Si le vide obtenu sur l'ADN a des extrémités 5'-P et 3'-OH libres POL γ synthétise le nucléotide manquant et la ligase 3 relie ce nucléotide au reste de la molécule, c'est la voie courte du BER (SP-BER). Au contraire si l'extrémité 5' est encombrée POL γ va déplacer le brin sur deux nucléotides ou plus, générant une extrémité sortante simple-brin appelée « flap », c'est la voie longue du BER (LP-BER). Les extrémités courtes sont clivées par FEN1 et EXOG, alors que les extrémités longues sont d'abord clivées par DNA2, qui génère une extrémité courte, puis par FEN1 et EXOG. La ligase 3 relie ensuite l'ADN nouvellement synthétisé au reste de la molécule. 3'-PUA : 3'-phospho- α , β -unsaturated aldehyde, 5' dRP : 5' désoxyribosephosphate. Adapté de (Kazak *et al.*, 2012).

La voie LP-BER a été détectée plus tardivement dans la mitochondrie (Akbari et al., 2008). Elle est recrutée lorsque l'extrémité 5', après clivage par une AP endonucléase, est réfractaire à l'activité dRP lyase de POL γ . C'est le cas par exemple lorsque des 2-désoxyribonolactones (dL) sont générées suite à l'oxydation de l'ADN lors de la formation spontanée de sites abasiques oxydés, sans intervention d'une ADN glycosylase. Il a été montré que les tentatives de réparation d'un site dL par une protéine possédant une activité dRP-lyase entraine le blocage de cette protéine par liaison covalente avec l'ADN (DeMott et al., 2002). Puisque la polymérase ne peut donc pas éliminer l'extrémité 5' elle va continuer la polymérisation en déplaçant le brin contenant l'extrémité modifiée, ajoutant 2 à 12 nucléotides au lieu d'un seul pour remplacer le nucléotide manquant. La structure « flap » formée doit ensuite être éliminée pour que l'ADN nouvellement synthétisé soit scellé au reste de la molécule. Des endonucléases spécifiques éliminent donc le fragment déplacé. Dans la mitochondrie ce sont FEN1, qui intervient aussi dans le LP-BER nucléaire, et DNA2 (Zheng et al., 2008; Liu et al., 2008). FEN1 élimine de préférence les « flaps » courts et DNA2 ceux qui sont plus longs. Cependant il a été montré que DNA2 ne peut pas cliver le fragment à la jonction ADN simple-brin/ ADN double-brin, et laisse donc un « flap » résiduel qui devra être éliminé par une autre nucléase. De plus l'exo/ endonucléase G (EXOG) a aussi un rôle dans le BER. Cette protéine exclusivement mitochondriale a une activité endonucléase simple-brin et une activité 5'-3' exonucléase, elle peut éliminer le groupe bloquant de nucléotides dans le LP-BER. Une déplétion en nucléase EXOG affecte le génome mitochondrial et entraine des dysfonctionnements mitochondriaux ainsi que l'apoptose. Il a été démontré que EXOG interagit physiquement avec d'autres protéines de la voie BER, notamment POL γ , APE1 et la ligase 3 (Tann *et al.*, 2011). EXOG pourrait être la nucléase préférentielle pour le BER mitochondrial, FEN1 étant principalement nucléaire. Le complexe du LP-BER nucléaire comporte plusieurs protéines autres que l'endonucléase dégradant le « flap », comme la protéine d'échafaudage XRCC1, qui est nécessaire pour la stabilisation de la ligase, et la pince à ADN PCNA (Proliferating cell nuclear antigen), mais de telles composantes n'ont pas encore été mises en évidence dans la mitochondrie (Muftuoglu et al., 2014).

La majorité des protéines impliquées dans le BER mitochondrial sont des isoformes ou des variants d'épissage des gènes codant pour les facteurs correspondants au niveau nucléaire. Par exemple le gène OGG1 produit deux transcrits par épissage alternatif, OGG1 α et OGG1 β (Ni-shioka *et al.*, 1999). OGG1 α possède un domaine C-terminal portant une séquence d'adressage nucléaire et se localise principalement au noyau mais aussi à la mitochondrie. OGG1 β quant à elle est localisée uniquement à la mitochondrie. Cependant la protéine recombinante OGG1 β ne possède pas d'activité glycosylase détectable, ce qui suggère que OGG1 α est responsable du clivage des bases modifiées 8-oxo-guanines à la fois dans le noyau et la mitochondrie (Hashi-guchi *et al.*, 2004).

La voie mitochondriale de réparation par excision de base est très performante, en effet la réparation du 8-oxo-dG, la lésion oxydative la plus courante, est plus efficace dans les mitochondries que dans le noyau (Thorslund *et al.*, 2002).

Il existe aussi au niveau nucléaire la réparation directe de certaines lésions, comme les dimères pyrimidines de cyclobutanes ou les bases méthylées. Le premier dommage est réparé chez les plantes et les levures par des photolyases dans les mitochondries (Takahashi *et al.*, 2011; Yasui *et al.*, 1992), mais ces enzymes n'existent pas chez les mammifères. Le second est réparé grâce à la principale protéine impliquée dans la réparation directe nucléaire, la O6methyl-guanine ADN methyl transférase (MGMT) qui transfère le groupe méthyl de la base modifiée sur un de ses résidus cystéines, causant son inactivation. L'élimination des O6-methylguanosines et des O6-ethyl-2'-désoxyguanosines de l'ADNmt a été montrée, sur extraits mitochondriaux de foie de rat et sur tissu de foie de rat *in vivo* respectivement (Myers *et al.*, 1988;

Satoh *et al.*, 1988). Cependant MGMT ne semble pas être présente dans la mitochondrie, une autre protéine pourrait donc être responsable de cette activité de réparation (Rasmussen et Rasmussen, 2005).

La réparation par excision de nucléotides (NER) est principalement utilisée au niveau nucléaire pour l'élimination de lésions encombrantes tels les dimères de pyrimidines causés par l'exposition aux UV, mais aussi pour la réparation d'oxydations de l'ADN. Elle peut se faire par deux voies, un mécanisme réparant les liaisons bloquant la transcription (Transcription-Coupled NER) et un mécanisme excisant les dommages sur l'ensemble du génome (Global Genome NER). Globalement les deux voies peuvent être décrites par quatre étapes : Reconnaissance de la lésion, recrutement du complexe de pré-incision et déroulement de l'ADN, excision du fragment d'ADN endommagé par incision de chaque côté de la lésion et finalement synthèse d'ADN pour remplacer le fragment et ligation. Les systèmes NER ne sont pas actifs dans les mitochondries (Melis *et al.*, 2013).

Les mésappariements de bases et les petites boucles d'insertion ou de délétion de 1 à 4 nucléotides sont corrigés par la voie de réparation MMR. Le mécanisme de MMR nucléaire est très conservé de la bactérie à l'Homme et implique des homologues des protéines bactériennes, par exemple MSH2, MSH6 et MLH1. L'existence d'un système MMR mitochondrial a été détectée par des analyses *in vitro* avec des extraits mitochondriaux humains (Mason *et al.*, 2003). Les acteurs ne sont pas les mêmes que dans le noyau : la protéine YB-1, mitochondriale, se lie aux bases mésappariées et est probablement impliquée dans la reconnaissance de la lésion (de Souza-Pinto *et al.*, 2009), mais les autres protéines responsables de l'activité MMR n'ont pas été identifiées. Seule MSH5 a été détectée dans la mitochondrie, mais son rôle n'a pas été étudié en détails (Bannwarth *et al.*, 2012).

4.2.2 Réparation des cassures simple-brin

Les cassures simple-brin (CSB) peuvent être générées directement par attaque des ROS mais aussi lors du BER, pendant l'étape de clivage du squelette d'ADN au niveau du site abasique. Ce sont les lésions d'ADN les plus communes. Si elles ne sont pas réparées elles peuvent entrainer un blocage de la fourche de réplication et de la transcription, ce qui peut évoluer en une cassure double-brin (CDB), très délétère pour la cellule. La réparation des cassures simple-brin (SSBR) peut être considérée comme une voie secondaire du BER. Tout comme pour le BER classique le SSBR peut être résumé en plusieurs étapes : détection de la lésion, modification de la cassure pour permettre le travail de la polymérase, synthèse d'ADN et ligation.

Dans le noyau la détection et la signalisation d'une cassure d'ADN sont réalisées par les protéines de la famille des polymérases de poly(ADP-ribose) (PARP) qui modifient d'autres protéines en leur ajoutant des polymères d'ADP ribose. Cette modification post traductionnelle est appelée Poly (ADP-ribosyl)ation, ou PARylation. Chez l'Homme la famille des PARP comporte 17 membres, PARP-1 étant l'isoforme principalement impliquée dans l'induction de la réponse aux cassures d'ADN. PARP-1 est activée lors de la reconnaissance de la lésion, ce qui entraine son auto-parylation et l'ajout de polymères PAR sur des protéines nucléaires responsables de la réparation des cassures (Ishak *et al.*, 2016). La présence des protéines PARP à la mitochondrie est toujours débattue. Certaines études ont détecté des protéines PARylées à l'intérieur des mitochondries après un traumatisme cérébral (Lai *et al.*, 2008), ou des interactions entre PARP-1 et des protéines du BER mitochondrial comme EXOG et POL γ , par une technique d'immunofluorescence spécifique (Proximity ligation assay) (Szczesny *et al.*, 2014). Cependant d'autres études n'ont pas permis de mettre en évidence la localisation mitochondriale de PARP, et suggèrent plutôt que PARP nucléaire serait impliquée dans la réparation de

l'ADNmt en régulant l'expression de gènes nucléaires codant pour des facteurs de maintenance de l'ADNmt (Lapucci *et al.*, 2011). De plus Szczesny *et al.* ont montré que PARP-1 inhibe la réparation de l'ADNmt. En effet des cellules déplétées en PARP-1 présentent une plus forte interaction entre les différentes protéines du BER mitochondrial, comme POL γ , la ligase 3 ou APE1, et une activité BER mitochondriale augmentée. Les auteurs suggèrent que la PARylation mitochondriale des enzymes de réparation de l'ADNmt inhibe leur activité catalytique ou retarde l'assemblage du complexe de réparation (Szczesny *et al.*, 2014). Ces résultats contradictoires pourraient indiquer que la présence d'une PARP mitochondriale, ainsi que son rôle, dépend du tissu, du cycle cellulaire ou de la quantité de dommages de l'ADNmt (Sykora *et al.*, 2012). D'autres protéines pourraient être responsables du recrutement des acteurs de réparation aux sites de CSB mitochondriales.

L'étape suivante consiste à modifier les extrémités de la CSB afin que la ligation puisse être réalisée, après l'éventuelle synthèse d'ADN par la POL γ si des nucléotides manquent. Plusieurs protéines remplissant ce rôle ont été identifiées dans la mitochondrie. L'aprataxin (APTX) par exemple, une nucléotide hydrolase/ transférase, élimine les groupes 5'-AMP qui proviennent des réactions de ligation avortées, dues par exemple à une tentative de ligation d'une CSB contenant une extrémité 5' réfractaire à l'action de la ligase (Sykora et al., 2011). La tyrosyl-ADN phosphodiesterase (TDP1) quant à elle hydrolyse la liaison phosphodiester à l'extrémité 3' d'une CDB lorsqu'elle est liée au groupe tyrosyl d'une protéine. De tels complexes ADNprotéine peuvent se former quand la topoisomérase I reste bloquée sur l'ADN. TDP1 est la seule enzyme mitochondriale permettant de séparer les complexes ADN-protéine (Das et al., 2010). Les protéines impliquées dans le BER classique, APE1 et PNKP, sont aussi responsables de la modification des extrémités des CDB. La fin du processus de SSBR est similaire au mécanisme du LP-BER, POL γ synthétisant l'ADN pour combler le vide éventuel et les nucléases FEN1, DNA2 et EXOG clivant le « flap » généré. La ligase 3 catalyse la ligature de la cassure. EXOG a un rôle primordial pour éliminer les extrémités 5' bloquantes, en effet des cellules déplétées en EXOG accumulent des CSB qui peuvent déclencher des dysfonctionnements mitochondriaux et l'apoptose (Tann et al., 2011).

4.2.3 Réparation des cassures double-brin

Les mécanismes de maintenance des cassures double-brin mitochondriales sont beaucoup moins élucidés que les systèmes de BER et SSBR mitochondriaux. Pour comprendre comment la cellule prend en charge les CDB mitochondriales (CDBmt), des comparaisons sont faites avec ce qu'il se passe au niveau nucléaire. Dans un premier temps les mécanismes de réparation des CDB de l'ADN nucléaire vont donc être présentés. Celles-ci peuvent être réparées par différents processus : la recombinaison homologue (HR) ou la recombinaison des extrémités non homologues (NHEJ). Le choix de la voie de réparation dépend de plusieurs facteurs tels l'organisme, le cycle cellulaire, le type cellulaire... Chez les mammifères le mécanisme de NHEJ répare probablement la majorité des CDB (Kakarougkas et Jeggo, 2014). La réparation des CDB nucléaires, même infidèle, est nécessaire pour la survie cellulaire, car ces lésions sont délétères et empêchent la réplication de l'ADN.

La signalisation des cassures nucléaires est commune aux deux mécanismes. Elle consiste en la phosphorylation du variant d'histone H2AX autour de la cassure par des protéines de la voie PI-3K, notamment ATM (ataxia telangiectasia mutated) et ATR (ATM-Rad3-related). H2AX phosphorylé, appelé γ -H2AX, peut être visualisé par un anticorps spécifique et les foci observés représentent des CDB. Ces marqueurs de CDB aident ensuite au recrutement des protéines de réparation (Kuo et Yang, 2008).



FIGURE 18 – Réparation des CDB nucléaires par recombinaison homologue (HR) Lors de la HR la reconnaissance de la CDB est effectuée par le complexe MRN (Mre11-RAD50-Nbs1), qui s'associe ensuite avec CtIP, Exo1 et BLM, responsables de la résection 5'-3'. Le simple-brin d'ADN généré est stabilisé par la protéine RPA, puis RAD52 est recruté. Ensuite RAD51 remplace RPA sur le simple-brin, ce qui permet l'invasion de la région homologue sur la chromatide sœur. Différents mécanismes permettent enfin la réparation : le BIR (Break-induced repair), la réparation selon le modèle de Szostak ou le SDSA (Synthesis-dependent strand annealing). La réparation par SSA (Single-strand annealing) est relativement différente puisqu'elle ne nécessite pas RAD51 et la chromatide sœur, mais dépend de séquences homologues de part et d'autre de la CDB. Adapté de (Iyama et Wilson, 2013).

Lors de la HR une molécule homologue est utilisée comme matrice, et le mécanisme est efficace lorsque l'homologie est d'au moins 250pb (Inbar *et al.*, 2000). Ce processus permet ainsi de réparer fidèlement l'ADN, sans introduire de mutation. Dans le noyau cette molécule homologue est la chromatide sœur, la HR est donc restreinte aux phases S et G2 du cycle cellulaire, ou à la méiose. Le mécanisme peut être divisé en trois étapes : la phase pré-synaptique durant laquelle la lésion est détectée, partiellement dégradée et où les protéines de réparation sont assemblées; une phase synaptique pendant laquelle les composants de la recombinaison cherchent une séquence homologue qui servira de matrice pour la réparation et procèdent à l'échange des brins; et enfin une phase post-synaptique qui permet de synthétiser l'ADN pour restaurer le fragment perdu au site de cassure et de résoudre les intermédiaires d'échanges de brins d'ADN (**Figure 18**).

Phase pré-synaptique :

La première étape consiste en la détection de la cassure et la résection du brin d'ADN de part et d'autre de la cassure, dans le sens 5'-3', ce qui expose un ADN simple-brin avec une extrémité débordante 3'. Le complexe MRN est principalement impliqué dans cette étape. Il est formé de la nucléase Mre11, de RAD50 qui a une affinité pour les extrémités des CDB et de Nbs1 qui aide au recrutement de protéines comme CtIP (C-terminal interacting protein) et RPA (protéine de réplication A). Mre11 a une très faible activité nucléase 3'-5' et n'est donc pas responsable de la formation des simple-brins débordants. Ce complexe permet d'attacher les extrémités de la cassure et d'empêcher leur éloignement (Lamarche *et al.*, 2010). L'association de MRN avec CtIP permet d'initier la résection, qui sera notamment continuée chez les mammifères par la nucléase Exo1 et l'hélicase BLM (Jasin et Rothstein, 2013). Les simple-brins débordants générés sont stabilisés par la protéine RPA, un hétérodimère formé de trois sous unités. La protéine RAD52 peut aussi se lier aux RPA. RPA est ensuite déplacée pour permettre l'assemblage de la recombinase RAD51 sur le simple-brin, formant un filament nucléoprotéique. Ce remplacement est catalysé chez l'Homme par BRCA2 et des paralogues de RAD51 comme RAD51B, RAD51C, RAD51D XRCC2 et XRCC3 (Prakash *et al.*, 2015).

Phase synaptique :

Pendant cette phase la recombinase RAD51 cherche une séquence homologue à celle de l'ADN simple-brin auquel elle est associée. Le mécanisme de cette recherche d'homologie est mal connu mais implique la protéine RAD54. Celle-ci se fixe sur RAD51 et stimule l'invasion de la chromatide sœur à la recherche de la séquence homologue. L'invasion est réciproque puisque le filament nucléoprotéique envahit la chromatide sœur et que l'un des deux brins de cette dernière envahit aussi la chromatide portant la CDB. Quand les séquences homologues sont appariées RAD54 glisse le long du filament en enroulant les deux brins, formant un hétéroduplex, et en détachant RAD51. À la fin de cette étape l'ADN est sous forme de D-loop, un double-brin hétéroduplex et un simple-brin déplacé (Wright et Heyer, 2014).

Phase post-synaptique :

La synthèse d'ADN en utilisant la séquence homologue comme matrice est réalisée grâce aux polymérases δ , ζ et η , à partir de l'extrémité 3' de la cassure (McVey *et al.*, 2016). Différents modèles expliquent la séparation des brins et la résolution de la D-loop. Certains permettent le transfert de l'information génétique de la molécule homologue à la molécule endommagée, et ce transfert non réciproque est appelé conversion génique. La résolution de la D-loop peut aussi être associée à un crossing-over. Dans le modèle Szostak l'ADN des deux brins endommagés est synthétisé en utilisant la molécule homologue comme matrice et les invasions réciproques entre les deux chromatides créent deux jonctions de Holiday. La résolution de ces jonctions par des coupures symétriques n'est pas associée à un crossing-over alors que leur résolution par des coupures asymétriques l'est (Szostak *et al.*, 1983). Le modèle SDSA (Synthesis-dependent



FIGURE 19 – Réparation des CDB nucléaires par jonction des extrémités non homologues (NHEJ)

La réparation des CDB nucléaires par NHEJ peut suivre deux voies : le NHEJ classique, qui entraine une perte limitée de l'information génétique et le NHEJ alternatif, qui cause une instabilité génomique. Pour le C-NHEJ l'hétérodimère Ku70/ Ku80 reconnait la cassure et recrute DNA-PKcs qui va former la synapse. Différentes nucléases et hélicases vont modifier les extrémités afin que des polymérases synthétisent les nucléotides manquants et que le complexe XRCC4/ Ligase 4/ XLF réalise la ligation. Dans le A-NHEJ la détection de la cassure se fait par PARP-1 qui recrute le complexe MRN. Puis CtIP réalise la résection des extrémités ce qui permet aux deux brins de se réhybrider au niveau de microhomologies de séquences. POL θ synthétise les nucléotides manquants et différents facteurs clivent les extrémités simple-brin sortantes, afin que la ligation soit faite probablement par XRCC1 et la ligase 3, et potentiellement la ligase 1. Adapté de (Deriano et Roth, 2013). strand annealing) est un peu différent puisque l'ADN d'un seul brin endommagé est synthétisé à partir de la molécule homologue. Ce brin néosynthétisé se dissocie ensuite de la molécule donneuse et s'hybride de nouveau à l'autre brin de la molécule endommagée. Il sert alors luimême de matrice pour la synthèse d'ADN, et deux ligatures sont nécessaires pour terminer la réparation. Dans le modèle BIR (Break-Induced Repair), seule l'extrémité 3' envahit la chromatide sœur et sert d'amorce à la synthèse. Cette structure forme une fourche de réplication qui permet la synthèse du deuxième brin sur tout le chromosome. Ce mécanisme serait surtout impliqué pour réparer les blocages lors de la réparation (Costantino et al., 2014). La réparation par SSA (single-strand annealing) est relativement différente des autres modèles car il n'y a pas d'invasion de brin. Elle nécessite que la CDB ait lieu entre deux séquences répétées orientées dans la même direction, mais celles-ci peuvent être séparées de plusieurs kilobases, même si dans ce cas la réparation sera plus lente. Dans ce modèle la phase pré-synaptique est similaire aux autres mécanismes de HR, même si RAD51 n'intervient pas dans le processus puisqu'il n'y a pas d'invasion de brin, voire l'inhibe en favorisant les autres mécanismes de HR. Ensuite les protéines RAD52 et ERCC1 notamment permettent de dégrader l'ADN dans le sens 5'-3'entre les deux séquences homologues complémentaires, et elles peuvent alors s'hybrider. Les extrémités 3' non complémentaires sont excisées et la ligature des extrémités achève la réparation. Ce mécanisme, contrairement aux autres modèles de HR, n'est pas conservatif puisqu'il induit des délétions (Bhargava et al., 2016).

Le deuxième type de réparation des CDB nucléaires est le NHEJ. Dans ce processus il n'y a pas de synthèse à partir d'une matrice intacte, les extrémités de la cassure sont seulement liées et il peut donc y avoir des erreurs de réparation avec des insertions ou délétions de séquences. La réparation peut avoir lieu à n'importe quel moment du cycle cellulaire. Il existe deux voies pour le NHEJ : le NHEJ classique (C-NHEJ) et le NHEJ alternatif (A-NHEJ), qui sont toutes deux divisées en trois phase : pré-synaptique, synaptique et ligature des extrémités (**Figure 19**).

Pour le C-NHEJ une synapse est créée entre les extrémités de la CDB grâce à l'hétérodimère Ku70/ Ku80 qui a une forte affinité pour les extrémités libres d'ADN et se place de part et d'autre de la cassure. D'après sa structure cristallographique il s'assemble en anneau capable de se lier aux extrémités libres de l'ADN (Walker et al., 2001). Il permet ensuite le recrutement de DNA-PKcs (DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit), une kinase de la famille PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase-related kinase) (Yaneva et al., 1997). Les DNA-PKcs peuvent ainsi se lier aux extrémités de l'ADN et s'autophosphoryler. Ce sont les complexes Ku/ DNA-PKcs, de chaque côté de la CDB, qui permettent de maintenir les extrémités proches. Les DNA-PKcs, de par leur activité kinase, recrutent aussi les autres acteurs du C-NHEJ. Une fois la synapse établie les dommages subis par les bases et les pentoses à proximité de la CDB doivent être éliminés. Pour ce faire des nucléases comme Artémis, WRN (Werner syndrom protein) et FEN1 ainsi que des hélicases qui facilitent leur accessibilité à l'ADN, comme BLM, sont recrutées pour dégrader les nucléotides endommagés (Deriano et Roth, 2013). Des ADN polymérases synthétisent ensuite les séquences d'ADN manquantes. Chez les mammifères $POL\mu$, $POL\lambda$ et la terminal-désoxyribonucléotide transférase sont impliquées dans cette synthèse (Mahajan et al., 2002; Fan et Wu, 2004). Ces polymérases interagissent avec le complexe XRCC4/ Ligase IV qui assure la ligation de l'ADN néosynthétisé avec le reste de la molécule, avec l'aide de la protéine XLF qui stimule la ligation des extrémités incompatibles (Gu et al., 2007). L'élimination des nucléotides endommagés et la synthèse d'ADN en l'absence de matrice peuvent entrainer une réparation infidèle.

L'autre type de NHEJ, le A-NHEJ, pourrait regrouper différentes voies mais correspond majoritairement à la réparation par recombinaison des extrémités présentant des microhomologies (MMEJ). Ce type de réparation interviendrait uniquement lorsque la C-NHEJ est insuffisante,

par exemple lors de dommages trop nombreux ou lorsqu'un acteur essentiel de cette voie est muté. La cinétique de réparation par A-NHEJ est plus lente que par C-NHEJ (entre 2h et 20h) comme cela a été montré par étude de cellules déficientes en protéines de la voie classique (Wang *et al.*, 2003). Ce processus est indépendant de l'hétérodimère Ku et des protéines DNA PKcs, et utilise au contraire des protéines de la HR dans la phase pré-synaptique : PARP-1 détecte la cassure et recrute le complexe MRN ainsi que CtIP. Celui-ci permet la résection des brins et la formation de simple-brins à extrémités 3' débordantes. Ces brins vont de nouveau s'hybrider grâce à des microhomologies de séquences de quelques nucléotides, à proximité de la CDB (entre 0 et 10 nucléotides de la cassure). Ensuite POL θ synthétise la séquence manquante d'ADN et les extrémités 3' non hybridées peuvent être clivées par des nucléases, possiblement XPF et ERCC1. Enfin la ligation est réalisée notamment par la ligase 3 et XRCC1 (Sfeir et Symington, 2015). Ce mécanisme de réparation est moins fidèle que le C-NHEJ puisqu'il entraine nécessairement une délétion ou un réarrangement chromosomique.

La régulation de la réparation des CDB nucléaires et notamment le choix de la voie de réparation ne sont pas totalement élucidés. La phase du cycle cellulaire est importante puisque la recombinaison homologue n'a lieu que lorsque la chromatide sœur est présente. Différentes protéines dirigent le système vers une voie en particulier, par exemple l'hétéroduplex Ku vers le C-NHEJ ou RAD52 et ERCC1 vers le SSA, mais bien d'autres facteurs sont impliqués (Bennardo *et al.*, 2008; Kakarougkas et Jeggo, 2014).

L'étude des CDB nucléaires permet de faire des hypothèses sur la réparation des CDB mitochondriales, notamment en analysant la localisation des protéines impliquées dans les mécanismes déjà décrits. Il a par exemple été montré qu'une forme alternative de Ku80, ne possédant pas la même extrémité C-terminale que Ku80 nucléaire mais ayant aussi la capacité de se lier aux extrémités d'ADN, est présente dans les mitochondries (Coffey et Campbell, 2000). Un crible RNAi visant à évaluer le rôle des acteurs de la maintenance de l'ADN nucléaire sur la maintenance de l'ADNmt, en induisant des dommages mitochondriaux de différentes sortes (stress oxydatif, CDB ou alkylations), a permis d'identifier de nouvelles candidates potentiellement impliquées dans la réparation de l'ADNmt. Ainsi XRCC4 et POL θ ont été identifiées à la mitochondrie et leur extinction entraine une élévation de la mort cellulaire en cas de dommages oxydatifs ou de CDB (Wisnovsky *et al.*, 2016). RAD51, essentielle pour la recombinaison homologue, interagit aussi physiquement avec l'ADNmt et a un rôle dans sa maintenance et l'augmentation du nombre de copies suite à un stress oxydatif (Sage *et al.*, 2010).

Bien que de nombreuses protéines impliquées dans la maintenance des CDB nucléaires aient été détectées dans les mitochondries, les mécanismes de réparation des CDBmt restent controversés. Chez la levure Saccharomyces cerevisiae les CDBmt sont réparées par recombinaison homologue grâce aux protéines du groupe d'épistasie RAD52 (Stein et al., 2015). Différentes protéines de ce groupe sont localisées dans les mitochondries : Rad51p et Rad59p se trouvent dans la matrice mitochondriale et Rad51p se lie à l'ADNmt. La génération de CDBmt grâce à une enzyme de restriction à adressage mitochondrial mène à une accumulation de molécules d'ADNmt délétées entre des séquences homologues, suggérant une réparation des cassures. Dans des souches mutantes n'exprimant pas l'une de ces trois protéines le nombre de délétions observées est réduit, ce qui indique le rôle des protéines du groupe d'épistasie RAD52 dans la réparation des CDBmt (Stein et al., 2015). Il a également été montré que les CDBmt sont réparées dans des cellules de Drosophiles (Morel et al., 2008). Cependant la réparation des CDBmt chez les mammifères ainsi que les mécanismes mis en œuvre restent débattus. Certaines études suggèrent que des processus de recombinaison réparent les cassures. Une étude sur un modèle murin hétéroplasmique a montré que des CDBmt, induites par l'enzyme de restriction ScaI à adressage mitochondrial, sont réparées par C-NHEJ. La recombinaison intramoléculaire était



FIGURE 20 – Autophagie

Le complexe ULK1/2 est, en conditions normales, lié à MTORC1 qui l'inhibe par phosphorylation. En réponse à une carence en nutriments par exemple, MTORC1 se dissocie et le complexe ULK1/2 initie la nucléation du phagophore à l'aide du complexe PtdIns3K et d'autres facteurs. L'élongation est ensuite réalisée par le complexe ATG12-ATG5-ATG16L1, le complexe PtdIns3K, LC3-II et ATG9. L'autophagosome se referme alors sur son cargo et LC3-II est clivé de la membrane externe. L'autophagosome fusionne alors avec un lysosome ou un endosome puis un lysosome, ce qui mène à sa destruction par des hydrolases et au relâchement dans le milieu des produits de cette dégradation par l'intermédiaire des perméases. Adapté de (Parzych et Klionsky, 2014).

plus fréquente que la recombinaison intermoléculaire et impliquait majoritairement une région proche de la D-loop, laissant supposer l'existence de hotspots de recombinaison sur l'ADNmt (Bacman *et al.*, 2009). Les molécules d'ADNmt sont empaquetées dans les nucléoïdes et n'interagissent donc pas en conditions normales, ce qui limite les possibilités de recombinaison intermoléculaire (Gilkerson *et al.*, 2008). Au contraire, d'autres travaux *in vitro* et *ex vivo* n'ont pas réussi à détecter d'évènements de recombinaison par C-NHEJ et démontrent que le MMEJ a un rôle central dans la maintenance de l'intégrité de l'ADNmt après CDB (Tadi *et al.*, 2015). Ce résultat est cohérent avec une étude indiquant qu'environ 85% des délétions d'ADNmt détectées dans des cellules humaines sont flanquées par de courtes répétitions de séquences (Krishnan *et al.*, 2008). Cependant l'ADNmt est très dense en gènes et les délétions entrainées par le MMEJ pourraient donc facilement impacter la phosphorylation oxydative, ce qui en fait un mécanisme peu efficace pour préserver la fonction de la mitochondrie après CDBmt.

Les capacités réparatrices des mitochondries vis-à-vis des CDB sont cependant controversées car plusieurs études ont montré que l'induction d'un nombre important de CDBmt entraine une déplétion d'ADNmt (Kukat *et al.*, 2008). De plus la réparation des CDBmt n'est pas totalement nécessaire : En effet, un grand nombre de copies d'ADNmt est présent dans chaque cellule et il est donc possible d'éliminer une molécule d'ADNmt endommagée sans menacer la survie cellulaire, ce qui est au contraire impossible au niveau des chromosomes nucléaires.

4.3 Dégradation de l'ADN mitochondrial

Comme évoqué auparavant, un autre aspect de la maintenance de l'ADNmt est la dégradation des molécules endommagées. Ce processus est rendu possible par la présence de nombreuses copies d'ADNmt à l'intérieur d'une cellule et même d'une mitochondrie. Mais il est également nécessaire : en effet l'ADNmt est susceptible de subir des modifications encombrantes induisant des distorsions de la structure double-brin. Or aucune activité NER, responsable de la réparation de ce type de dommage, n'a été détectée au niveau mitochondrial. Ces nucléotides modifiés sont donc irréparables et peuvent générer des mutations lors de la réplication. Cependant il a été montré chez *C. elegans* que des dommages de ce type, générés par exposition à des ultraviolets C, étaient éliminés sur le long terme. L'autophagie et la mitophagie, couplées à la dynamique mitochondriale, sont responsables de cette élimination, par dégradation de l'organite (Bess *et al.*, 2013). L'autophagie est un processus cellulaire qui désigne une dégradation d'une partie du cytoplasme de la cellule par ses propres lysosomes, qui va la recycler. Elle est stimulée lorsque les nutriments sont rares, que les cellules sont soumises à un stress ou que des bactéries intracellulaires ou des organites endommagés doivent être dégradés. La mitophagie est l'autophagie spécifique des mitochondries.

Globalement un défaut local de la chaine respiratoire qui peut être dû à une mutation de l'ADNmt, associé à une diminution locale du potentiel membranaire mitochondrial, peut déclencher la fission afin d'isoler cette partie non fonctionnelle de la mitochondrie. Celle-ci peut ensuite être dégradée par les lysosomes grâce à l'activation des voies d'autophagie (Twig *et al.*, 2008). Comme l'ADNmt muté se trouve à proximité de la protéine défectueuse qu'il code, il est donc ségrégé dans cette mitochondrie fissionnée et éliminé. Cependant ce processus n'est pas totalement efficace puisque des mutations hétéroplasmiques délétères peuvent quand même s'accumuler, suggérant qu'une complémentation intramitochondriale a lieu quand les mitochondries sont fusionnées, ce qui empêche d'avoir un lien génotype-phénotype évident (Kowald et Kirkwood, 2011).

La macroautophagie est le mécanisme principal de l'autophagie et permet d'éliminer des parties entières de cytoplasme, comme des organites (Figure 20). Elle commence par la for-



FIGURE 21 – Mitophagie

En conditions normales la protéine PINK1 entre dans les mitochondries où elle est dégradée par PARL. En cas de chute du potentiel membranaire mitochondrial, par exemple à cause de dommages de l'ADN, PINK1 est stabilisée à la membrane externe mitochondriale où elle phosphoryle Parkin qui, à son tour, ubiquityle des protéines de la membrane externe. Celles-ci sont alors reconnues par l'optineurine, qui s'y fixe. Grâce à son domaine LIR l'optineurine se lie alors au LC3-II, entrainant la formation de l'autophagosome et l'élimination de la mitochondrie défectueuse. Adapté de (Wei *et al.*, 2015). mation, ou nucléation, d'une vacuole appelée phagophore, qui s'allonge et se referme en séquestrant des constituants du cytoplasme. L'autophagosome ainsi formé, délimité par une double membrane phospholipidique, fusionne ensuite avec un endosome et/ ou un lysosome, ce qui va engendrer la dégradation de son contenu (Parzych et Klionsky, 2014). Le mécanisme de macroautophagie implique un grand nombre de protéines, notamment de la famille ATG (autophagy-related). Le complexe ULK1/2 formé des protéines ULK1 ou ULK2, ATG13, RB1CC1, et ATG101 est en conditions normales associé à MTORC1 (mechanistic target of rapamycin complex 1) qui inhibe ULK1/2 et ATG13 par phosphorylations. En réponse à la rapamycine ou à une carence en nutriments MTORC1 se dissocie du complexe, qui est alors activé par déphosphorylations (Hosokawa et al., 2009). La nucléation du phagophore commence grâce au complexe PtdIns3K (phosphatidylinositol 3-kinase), à ATG14 et à BECN1, et l'élongation est ensuite aidée par le complexe ATG12-ATG5-ATG16L1, le complexe PtdIns3K, LC3-II et ATG9. LC3-II est obtenu par hydrolyse de LC3 par ATG4 en LC3-I suivie de la conjugaison de cette forme avec le lipide phosphatidylethanolamine (Tanida et al., 2008). Puis l'autophagosome se referme sur son cargo et LC3-II est clivé de la membrane externe. Finalement il fusionne avec la membrane lysosomale, formant un autolysosome, ou avec l'endosome, générant un amphisome qui fusionnera ensuite avec le lysosome. Le déplacement de l'autophagosome se fait grâce aux microtubules (Monastyrska et al., 2009).

La macroautophagie non sélective est activée notamment en cas de carence en nutriments, afin de recycler une partie du cytoplasme. Dans le cas de la réponse à des dommages mitochondriaux un processus sélectif existe, la mitophagie (Figure 21). Il va cibler les organites qui signalent leur dysfonctionnement par un mécanisme impliquant les protéines PINK1 (PTENinduced putative kinase 1) et Parkin. PINK1 est un indicateur du stress mitochondrial. En effet dans des mitochondries fonctionnelles cette protéine est importée du cytoplasme à la mitochondrie où elle est dégradée par protéolyse au niveau de la membrane interne, par exemple par les protéases MPP (mitochondrial processing peptidase) et PARL (presenilin-associated rhomboidlike protease). Mais lors d'une diminution du potentiel membranaire mitochondrial, PINK1 est stabilisé à la membrane externe où elle recrute et active par phosphorylation Parkin, une ubiquitine ligase E3 (Greene et al., 2012). Parkin ubiquityle alors plusieurs protéines de la membrane externe mitochondriale dont BCL-2, VDAC et les mitofusines 1 et 2 (Mfn1 et 2) (Green et al., 2011). Enfin l'optineurine, un récepteur de l'autophagie possédant un domaine de liaison à l'ubiquitine et un motif LIR (LC3-interacting region) s'associe aux protéines ubiquitylées de la membrane externe, ce qui induit la séquestration des mitochondries endommagées dans les autophagosomes, par interaction avec LC3 (Wong et Holzbaur, 2014).

Deux autres mécanismes de mitophagie existent. L'un est spécifique à l'élimination des mitochondries lors de la maturation des réticulocytes pour donner des érythrocytes. Il implique les protéines mitochondriales BNIP3 (BCL2 and adenovirus E1B 19-kDa-interacting protein 3) et BNIP3L (BNIP3-like, aussi appelée NIX), qui possèdent un motif LIR orienté vers le cytosol leur permettant d'interagir avec LC3 (Rikka *et al.*, 2011; Schweers *et al.*, 2007). Le deuxième est activé en cas d'hypoxie ou de la présence d'un découplant mitochondrial. Dans ce processus le récepteur de la membrane externe mitochondriale FUNDC1 (FUN14 domain-containing protein 1) est différentiellement phosphorylé en normoxie ou hypoxie. En condition d'hypoxie la liaison LC3-FUNDC1 par le motif LIR est activée, permettant à l'autophagosome de se refermer autour de la mitochondrie défectueuse et de l'amener au lysosome pour dégradation (Wei *et al.*, 2015).

La dégradation de l'ADNmt peut aussi passer par une élimination de la cellule en entier, par apoptose. Il a par exemple été montré que la perte d'EXOG entraine des dommages de l'ADNmt dû à l'accumulation d'intermédiaires toxiques du BER, ce qui mène à un dysfonctionnement

mitochondrial suivi de la dépolarisation et de l'apoptose induite par la voie mitochondriale (Tann *et al.*, 2011; Houten *et al.*, 2016).

La dégradation sélective de l'ADNmt endommagé, sans passer par l'élimination de l'organite ou de la cellule, est aussi envisageable. En effet certaines études ont montré que la baisse du potentiel mitochondrial et la modification physiologique des mitochondries avec la fragmentation du réseau, étaient secondaires à la dégradation de l'ADNmt et la diminution de l'expression des protéines codées par l'ADNmt (Shokolenko *et al.*, 2013). Les mécanismes de cette dégradation ne sont cependant pas élucidés, il a été proposé que différents processus avec différentes cinétiques sont mis en place en fonction du type cellulaire, mais les acteurs impliqués n'ont pas été identifiés (Shokolenko *et al.*, 2014). Ce mécanisme sélectif devrait impliquer des nucléases.

4.4 Système de génération expérimentale de cassures doublebrin

4.4.1 Non ciblées

L'analyse de la maintenance de l'ADN suite à des CDB implique la mise au point d'un modèle expérimental permettant de générer ces cassures sur un système d'étude. Il est par exemple possible d'induire des cassures non ciblées de l'ADN, qui vont casser à la fois les chromosomes nucléaires et l'ADNmt.

Les irradiations par rayonnements ionisants, comme les rayons X, gamma ou ultraviolets, sur cellules ou organismes entiers, sont ainsi utilisées pour étudier les réponses globales aux CDB ou l'impact de facteurs de réparation. Ces rayonnements peuvent provoquer l'ionisation ou l'excitation des atomes et la formation de radicaux libres. Ceux-ci vont réagir avec les constituants des cellules et induire des lésions de l'ADN, par effet direct ou indirect. En effet les rayons ionisants peuvent réagir directement avec l'ADN mais aussi par exemple avec l'eau, qui constitue 80% de la cellule, provoquant la radiolyse de l'eau et la production de radicaux libres comme HO ou H₂O₂. Ces espèces très réactives sont particulièrement agressives pour la molécule d'ADN et entrainent les effets indirects. Les lésions qui en découlent sont par exemple des dommages des sucres ou des bases, des pontages intra et interbrins et des cassures de l'ADN. Une CDB consiste en la rupture des deux chaines d'ADN en même temps, en des endroits distants au plus de trois nucléotides. Elles peuvent résulter de l'action d'une seule particule réactive cassant les deux brins ou de la combinaison de deux CSB proches dues à deux particules différentes. Il a été estimé qu'une irradiation d'une cellule avec 1 Gray entraine 500 à 1000 CSB et 40 CDB de l'ADN nucléaire par exemple (Jalade, 2005).

Une autre méthode pour générer des CDB non ciblées consiste à utiliser des composés chimiques. Des agents génotoxiques comme des intercalants de l'ADN, des agents alkylants ou des antibiotiques cytotoxiques peuvent ainsi induire des cassures d'ADN. Par exemple la doxorubicine est un intercalant de l'ADN qui modifie donc sa structure localement, et elle stabilise aussi le complexe topoisomérase II/ ADN, générant des cassures et des blocages de la fourche de réplication (Yang *et al.*, 2014). La bléomycine, quant à elle, est un peptide non ribosomique produit par une bactérie, qui fonctionne comme un antibiotique et induit une rupture du brin d'ADN (Chen *et al.*, 2008; Ishak *et al.*, 2016). Ce composé est capable d'endommager l'ADN mitochondrial, mais les cassures nucléaires sont aussi importantes.

La génération de CDB non ciblées complique l'étude de la réponse aux cassures mitochondriales, puisque l'ADN chromosomique est aussi atteint. Il est donc difficile de savoir si l'effet observé provient des CDB mitochondriales ou nucléaires.



FIGURE 22 – Système Tet

Le système Tet est utilisé pour activer ou réprimer l'expression d'un gène grâce à l'ajout de doxycycline. A : Dans le système Tet-off tTA active la transcription du gène d'intérêt en l'absence de doxycycline, lors de l'ajout du ligand l'expression est abolie. B : Au contraire dans le système Tet-on rtTA a besoin de son ligand pour activer l'expression du gène. tTA : tetracycline-dependent transactivator, rtTA : reverse tetracycline-dependent transactivator, DOX : doxycycline, TetO : séquence opératrice de l'opéron tétracycline, TRE : Tet-responsive element, Pmin : promoteur minimum. Adapté de (Bockamp *et al.*, 2002).

4.4.2 Ciblant l'ADN mitochondrial

Depuis plus d'une dizaine d'années des enzymes de restriction sont utilisées pour générer des CDB ciblées à l'ADNmt. Dans leur forme la plus simple ces outils de modification du génome consistent en une enzyme de restriction recombinante liée à une séquence d'adressage mitochondrial (MTS) qui permet de l'importer dans la mitochondrie, où elle coupera l'ADNmt aux sites de restriction. Il est parfois nécessaire de modifier la séquence initiale de nucléotides de l'enzyme bactérienne pour que les codons correspondent mieux au code génétique utilisé par l'espèce dans laquelle on veut utiliser cet outil. On parle par exemple d'humanisation lorsque la séquence est adaptée pour pouvoir être transcrite et traduite par des cellules humaines.

Cet outil de modification du génome peut être utilisé au niveau cellulaire ou au niveau de l'organisme entier, il peut aussi être inductible ou exprimé spécifiquement dans un organe. Par exemple Srivastava et Moraes ont mis au point un modèle murin transgénique exprimant l'enzyme de restriction PstI spécifiquement dans le muscle. Le gène de PstI avait été construit avec la séquence d'adressage mitochondrial de l'extrémité N-ter du gène humain COX8A et codé dans un plasmide pSMA, il était donc sous l'emprise du promoteur d'actine des muscles squelettiques (Srivastava, 2005). Il est aussi possible de créer des systèmes où l'expression de l'enzyme de restriction est inductible, par exemple grâce au système Tet-off/ Tet-on (Figure 22). Le système Tet-Off utilise une protéine chimérique, la protéine transactivatrice de la tétracycline (tTA), créée en fusionnant la protéine TetR de E.coli avec le domaine activateur de la protéine VP16 du virus de l'herpès. tTA se lie sur l'ADN, sur la séquence opératrice TetO en amont du promoteur, ce qui active la transcription. L'ajout de tétracycline, ou de doxycycline qui est un analogue plus stable, empêche la transcription en se liant à la protéine tTA, changeant sa conformation et supprimant sa liaison à TetO. Le système Tet-on fonctionne de manière inverse : c'est la protéine rtTA (reverse tetracycline-controlled transactivator), obtenue par mutation dans la protéine TetR, qui est utilisée. Celle-ci ne peut se lier à la séquence TetO qu'en présence de tétracycline ou de doxycycline, ce qui active la transcription (Gossen et Bujard, 1992). Si l'expression de l'enzyme de restriction est sous le contrôle d'un opéron tétracycline il est donc possible de contrôler temporellement l'induction de CDB par incubation avec de la doxycycline pour les modèles cellulaires ou par injection ou ajout de l'antibiotique dans la nourriture pour les animaux.

L'utilisation d'enzymes de restriction à adressage mitochondrial vise plusieurs objectifs. Tout d'abord ces cassures peuvent permettre d'établir des modèles de pathologies mitochondriales, comme des myopathies, des maladies neurodégénératives ou simplement le vieillissement, en créant un dysfonctionnement de la phosphorylation oxydative. Ensuite les enzymes de restriction peuvent cibler une molécule d'ADNmt en particulier, ce qui ouvre des perspectives thérapeutiques pour soigner les pathologies dues à des mutations hétéroplasmiques de l'ADNmt. En effet, si l'enzyme coupe préférentiellement les molécules mutées, un changement de ratio entre ADN muté et ADN sauvage peut être induit, permettant de restaurer la fonction altérée par la mutation. La première expérience pour confirmer l'efficacité de cette approche utilisait des cellules cybrides contenant à la fois de l'ADNmt de souris et de rat. L'ADNmt de souris contient deux sites de restriction PstI alors que l'ADNmt de rat n'en contient pas. Après expression de l'enzyme de restriction PstI à adressage mitochondrial le ratio ADNmt souris/ ADNmt rat avait significativement changé en faveur de l'ADNmt de rat, résistant à PstI (Srivastava et Moraes, 2001). Une expérience similaire a été réalisée sur un modèle cellulaire contenant de l'ADNmt sauvage et muté m.8993T>C dans le gène de l'ATP6. Cette mutation, à des taux d'hétéroplasmie élevés, entraine une encéphalomyopathie sévère. Elle crée un site de restriction pour l'enzyme SmaI, et après transfection des cellules avec cette enzyme il a été observé une baisse du ratio ADNmt muté/ ADNmt sauvage, ouvrant des perspectives de thérapies géniques
dans le futur (Tanaka *et al.*, 2002). Les cellules ρ 0 sont des cellules dont les mitochondries sont intactes mais ne possèdent pas d'ADNmt, originellement obtenues par exposition au bromure d'éthidium (Hashiguchi et Zhang-Akiyama, 2009). Alternativement les enzymes de restriction à adressage mitochondrial peuvent être utilisées pour générer ces cellules, ce qui a par exemple été fait avec l'endonucléase EcoRI dans des cellules de souris, de rat et humaines (Kukat *et al.*, 2008). Les cellules ρ 0 sont intéressantes pour étudier l'ADNmt de patients : Il est possible de créer des cellules cybrides issues de la fusion de cytoplastes énuclées de patients malades et de cellules ρ 0 immortalisées, ce qui peut permettre de déterminer si une mutation nucléaire ou mitochondriale est à l'origine de défauts de la chaine respiratoire (Tonin et Entelis, 2014).

L'utilisation d'enzymes de restriction à adressage mitochondrial présente cependant une limitation majeure : la majorité des mutations pathologiques hétéroplasmiques de l'ADNmt ne créent pas un nouveau site de restriction qui peut être ciblé par une enzyme de restriction naturelle. D'autres systèmes, utilisant des endonucléases avec des domaines de reconnaissance de l'ADN modulables, ont donc été mis au point, notamment les nucléases à doigts de zinc (ZFNs) et les nucléases effectrices de type activateur de transcription (TALENs) (Bacman *et al.*, 2014).

Les ZFNs sont créées artificiellement, grâce à la fusion d'un domaine de liaison à l'ADN séquence spécifique de type « doigt de zinc » et du domaine catalytique d'une nucléase. Chaque doigt de zinc reconnait environ trois paires de bases, grâce à sa partie C-terminale, et trois doigts de zinc sont souvent associés pour une ZFN, permettant une bonne spécificité de séquence. Le domaine de clivage non spécifique utilisé est souvent le domaine catalytique de l'endonucléase FokI. Pour cliver l'ADN ce domaine doit se dimériser et il faut donc utiliser une paire de ZFNs pour cibler un site de coupure spécifique, les ZFNs étant spécifiques de séquences situées à proximité sur chaque brin de l'ADN (Kim *et al.*, 1996). Il faut ensuite ajouter à ces nucléases une séquence d'export nucléaire ainsi qu'une séquence d'adressage mitochondrial pour qu'elles puissent cibler l'ADNmt. L'un des inconvénients des ZFNs est leur sensibilité à l'environnement génomique réel, qui peut influer sur leur spécificité, nécessitant une importante mise au point et la validation de chaque paire de ZFNs avant étude (Ramirez *et al.*, 2008). Des ZFNs à adressage mitochondrial ont été utilisées dans un modèle cellulaire cybride de la délétion commune afin de diminuer le taux de molécules d'ADNmt mutées (Gammage *et al.*, 2014).

Les TALENs fonctionnent sur le même principe que les ZFNs, seul le domaine de liaison à l'ADN est différent. Celui-ci est constitué d'effecteurs TAL (TALEs), des protéines sécrétées par la bactérie *Xanthomonas*. Chaque TALE comprend 33 ou 34 acides aminés identiques à l'exception des acides aminés 12 et 13 qui sont très variables et permettent la reconnaissance d'un nucléotide spécifique. Un assemblage de TALEs permet donc la reconnaissance d'une séquence particulière. Le domaine de clivage de l'ADN est souvent le domaine catalytique de FokI, comme pour les ZFNs, et les TALENs sont donc aussi utilisés par paires, la dimérisation étant nécessaire pour que la nucléase induise une CDB (Boch, 2011). La synthèse artificielle du gène codant pour un TALEN nécessite souvent des étapes d'optimisation car les séquences répétées du domaine de liaison à l'ADN risquent de s'hybrider entre elles lors des étapes de synthèse des oligonucléotides (Zhang *et al.*, 2011). L'ajout d'une MTS sur la séquence du gène est nécessaire pour l'import du TALEN dans la mitochondrie.

L'utilisation des ZFNs et des TALENs pour cibler l'ADNmt est cependant parfois problématique. En effet les mutations hétéroplasmiques diffèrent souvent de l'ADNmt sauvage par une seule base et il peut être difficile de concevoir des nucléases qui discriminent les deux molécules. De plus l'import mitochondrial n'est pas toujours efficace (Bacman *et al.*, 2014).



FIGURE 23 – Objectifs de la thèse

Les processus cellulaires enclenchés suite à des CDBmt sont encore mal élucidés. Trois possibilités sont envisageables : la réparation des cassures, la dégradation des molécules endommagées et la réplication intensifiée des molécules intactes. Cette thèse vise à découvrir lesquels de ces processus sont mis en œuvre, et à déterminer les mécanismes et les protéines impliqués.

Objectifs du projet de recherche

L'ADNmt peut être la cible de cassures double-brin suite à la production de ROS, d'irradiations ionisantes ou encore d'erreurs de réparation ou de réplication. Les CDB sont délétères pour la cellule car elles empêchent notamment la réplication des molécules d'ADN, et, au niveau nucléaire, des mécanismes de réparation existent pour faire face à ces dommages. Cette thèse se focalisera sur l'étude des impacts de ce type de lésion en particulier sur l'ADNmt.

Chez les mammifères la gestion des cassures double-brin au niveau mitochondrial n'est pas bien comprise. Certaines études ont détecté une réparation des CDBmt, par C-NHEJ (Bacman *et al.*, 2009) ou MMEJ (Tadi *et al.*, 2015). D'autres indiquent plutôt une dégradation des molécules lésées, par des mécanismes de mitophagie (Busch *et al.*, 2014; Diot *et al.*, 2016) ou d'apoptose (Tann *et al.*, 2011), ou directement avec l'implication de nucléases (Shokolenko *et al.*, 2013), ce qui pourrait être associé à une amplification de la réplication des molécules intactes. Ces résultats contradictoires montrent que des analyses complémentaires sont requises. De plus les protéines mises en jeu dans ces processus n'ont pas été identifiées. Comprendre plus précisément comment la cellule gère la maintenance de l'ADNmt suite à des CDB pourrait éventuellement permettre de mieux appréhender certaines pathologies mitochondriales pour lesquelles les patients présentent des délétions ou des déplétions d'ADNmt non expliquées par des mécanismes connus.

L'objectif de cette thèse est donc d'étudier les mécanismes de maintenance de l'ADNmt suite à des cassures double-brin chez l'Homme, et la problématique peut être résumée par deux questions (**Figure 23**) :

- Quels processus permettent la gestion des CDBmt?

- Quelles protéines sont impliquées dans ces processus, et par quels mécanismes ?

La première étape de ce projet a consisté en la mise au point d'un système permettant la génération de CDBmt, pour pouvoir ensuite en étudier les conséquences au niveau cellulaire. Pour cela une lignée cellulaire humaine a été transfectée de manière stable avec un gène codant pour une enzyme de restriction (PstI) à adressage mitochondrial dont l'expression est inductible.

Dans une deuxième étape, l'état de l'ADNmt a été observé après induction de CDBmt et pendant une phase de récupération. Cette partie vise à répondre à la première question de la problématique, à savoir quelles stratégies sont mises en place par la cellule suite à des CDBmt.

Enfin nous avons essayé de déterminer quels sont les acteurs de la réponse à des CDBmt. Pour cela différentes stratégies ont été mises en place : une approche ciblée, par protéines candidates, et une approche plus globale, par protéomique et crible RNAi.

Parallèlement à ce projet j'ai aussi participé à une étude sur les polymérases de poly(ADPribose) (PARP) qui modifient d'autres protéines en leur ajoutant des polymères d'ADP ribose, et notamment sur leur rôle dans la réponse aux cassures de l'ADN dans des cellules embryonnaires de drosophiles. La génération des cassures simple et double-brin était alors réalisée par traitement des cellules avec un agent radiomimétique, la bléomycine, qui cible à la fois l'ADN nucléaire et l'ADN mitochondrial. Cette étude a fait l'objet d'une publication et est présentée dans la partie annexe.

Deuxième partie

Matériel et Méthodes

Culture cellulaire

1.1 Entretien des cellules

Plusieurs lignées cellulaires humaines ont été utilisées dans le cadre de cette thèse : Flp-In TREx 293 (Invitrogen) qui correspond à des cellules HEK293 (cellules embryonnaires de rein) modifiées pour exprimer le répresseur Tet et qui contiennent un site FRT (Flp recombination target) dans leur génome, HAP1 (cellules de leucémie myéloïde chronique dérivées de la lignée KBM-7) WT, KO NUDT6 ou KO NUDT19 (Horizon Discovery), HeLa (cellules dérivées d'un cancer du col de l'utérus) et U2OS (cellules épithéliales d'ostéosarcome).

Les cellules HEK293 sont cultivées en milieu DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) haut glucose supplémenté en GlutaMAX et pyruvate (Gibco by Lifetechnologies), avec 10% de SVF (certifié sans tetracycline, Biowest) et 100U/mL de pénicilline et streptomycine (HyClone, Thermo Scientific). Les cellules HAP1 sont quant à elles cultivées en milieu IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Media, Sigma), avec du GlutaMAX, 10% de SVF et 100U/ mL de pénicilline et streptomycine. Enfin les cellules HeLa et U2OS sont cultivées en milieu DMEM haut glucose (Gibco by Lifetechnologies), avec 10% de SVF et 0.1mg/ mL de gentamicine.

La congélation des cellules est faite dans du SVF supplémenté avec 10% de DMSO (3.10⁶ cellules dans 1mL par ampoule), à -20°C pendant quelques heures puis -80°C et éventuellement dans l'azote liquide. La décongélation est réalisée rapidement, les cellules décongelées sont ajoutées à 9mL de milieu puis centrifugées. Le culot est repris dans 1mL de milieu et les cellules sont mises en culture avec 5mL de milieu. Le milieu est changé le lendemain pour éliminer les cellules mortes et 10mL de milieu neuf est utilisé par boite ronde de 10cm de diamètre.

La contamination éventuelle par des mycoplasmes des cellules HEK293 et HAP1 WT et KO NUDT19 a été vérifiée par PCR grâce au kit LookOut Mycoplasma PCR Detection Kit suivant les indications du fabricant (Sigma-Aldrich).

1.2 Etablissement du système de cassures inductibles

Les cellules Flp-In TREx 293 non transfectées sont notées HEK293 WT car elles sont utilisées comme contrôle dans les expériences. Elles sont cultivées avec 100 μ g/ ml de zeocine (Invitrogen) et 15 μ g /ml de blasticidine (Invivogen) comme antibiotiques de sélection. Le vecteur pcDNA3 contenant le gène PstI flanqué de la séquence d'adressage mitochondrial du gène COX8 nous a été donné par le Dr. Carlos Moraes. La construction a été re-clonée dans le vecteur pcDNA5/FRT/TO (Invitrogen) et la séquence du gène PstI a été confirmée par séquençage.

Gène cible	Référence	Fournisseur
	HSS141823	ThermoFisher Stealth siRNAs
DFFB	HSS141824	ThermoFisher Stealth siRNAs
	HSS141825	ThermoFisher Stealth siRNAs
	HSS141856	ThermoFisher Stealth siRNAs
DNA2	HSS141857	ThermoFisher Stealth siRNAs
	HSS141858	ThermoFisher Stealth siRNAs
ENDOG	SI03083878	Qiagen FlexiTube siRNA
	s707	Ambion
	HSS124153	ThermoFisher Stealth siRNAs
EXD2	HSS124155	ThermoFisher Stealth siRNAs
	HSS182946	ThermoFisher Stealth siRNAs
	HSS115057	ThermoFisher Stealth siRNAs
EXOG	SI03075534	Qiagen FlexiTube siRNA
	s19298	Ambion
	HSS103627	ThermoFisher Stealth siRNAs
FENI	HSS103629	ThermoFisher Stealth siRNAs
	HSS176903	ThermoFisher Stealth siRNAs
	SI04336976	Qiagen FlexiTube siRNA
MGME1	HSS132389	ThermoFisher Stealth siRNAs
	HSS132390	ThermoFisher Stealth siRNAs
	HSS120322	ThermoFisher Stealth siRNAs
SNDI	HSS120324	ThermoFisher Stealth siRNAs
	HSS178293	ThermoFisher Stealth siRNAs
TFAM	L-019734-00-0005	Dharmacon SMARTpool ON-TARGETplus

Tableau 1	- Liste des	siRNA	utilisés
-----------	-------------	-------	----------

Pour établir le système inductible de CDBmt dans les cellules HEK293 le vecteur pcDNA5/ FRT/TO comportant le gène PstI et le vecteur pOG44 (Invitrogen) qui exprime la recombinase Flp, ont été co-transfectés avec un rapport massique 1 :10 (environ 1µg de pcDNA5-PstI et 10µg de pOGG44) dans les cellules Flp-In TREx 293 à l'aide de Lipofectamine 2000 (Invitrogen) suivant les indications du fabricant. 5h après transfection le milieu est changé, sans ajouter les antibiotiques de sélection. Ceux-ci, l'hygromycine B Gold (150 µg/ ml, Invivogen) et la blasticidine (15µg/ mL, Invivogen), sont ajoutés 48 à 96h post transfection pour sélectionner les cellules efficacement transfectées. Après environ 2 semaines seules les cellules transfectées ont survécu, et les antibiotiques de sélection sont ajoutés à chaque passage lors de l'entretien. Les cellules Flp-In TREx transfectées PstI sont notées HEK293 PstI. Pour sélectionner des populations clonales, différentes dilutions des cellules transfectées sont réalisées dans des plaques 96 puits, afin qu'un puits contienne une seule cellule à l'origine de la population monoclonale, qui sera ensuite amplifiée.

L'expression de l'enzyme de restriction PstI dans les cellules HEK293 PstI est induite par traitement avec $1\mu g/mL$ de doxycycline ajouté au milieu, et stoppée par enlèvement du milieu, rinçage au PBS et ajout de nouveau milieu sans doxycycline.

1.3 Transfection de siRNA

Les transfections de siRNA sont réalisées selon le mode direct (Forward transfection) sauf pour le crible RNAi où elles sont réalisées selon le mode inverse (Reverse transfection).

Les transfections directes sont réalisées 24h après ensemencement des cellules. Les séquences, concentrations et fournisseurs des différents siRNA sont indiqués dans le **Tableau 1**. Lors de la transfection de cellules cultivées dans des plaques 6 puits 150μ L de milieu OptiMEM + GlutaMAX (Gibco) avec $10-12\mu$ L de Lipofectamine RNAi Max (Invitrogen) sont ajoutés goutte à goutte à 150μ L de milieu OptiMEM + GlutaMAX mélangé aux siRNA souhaités pour chaque puits. Le mélange est incubé 20min à température ambiante puis ajouté goutte à goutte au puits dans lequel 3mL de milieu OptiMEM + GlutaMAX a préalablement été ajouté. Les cellules sont incubées 5h à 37°C puis le milieu OptiMEM + GlutaMAX est remplacé par du milieu de culture normal. Les cellules sont utilisées 3-4 jours après transfection. Pour augmenter l'efficacité de certains siRNA une double transfection des siRNA a parfois été réalisée. La première transfection est réalisée dans 1 ou 2 puits d'une plaque 6 puits, 2j après les cellules sont transférées dans une boite 10cm et la deuxième transfection a lieu le 3ème jour.

Lorsque la transfection de siRNA est suivie par induction de PstI la doxycycline est ajoutée au milieu 3j après transfection.

Pour le crible RNAi la transfection de siRNA est réalisée selon le mode inverse, en utilisant une librairie de siRNA sur mesure ciblant environ 80 gènes de nucléases nucléaires plus quelques gènes de la maintenance de l'ADNmt tels POL γ , TFAM, TWINKLE et POLRMT, avec 4 siRNA ciblant chaque gène (Chery-pick siRNA library plate, Dharmacon, **Figure 24**, *page suivante*). Le protocole reste le même mis à part que le mélange OptiMEM – Lipofectamine – siRNA est réalisé directement dans les puits et que les cellules sont ajoutées dans un second temps, diluées dans du milieu DMEM GlutaMAX SVF afin de supprimer l'étape de changement de milieu 5h après transfection. L'expression de PstI est induite 2j après transfection par ajout de la doxycycline, et les cellules sont utilisées en immunofluorescence le lendemain.

12	DCLRE1C ON- TARGETPlos SMARTpool -	EME2 ON- TARGETPlus SMARTpool	EXOG ON- TARGETplus SMARTpool	MLH1 ON- TARGETplus SMARTpool	POLB ON- TARGETplus SMARTpool	RBBP8 ON- TARGETplus SMARTpool	TATDN3 ON- TARGETplus SMARTpool	ZC3H12A ON- TARGETPIOS SMARTpool -
11	DFFB ON- TARGETplus SMARTpool- Human	ENDOD1 ON- TARGETplos SMARTbool -	FAN1 ON- TARGETplus SMARTpool- Human	MLH3 ON- TARGETplus SMARTpool- Human	POLD1 ON- TARGETplus SMARTpool- Human	RECOL4 ON- TARGETplus SMARTpool	TDP1 ON- TARGET plus SMART pool- Human	ZRANB3 ON- TARGETplus SMARTpool
10	ON- TARGETplus Cyclophilin B Control	POLRMT ON- TARGET plus SMART pool -	C10orf2 ON- TARGETplus SMARTpool	ON- TARGETplus Non- targeting	Empty Well	Empty Well	Empty Well	Empty Well
6	DCLRE18 ON- TARGETplos SMARTpool -	EMEL ON- TARGETplus SMARTpool	EXOS ON- TARGETplus SMARTpoolic Human	MGME1 ON- TARGETplus SMARTpool	PNPT1 ON- TARGETplus SMARTpool ² Human	RAGI ON- TARGETplus SMARTpopt	TATDN2 ON- TARGETplus SMARTpool ² Human	YBX1 ON- TARGETplus SMARTpool ² Human
8	C3orf33 ON- TARGETplus SMARTpool	DNASE2B ON- TARGET plos SMART pool -	EX01 ON- TARGETplus SMARTpool	MEIOB ON- TARGETplus SMARTpool	PNKP ON- TARGETplus SMARTpool ² Human	RAD9A ON- TARGETplus SMARTpood- Human	TATDN1 ON- TARGETplus SMARTpool- Human	XRN1 ON- TARGETplus SMARTpool- Human
2	ATAD3A ON- TARGETplus SMARTpool- Human	DNASE2 ON- TARGETplus SMARTpool	EXD2 ON- TARGETplus SMARTpool- Human	LONP1 ON- TARGETplus SMARTpool- Human	PLD6 ON- TARGETplus SMARTpool	RADSIC ON- TARGET plus SMART pool- Human	SUPV3L1 ON- TARGET plos SMART pool -	XRCC3 ON- TARGETplus SMARTpool- Human
9	APLF ON- TARGETplus SMARTpool	DNASE1L3 ON- TARGETplos SMARToool -	ERCCS ON- TARGETplus SMARTpool- Human	HARBI1 ON- TARGETplus SMARTpool- Human	PIF1 ON- TARGETplus SMARTpool- Human	RADS1 ON- TARGETplus SMARTpool	SLKIA ON- TARGETplus SMARTpopil- Human	WRN ON- TARGETplus SMARTpool- Human
5	APEX2 ON- TARGETplus SMARTpool	DNASE1L2 ON- TARGETPIOS SMARTpool -	ERCC4 ON- TARGETplus SMARTpool- Human	GEN1 ON- TARGETplus SMARTpool- Human	OPA1 ON- TARGETplus SMARTpool- Human	RADSO ON- TARGETplus SMARTpoper- Human	SETMAR ON- TARGETplus SMARTpopt- Human	TREX2 ON- TARGET plus SMART pool- Human
4	APEX1 ON- TARGET plus SMART pool	DNASE1L1 ON- TARGETPIOS SMARTpool -	ERCCI ON- TARGETplus SMARTpool	FENI ON- TARGETplus SMARTpool- Human	NEILI ON- TARGETplus SMARTpool- Human	RAD1 ON- TARGETplus SMARTpool- Human	RNASEH2A ON- TARGETplos SMARTpool -	TREX1 ON- TARGET plus SMART pool- Human
3	ON- TARGETplus GAPD Control Pool	POLG ON- TARGETplus SMARTpool	TFAM ON- TARGETplus SMARTpool	ON- TARGETplus Non- targeting	Empty Well	Empty Well	Empty Well	Empty Well
2	AEN ON- TARGETplus SMARTpool- Human	DNA2 ON- TARGETplus SMARTpool- Human	ENDOG ON- TARGETPlus SMARTpool	FANCI ON- TARGETplus SMARTpool- Human	MUS81 ON- TARGETplus SMARTpool- Human	POLQ ON- TARGETplus SMARTpool	REXO2 ON- TARGET plus SMART pool- Human	TDP2 ON- TARGET plus SMART pool
1	ANKLE1 ON- TARGETplus SMARTpool	DNASE1 ON- TARGETplus SMARTpool	ENPP3 ON- TARGETplus SMARTpool	FANCM ON- TARGETPlus SMARTpool	NBN ON- TARGETplus SMARTpool	PRKDC ON- TARGETplus SMARTpool	RNASEH1 ON- TARGETPIOS SMARTpool -	TERF2 ON- TARGETplus SMARTpool
	×	8	U	0	ш	ш	U	Ξ

FIGURE 24	Dlan	do	nlaqua	du	crible	ΡΝΛ	i
FIGURE 24 -	Flan	ue	plaque	uu	chole	KINA	I

Les puits vides sont utilisés pour différents contrôles : non traité doxycycline, sans lipofectamine, sans marquage avec l'anticorps primaire.

1.4 Transfection de plasmides (localisation)

La localisation de certaines protéines, notamment NUDT6, NUDT19, RAD54L et POL μ , a été réalisée par transfection de cellules avec un plasmide codant pour la protéine liée à l'eGFP. Le protocole est similaire à la transfection de siRNA en mode direct. Lors de la transfection dans des plaques 6 puits 145μ L de milieu OptiMEM + GlutaMAX avec 5μ L de Lipofectamine 2000 sont ajoutés goutte à 150μ L de milieu OptiMEM + GlutaMAX mélangé à environ 1.8μ g de plasmide. Le mélange est incubé 20min à température ambiante puis ajouté goutte à goutte au puits dans lequel 3mL de milieu OptiMEM + GlutaMAX a préalablement été ajouté. Les cellules sont incubées 5h à 37°C puis le milieu OptiMEM + GlutaMAX est remplacé par du milieu de culture normal. Les cellules sont observées au microscope 2-3 jours après transfection dans le cas de transfections transitoires, ou sont d'abord sélectionnées à l'aide de gentamycine environ une semaine après transfection, dans le cas de transfections stables, puis observées au microscope après 1-2 semaines de sélection.

Analyses sur les acides nucléiques

2.1 Extraction d'ADN

L'ADN est extrait grâce au kit NucleoSpin Tissue (Macherey-Nagel) selon les instructions du fabricant, avec une étape supplémentaire de dégradation de l'ARN. Pour chaque extraction 1-4.10⁶ cellules sont utilisées. Brièvement, les cellules sont lysées dans un tampon de lyse contenant de la protéinase K et du SDS pendant 15min à 70°C puis incubées 5min avec de la RNaseA à 37°C. Ensuite l'ADN est purifié sur colonne et élué avec 100μ L de tampon d'élution. Pour les applications nécessitant de l'ADN concentré (notamment le southern blot), l'ADN est précipité avec de l'éthanol et de l'acétate de sodium au moins 3h à -20°C. Il est ensuite lavé à l'éthanol 70% et resuspendu avec 10μ L d'eau distillée stérile. La concentration et la pureté de l'échantillon sont mesurées par Nanodrop (Nanodrop ND-1000, Thermo scientific). Lorsqu'une mesure plus précise de la concentration était nécessaire le Quantus Fluorometer avec le système QuantiFluor ONE dsDNA (Promega) était utilisé.

2.2 Extraction d'ARN et transcription inverse

L'ARN total est isolé à partir de 0.5- $1.5.10^6$ cellules, congelées dans l'azote liquide dès leur collecte et stockées à - 80° C si besoin, avec du TRI Reagent (Molecular Research Center Inc.) selon le protocole du fabricant. La concentration et la pureté des ARN sont mesurées par Nanodrop. Pour chaque échantillon un mélange de $2\mu g$ d'ARN, 1μ L d'amorces hexamériques (random hexamer, Promega) et d'eau distillée ultrapure d'un volume final de 10μ L est incubé à 65° C pendant 15min puis refroidi à 4°C 5 min. Ensuite du tampon M-MLV RT 1X (Promega), des dNTP (0.5mM chacun), $2U/\mu$ L de RNAsin Plus (Promega) et $10U/\mu$ L de transcriptase inverse M-MLV (Promega) sont ajoutés pour un volume final de 20μ L (concentrations finales), avant de réaliser la transcription inverse dans un thermocycleur (Mastercycler gradient, Eppendorf) : 37° C pendant 1h puis 95° C 10min. De la RNase A est finalement ajoutée dans chaque échantillon et incubée $20\min$ à 37° C puis 10min à 4° C.

2.3 Southern Blot

Pour analyser l'ADNmt en utilisant des sondes mitochondriales, $1\mu g$ d'ADN est chargé sur un gel d'agarose 1%, après digestion pendant 3-4h à 37°C avec BamH1 ou BamH1 + PstI pour le contrôle. La digestion par BamH1 a lieu dans le tampon H (Promega) et la double digestion dans le tampon E (Promega), en présence de BSA 1X (Promega). 7.5U de chaque enzyme de

		An	orce Forward	Amorce Reverse		
Taille		Position	Séquence	Position	Séquence	
	829	29 1671-1690 5'-GCT AAA CCT CCC AAA CC-3'		2480-2499	5'-AAA CAG GCG GGG TAA GAT TT-3'	
Sondes ADNmt	842	7653-7672	5'-TTC ATG ATC ACG CCC TCA TA-3'	8475-8494	5'-TTT TAT GGG CTT TGG TGA GG-3'	
	831	11714-11733	5'-CAC GGG CTT ACA TCC TCA TT-3'	12525-12544	5'-TGG CTC AGT GTC AGT TCG AG-3'	
Sonde 7S	435	239-259	5'-CTC ACC CAC TAG GAT ACC AAC-3'	655-674	5'-GAT ACT GCG ACA TAG GGT GC-3'	

Tableau 2 – Sondes utilisées pour les Southern Blots

Gène cible	Amorce Forward	Amorce Reverse
APP	5'-TTT TTG TGT GCT CTC CCA GGT CT-3'	5'-TGG TCA CTG GTT GGT TGG C-3'
DNA2	5'-CAGTCC CTC TGA TAT TGG TA-3'	5'-TCT TTC AAG AGT TCA CCA AC-3'
ENDOG	5'-GAA GGC CAT GGA CGA CAC-3'	5'-AGG ATT TCC CAT CAG CCT CT-3'
EXOG1	5'-GGG TGC CTA GAT GGG TTC TT-3'	5'-CAA AAT CCT GAG GCA CAA TG-3'
EXOG2	5'-GGA AGC AGC CGG ATG GTG AT-3'	5'-CAA AAT CCT GAG GCA CAA TG-3'
MGME1	5'-CGA GCT CTT GAA AGT GCT GTT-3'	5'-CCA TGT ATG CCA CAA CTT GC-3'
mtCYTB	5'-GCC TGC CTG ATC CTC CAA AT-3'	5'-AAG GTA GCG GAT GAT TCA GCC-3'
NUDT6	5'-CCA GCA GAT TAC CAG GAT AT-3'	5'-GTCTCC AAT ATC TTC TTC AGG-3'
Pst1	5'-ATT ACA AGC CCA ATT CCC GC-3'	5'-TAG GAA CGT GGG TCA GGA AC-3'
ТВР	5'-ACG CCA GCT TCG GAG AGT TC -3'	5'-CAA ACC GCT TGG GAT TAT ATT CG-3'

Tableau 3 – Liste des amorces PCR et qPCR utilisées

restriction est utilisée par échantillon, pour un volume final de 20μ L. La migration est effectuée à 100V pour environ 2h30.

L'ADN est ensuite dépuriné par incubation du gel 10min dans une solution de HCl 0.25M, puis dénaturé 30min dans une solution NaOH 0.5M, NaCl 1.5M et enfin neutralisé 45min dans une solution de TrisHCl pH8 1M, NaCl 1.5M. Les fragments d'ADN sont transférés sur la nuit par capillarité avec du SSC 5X sur une membrane nylon, qui est bloquée 2h à 80°C le lendemain.

La membrane est hybridée avec trois sondes mitochondriales marquées radioactivement et reconnaissant des séquences situées dans le gène codant pour l'ARNr 16S, entre les gènes ND5 et ND4 et entre les gènes COX2 et ATP8. Les sondes sont présentées dans le **Tableau 2**. Après 1h de pré-hybridation, l'hybridation des membranes est réalisée sur la nuit à 60°C dans un tampon phosphate de sodium 0.25M pH 7.2 et SDS 7%. Les membranes sont ensuite lavées une première fois 10min à 60°C (SSC 1X, SDS 0.5%) puis trois fois 10min toujours à 60°C (SSC 0.1X, SDS 0.1%). Les signaux d'hybridation sont analysés par phosphoimager (BioRad) ou contact avec un film photographique (Amersham Hyperfilm MP, GE Healthcare).

Dans le cas d'un Southern Blot avec hybridation avec la sonde 7S (présentée dans le **Tableau** 2), 3μ g d'ADN est chargé sur un gel d'agarose 0.8%, après 3-4h de digestion à 37°C par BamHI seulement.

2.4 PCR quantitative en temps réel

Toutes les réactions de PCR quantitative ont été réalisées sur un thermocycleur MasterCycler RealPlex (Eppendorf) en utilisant du MESA GREEN qPCR Mastermix Plus for SYBR Assay (Eurogentec) selon les instructions du fabricant.

La quantification relative de l'ADNmt a été réalisée par amplification par PCR quantitative en temps réel d'une portion du gène mitochondrial cytochrome b, en utilisant le gène nucléaire APP (amyloid precursor protein) comme standard. La qPCR (94°C pendant 2 min, 40 cycles de 94°C pendant 20s, 60.4°C pendant 20s et 72°C pendant 45s) est réalisée avec 10ng d'ADN totale. Les amorces utilisées sont renseignées dans le **Tableau 3**. Chaque mesure est faite en duplicat sur la même plaque 96 puits. La spécificité de l'amplification est contrôlée grâce aux courbes de fusion et les efficacités d'amplification sont déterminées grâce à des courbes étalons pour les deux couples d'amorces et différentes dilutions d'ADN total correspondant à un mélange d'ADN de tous les échantillons testés (**Figure 25**, *page suivante*). Le ratio ADNmt/ ADN nucléaire est estimé en utilisant les valeurs de cycles seuils (cycle threshold, Ct) obtenues.

La quantification relative de différents transcrits ARNm (PstI, ENDOG, EXOG, MGME1, FEN1, DNA2) a aussi été estimée par PCR quantitative en temps réel sur les ADNc correspondants, en utilisant les transcrits du gène TBP (TATA box binding protein) comme contrôle interne. Les différentes amorces utilisées pour les PCR (94°C pendant 2 min, 40 cycles de 94°C pendant 20s, 60°C pendant 20s, 72°C pendant 45s) sont renseignées dans le **Tableau 3**. De la même manière une courbe étalon pour chaque gène a été générée en utilisant une dilution sériale (1 :10 – 1 :80) d'ADNc correspondant à un mélange d'ADNc de tous les échantillons testés et chaque mesure est faite en duplicat sur la même plaque 96 puits.

2.5 Etude des sites PstI résistants par digestion in vitro

L'ADN de cellules Flp-In TREx 293 sauvages et Flp-In TREx 293 transfectées PstI non induites ou 27j post-induction avec la doxycycline a été extrait pour étudier l'éventuelle résistance de ces sites de restriction à la digestion *in vitro* par l'enzyme PstI. 400-500pb autour des sites de



FIGURE 25 – Exemple de courbe étalon pour le gène mtCYTB en qPCR La gamme est réalisée à l'aide de dilutions d'une solution stock d'ADN correspondant à un mélange de tous les échantillons. Les points sont mesurés en duplicats. D'après la courbe étalon les amorces mtCYTB ont une efficacité de 96%.

Site cible	Amorce Forward	Amorce Reverse		
PstI-COXI	5'-AGA CGT AGA CAC ACG AGC AT-3'	5'-GCC GAG AAA GTG TTG TGG GA-3'		
PstI-ATP6	5'-AAA CCT AGC CAT GGC CAT CC-3'	5'-AGG CCT AGT ATG AGG AGC GT-3'		

Tableau 4 – Liste des amorces utilisées pour l'amplification de fragments d'ADN autour des sites PstI

Condition	Site	Sens	Séquence adaptatrice	MID	Séquence cible
WT	COXI	Fwd	1	ACGAGTGCGT	AGACGTAGACACACGAGCAT
WT	COXI	Rev	2	ACGCTCGACA	GCCGAGAAAGTGTTGTGGGA
WT	ATP6	Fwd	1	ATCAGACACG	AAACCTAGCCATGGCCATCC
WT	ATP6	Rev	2	ATATCGCGAG	ATATGATAGGCATGTGATTGGTGG
PstI	COXI	Fwd	1	AGACGCACTC	AGACGTAGACACACGAGCAT
PstI	COXI	Rev	2	AGCACTCTAG	GCCGAGAAAGTGTTGTGGGA
PstI	ATP6	Fwd	1	CGTGTCTCTA	AAACCTAGCCATGGCCATCC
PstI	ATP6	Rev	2	CTCGCGTGTC	ATATGATAGGCATGTGATTGGTGG

Tableau 5 – Liste des amorces utilisées pour l'amplification de fragments d'ADN autour des sites PstI avant le séquençage par NGS

La séquence adaptatrice n°1 est : CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG et la séquence adaptatrice n°2 est : CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG. (Fwd : Forward, Rev : Reverse)

restriction PstI ont été amplifiées par PCR à l'aide de l'enzyme Pfu (Promega), qui possède une activité relecture, et des amorces indiquées dans le **Tableau 4**. La PCR est réalisée sur un thermocycleur Eppendorf Mastercycler Gradient avec 100ng d'ADN total (95°C pendant 1min, 30 cycles de 95°C pendant 30s, 58°C pendant 30s et72°C pendant 1min, et une élongation finale de 72°C pendant 5min). Les amplicons sont vérifiés par électrophorèse sur gel d'agarose 1.2% et purifiés avec le kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel) selon les instructions du fabricant.

Ils sont ensuite digérés *in vitro* par l'enzyme de restriction PstI pendant au moins 2h à 37°C et migrés sur un gel d'agarose 2%. L'ADNmt intact (non coupé) est récupéré à l'aide d'un bâtonnet stérile pour chaque échantillon et amplifié de nouveau par PCR. Après purification et nouvelle digestion *in vitro* par PstI les amplicons sont migrés sur gel d'agarose 2% pour évaluer la résistance des sites de restriction PstI des différents échantillons.

2.6 Next Generation Sequencing

L'ADN de cellules Flp-In TREx 293 sauvages et Flp-In TREx 293 transfectées PstI 10j postinduction avec la doxycycline a été séquencé par NGS. Pour caractériser l'impact des CDB sur l'intégrité de l'ADNmt, 400-500pb autour des sites de restriction PstI ont été amplifiées par PCR à l'aide de l'enzyme Pfu (Promega), qui possède une activité relecture, et des amorces contenant des séquences code-barres (MIDs, Multiplex Identifiers) afin de séquencer à la fois les cellules sauvages et PstI induites, aux deux sites de restriction. Les séquences des amorces sont indiquées dans le **Tableau 5**. Les produits de PCR sont vérifiés par électrophorèse sur gel d'agarose 1.2% et purifiés avec le kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel) selon les instructions du fabricant. La concentration en ADN de chaque produit PCR purifié est mesurée par Qubit dsDNA HS Assay Kit (Molecular Probes). Les amplicons PCR, portant chacun une séquence code-barres différentes, ont été mélangés dans des proportions équimolaires et séquencés sur une plateforme Roche 454 GS-FLX+ Titanium par l'entreprise Eurofins MWG (Ebersberg, Germany).

Les données de séquençage ont été analysées grâce au logiciel GS Data Analysis et à l'aide de l'outil de détection des variants « LoFreq » sous Linux.

2.7 Séquençage par clonage et analyse des colonies

Pour séquencer les sites PstI sans passer par du NGS nous avons amplifié des fragments d'ADNmt autour des sites PstI, que nous avons ensuite cloné dans un plasmide dans des bactéries. Nous avons ensuite extrait l'ADN plasmidique de plusieurs colonies et nous l'avons séquencé, ce qui nous a permis d'étudier l'hétéroplasmie à petite échelle.

Pour cela les fragments autour des sites de restriction PstI ont été amplifiés par PCR grâce à des amorces spécifiques (**Tableau 4**) et à la polymérase Pfu (Promega), qui a l'avantage de posséder une activité relecture et donc d'être plus fidèle. La PCR est réalisée sur un thermocycleur Eppendorf Mastercycler Gradient avec 100ng d'ADN de cellules PstI non induites, cultivées depuis plus d'un mois et partiellement résistantes aux cassures, dans un volume réactionnel final de 50μ L (95°C pendant 1min, 30 cycles de 95°C pendant 30s, 58°C pendant 30s, 72°C pendant 1min et une élongation finale à 72°C pendant 5min). Le produit de la PCR est purifié avec NucleoSpin Gel and PCR Clean-up selon le protocole du fabricant (Macherey-Nagel) puis une extrémité 3'-A est ajoutée avant le clonage, par incubation de 25μ L de produit PCR purifié



FIGURE 26 – Séquençage du site PstI par clonage et analyse des colonies La présence d'un double-pic indique que les deux colonies séquencées en même temps possèdent deux polymorphismes différents de l'ADNmt, ici CTGCAG, le site de restriction PstI et CTGCGG, un polymorphisme résistant à la digestion par PstI.

avec 6.7 μ L de tampon Gotaq 5X, 1 μ L d'ATP 10mM et 0.5 μ L de Gotaq pendant 10-12min à 72°C.

Le clonage est ensuite réalisé grâce au kit TOPO TA Cloning Dual Promoter (Invitrogen) selon les instructions du fabricant, en utilisant 2μ L de produit PCR. Des bactéries DH5 α ou BC α sont transformées par incubation de 2μ L de la réaction de clonage avec 30μ L de bactéries, incubation 30min sur glace et heat shock de 30s à 42°C. 250μ L de milieu LB sont ajoutés au tube, qui est ensuite incubé 30min à 37°C sous agitation. Les bactéries sont ensuite étalées sur boites LB/agar contenant de la kanamycine à 25μ g/ mL et incubées sur la nuit à 37°C.

48 colonies sont piquées et incubées sur la nuit sous agitation avec 3mL de LB contenant de la kanamycine à $30\mu g/mL$ (2 colonies par Falcon). L'ADN plasmidique est ensuite extrait grâce au kit Nucleospin Plasmid (Macherey-Nagel), suivant les instructions du fabricant. L'ADN, après dosage, est ensuite envoyé à séquencer par la société Eurofins Genomics. L'analyse des spectres de séquençage permet de déterminer si les deux colonies séquencées en même temps présentent les mêmes séquences. Un double pic pour un nucléotide indique que les deux molécules sont différentes (**Figure 26**).

Anticorps primaires							
Cible	Masse moléculai re	Dilution WB (ou IF)	Production	Reference	Anticorps secondaire		
49kDa	49 kD	1/500	lapin	Fait maison	1		
ADN	-	(1/800)	souris	Progen#AC-30-10	7		
ATP5a	54 kD						
UQCR2	48 kD						
SDHB	29 kD	1/1000	souris	Abcam 110411	2		
COXII	22 kD						
NDUFB8	18kD						
DFFB	39 kD	1/800 (1/300)	lapin	Abcam 69438	1,5		
ENDOG	33 kD	1/1000	lapin	Abcam 9647	1		
EXOG	41 kD	1/500	lapin	Proteintech 21523-1-AP	1		
EXD2	70-75 kD	1/1 000 (1/200)	lapin	Sigma HPA005848	1, 5, 6		
FEN1	43 kD	1/1000	lapin	Fait maison	1		
γ - H2AX	17 kD	1/750	lapin	Cell Signaling mAb #9718	1		
γ - H2AX	-	(1/200)	souris	Merck Millipore 05-636-I	4		
H3	15 kD	1/3 000	souris	Abcam 10799	2		
LC3	17kD	1/2000	lapin	Abcam 48394	1		
MGME1	39 kD	1/200	lapin	Sigma HPA040913	1		
NDUFA9	40 kD	1/1000	souris	Abcam 14713	2		
NUDT19	42 kD	1/1000 (1/100)	lapin	Abcam 180167	1, 5, 6		
PDH	44 kD	1/2500	souris	-	2		
PINK1	63 kDa	1/1000	souris	Abcam 75487	2		
PMP70	-	(1/50)	souris	Abcam 211533	8		
POLγA	140 kD	1/300	chèvre	Santacruz sc5931	3		
POLµ	55 kD	1/1000	lapin	Abcam 157465	1		
RAD54B	90-103 kD	1/1000 (1/200)	lapin	Abcam 8331	1,5		
RAD54L	70-84 kD	1/2000	lapin	Abcam 10705	1		
RAD6A	17kD	1/1000 (1/200)	lapin	Abcam 31917	1,5		
RAD6B	17kD	1/1000 (1/200)	lapin	Abcam 128951	1,5		
SND1	102 kD	1/400 (1/400)	lapin	Abcam 65078	1,5		
TFAM	25 kD	1/10 000 (1/800-1/50)	lapin	Fait maison	1,5		
TOMM20	16kD	1/500	souris	Abcam 56783	2		
TREX1	39 kD	1/1000 (1/250)	lapin	Abcam 185228	1		
Tubuline	50 kD	1/2000	souris	Sigma	2		
TWINKLE	77 kD	1/500	lapin	Faitmaison	1		

Tableau 6 – Liste des anticorps primaires utilisés (WB : Western Blot, IF : immunofluorescence)

Analyses protéiques

3.1 Extraction de protéines

Les cellules sont récoltées par trypsinisation et 5.10^5 à 4.10^6 cellules sont centrifugées à 4°C, à 200g, pendant 2 min. Les culots sont resuspendus dans du tampon de lyse (TrisHCl pH 7.8 50mM, NaCl 150mM, Nonidet P-40 1%, inhibiteurs de protéases), 1.10^6 cellules HEK293, HeLa ou U2OS sont reprises dans 80μ L de tampon de lyse alors que 2.10^6 cellules HAP1 sont reprises dans 80μ L. Une incubation de 10min sur glace permet la lyse et les lysats sont ensuite soniqués deux fois 10s avec 50% d'impulsions pour fragmenter l'ADN. Les concentrations sont déterminées par la méthode de Bradford (BioRad) selon une gamme étalon d'albumine bovine et du Laemmli 5X (TrisHCl 0.3M pH 6.8, bleu de bromophénol 0.1% p/v, glycérol 50% v/v, SDS 10% p/v, β -mercaptoéthanol 25% v/v) est finalement ajouté aux échantillons.

3.2 Western Blot

Les protéines sont dénaturées 5min à 95 °C, déposées sur gels SDS-PAGE 10-15% et migrées à 80-100V. Elles sont ensuite transférées sur membrane de nitrocellulose (GeHealthcare) pendant 1h20 à 200mA.

Les membranes sont ensuite bloquées dans du TBST (Tris pH 7.4 50mM, NaCl 20mM, Tween 20 0.1%) contenant 5% de lait écrémé pour 1h minimum, à température ambiante. Elles sont ensuite incubées avec les anticorps primaires correspondants (**Tableau 6**) 1-3h à température ambiante. Après trois lavages de 5 min au TBST les membranes sont incubées avec les anticorps secondaires correspondants (**Tableau 7**, *page suivante*), conjugués à la HRP, 1h à température ambiante. La détection des protéines, après trois lavages au TBST, est réalisée grâce aux révélateurs LuminataTM forte western HRP Substrate (Millipore) or SuperSignalTM West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo ScientificTM), par film photographique (Amersham Hyperfilm ECL, GE Healthcare) ou caméra (MF-ChemiBIS, DNR Bio-Imaging Systems). L'abondance relative des protéines analysées est évaluée par quantification densitométrique de l'intensité du signal grâce au logiciel Quantity One (BioRad).

3.3 Fractionnement

La localisation subcellulaire de certaines protéines a été réalisée grâce à un kit de fractionnement cellulaire (ab109719, abcam), selon les instructions du fabricant. 1-3.10⁶ cellules sont

Anticorps secondaires								
Numéro	Туре	Dilution	Référence					
1	Chèvre (HRP) anti-lapin	1/10 000	Abliance BL2407					
2	Lapin (HRP) anti-souris	1/10000	Sigma A9044					
3	(HRP) anti-chèvre	1/5000	Don					
4	Chèvre (Alexa Fluor 488) anti-souris IgG3	1/1000	Molecular Probes A21151					
5	Chèvre (Alexa Fluor 488) anti-lapin IgG	1/1000	Molecular Probes A11034					
6	Chèvre (Alexa Fluor 555) anti-lapin	1/1000	Don					
7	(Alexa Fluor 488) anti-souris IgM	1/1000	Don					
8	Âne (Alexa Fluor 488) anti-souris IgG	1/1000	Molecular Probes A21202					

Tableau 7 – Liste des anticorps secondaires utilisés

utilisées par fractionnement. Les différentes fractions obtenues sont soniquées puis dosées par la méthode de Bradford. Du Laemmli 5X est enfin ajouté.

Une autre technique de fractionnement a été utilisée pour la préparation de mitoplastes dans le but de faire une analyse protéomique SILAC, utilisant des centrifugations différentielles et l'ultracentrifugation sur gradient de sucrose pour séparer les différents organites. 2-3.10⁸ cellules sont récoltées et regroupées dans un falcon 50mL après rinçage au PBS. Le culot est pesé (1g de cellules correspond à 0.8mL en volume humide) et repris dans 9 volumes de tampon hypotonique (HEPES pH 8 20mM, KCl 5mM, MgCl2 1.5mM, DTT 2mM, BSA 1mg/ mL, PI 1X) sur glace pendant 10min. Les cellules sont ensuite lysées avec un homogénéisateur Dounce et un pilon avec ajustement serré, par environ 20 allers-retours. 2mL de tampon MSH 2.5X (mannitol 525mM, sucrose 175mM, HEPES pH 8 20mM, EDTA 5mM, DTT 2mM, PI 1X, BSA 1mg/mL) pour 3mL de tampon hypotonique sont ensuite ajoutés et l'homogénat est centrifugé à 1600g pendant 10min pour éliminer les débris cellulaires et les noyaux. Le surnageant est récupéré et de nouveau centrifugé à 1600g pendant 10min. Les organites sont ensuite culottés par centrifugation à 8000rpm et le culot est resuspendu dans le tampon DNaseI (mannitol 210Mm, sucrose 70mM, HEPES pH 8 20mM, EDTA 2mM, DTT 2mM, BSA 1mg/ mL, MgCl2 10mM, PI 1X) afin d'avoir une concentration totale en protéine de 2mg/mL (en considérant que 1g de cellules au départ correspond à 10mg de mitochondries). De la DNase I ou Benzonase ainsi que 1μ L de PI sont ajoutés et l'échantillon est mis sur roue à 4°C pendant 1-2h. L'ajout d'EDTA à une concentration finale de 15mM permet de stopper l'activité DNase. La suspension est ensuite lavée deux fois avec du tampon MSH 1X (mannitol 210Mm, sucrose 70mM, HEPES pH 8 20mM, EDTA 2mM, DTT 2mM, PI 1X) et centrifugation à 8000g à 4°C pendant 5min. L'échantillon, repris dans un volume minimum de tampon MSH 1X est chargé sur un gradient 1M/ 1.5M de sucrose dans du tampon de gradient (HEPES pH 7.8 10mM, EDTA 5mM et DTT 2mM) et centrifugé à 33000 rpm pendant 1h à 4°C (1g de cellules au départ est chargé sur un gradient). L'interface est collectée et 4 volumes de tampon de gradient sont ajoutés tout en vortexant doucement. Les mitochondries sont ensuite obtenues par centrifugation à 10000g pendant 10min à 4°C.

Pour obtenir les mitoplastes la fraction obtenue est alors incubée avec 200μ L de tampon potassium phosphate pH 7.2 20mM pendant 20min sur glace. De l'ATP et du MgCl2, concentrations finales 1mM chacun, sont ensuite ajoutés. Après 5min sur glace l'échantillon est centrifugé à 15000g pendant 10min à 4°C puis traité avec de la protéinase K (50 μ g/ mL dans le tampon MSH 1X) pour éliminer les protéines potentiellement attachées à la membrane interne mitochondriale, pendant 30min sur glace. L'ajout de PMSF 5mM permet d'inactiver la protéinase K, puis l'échantillon est centrifugé à 15000g pendant 10min à 4°C et finalement lavé avec le tampon MSH 1X et de nouveau centrifugé pour culotter les mitoplastes.

3.4 Dosage de l'activité du complexe IV

Pour le dosage de l'activité du complexe IV les cellules sont lysées dans un tampon particulier, composé d'une solution d'HEPES pH 7.5 20mM, de Triton 100X 0.1% et d'EDTA 1mM. Le dosage des protéines est réalisé par la méthode de Bradford et tous les échantillons sont ramenés à la même concentration par ajout de tampon de lyse. Environ 1mg de protéines est nécessaire par échantillon, dans un volume de 80μ L.

Une solution stock de cytochrome c (Sigma) à 100μ M dans un tampon KH2PO4 50mM, EDTA pH 7 1mM fraîchement préparée est utilisée pour ce dosage. 1mL de la solution est tout d'abord oxydé à 100% par ajout de ferricyanure de potassium et sert à faire le blanc du

spectrophotomètre à 550nM. 1mL de la solution stock est réduit à 100% par ajout de dithionite de sodium, et son absorbance est mesurée, toujours à 550nm. La solution stock est alors partiellement réduite par ajouts successifs de dithionite de sodium jusqu'à obtenir une absorbance correspondant à 90-95% de celle de la solution 100% réduite.

Le blanc est réalisé sur l'air avant le dosage des activités des échantillons, qui se fait avec le spectrophotomètre thermostaté à 37°C. Les cuvettes sont incubées à 37°C avec 920 μ Lde solution de cytochrome c partiellement réduite. La réaction est alors déclenchée par ajout de l'échantillon 1 dans la cuvette 1, mélangé rapidement, et la lecture de l'absorbance à 550nM est réalisée selon la cinétique suivante : lecture toutes les 5sec dès le lancement de la cinétique, pendant 45 secondes. La pente de la droite décroissante obtenue en traçant l'absorbance en fonction du temps représente l'oxydation du cytochrome c. La quantité de cytochrome c oxydée est calculée à l'aide de la loi de Beer-Lambert ($\epsilon = 18.5 \text{ mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) et exprimée en fonction du temps pour obtenir l'activité totale. L'activité spécifique du complexe IV correspond à l'activité totale rapportée à la quantité de protéines utilisées pour le dosage, et est exprimée en nmol.min⁻¹.mg(protéines)⁻¹.

Microscopie et cytométrie en flux

4.1 Microscopie en épifluorescence

Les cellules sont cultivées au moins une nuit sur des lamelles en verres dans des plaques 6 puits avant toute expérience de microscopie. Le marquage des mitochondries est réalisé par incubation des cellules vivantes avec 40nM de MitroTracker Red CMXRos (Molecular Probes) à 37°C pendant 30 min pour les cellules HEK293 et HAP1 (20nM pendant 20min pour les cellules HeLa et U2OS) puis rinçage deux fois avec du PBS. Les incubations suivantes sont alors faites au maximum dans l'obscurité.

Les cellules sont ensuite fixées avec une solution de formaldéhyde 3.7% dans du PBS, à 37°C pendant 15min, rincées 3 fois avec du PBS additionné de 0.1% de Tween 20 (PBST), perméabilisées avec du PBS additionné de 0.5% de Triton 100X à température ambiante pendant 10min, rincées 3 fois avec du PBST et incubées avec une solution de blocage (BSA 1% et glycine 22.5mg/mL dans du PBST) à température ambiante 30min. Les lamelles sont ensuite incubées avec l'anticorps primaire souhaité dilué dans du PBS (Tableau X) 1-2h à température ambiante, en retournant la lamelle sur une goutte d'anticorps. Pour cela au minimum $70\mu L$ d'anticorps dilué dans du PBS sont déposés sur du parafilm et la lamelle est retournée sur la goutte, cellules vers le bas. L'incubation est réalisée dans une boite fermée saturée en humidité. Les anticorps non attachés sont ensuite éliminés par 3 lavages au PBST, puis les lamelles sont incubées 1h avec l'anticorps secondaire correspondant conjugué au fluorophore voulu dilué dans du PBS (Tableau X). Les cellules sont rincées 3 fois au PBST et l'ADN est marqué à l'aide de DAPI ($10\mu g/mL$, $20\mu L/$ lamelle) pendant 1min. La lamelle est rincée une dernière fois avec du PBS. Les lamelles sont montées sur des lames en utilisant comme milieu de montage $10\mu L$ de PBS/glycérol (50/50, v/v) et observées grâce au microscope Leica MMAF Imaging NX et au logiciel MetaMorph (Leica). Les filtres DAPI (bleu), excitation : BP405/60, dichroïque : 455 LP, émission : BP470/40; FITC (vert), excitation : BP480/40, dichroïque : 505 LP, émission : BP527/30; Texas Red (rouge) excitation : BP560/40, dichroïque : 585 LP, émission : BP645/75, sont utilisés suivant les observations. L'observation de cellules transfectées avec des protéines liées à la eGFP peut se faire sur cellules vivantes ou fixées, le protocole général reste le même, sans incubation avec des anticorps.

Pour visualiser la réplication de l'ADN, mitochondrial et nucléaire, nous avons utilisé un analogue de la thymidine, l'EdU, qui est incorporé à l'ADN nouvellement synthétisé et ensuite marqué grâce à une réaction clic par le fluorophore Alexa Fluor 488 (Click-iT EdU Alexa Fluor 488 Imaging Kit, Invitrogen). Les cellules, cultivées sur lamelle dans une plaque 6 puits, sont incubées avec une solution d'EdU à 50μ M préparée avec le milieu de culture dans lequel les cellules poussent depuis au moins une nuit à 37° C pendant 1h (1mL/ puits). Le milieu additionné



FIGURE 27 – Analyse de la masse mitochondriale en cytométrie en flux

La population R1 exclut les débris cellulaires et la majorité des cellules mortes, la population R2, souspopulation de R1, sélectionne les cellules vivantes, négatives au Sytox Blue et la population R3, souspopulation de R2, représente les cellules positives au MitoTracker Green. La masse mitochondriale est estimée grâce à la moyenne d'intensité de fluorescence de la population R3 sur le canal BL1.



FIGURE 28 – Analyse de l'apoptose par cytométrie en flux

La population R1 exclut les débris cellulaires. Le tracé de BL2, représentant l'intensité de fluorescence de l'iodure de propidium, en fonction de BL1, représentant l'intensité de fluorescence de l'annexine V liée à l'Alexa Fluor 488, sur la sous-population R1, permet de délimiter 4 populations : les cellules vivantes (R4), les cellules en apoptose précoce (R5), les cellules en apoptose tardive (R3) et les cellules mortes (R2).

d'EdU est éliminé et les cellules sont rapidement rincées avec du milieu neuf. Les lamelles sont fixées à l'aide de formaldéhyde 3.7% dans du PBS 15min à température ambiante, rincées 2 fois avec du PBS additionné de 3% de BSA et perméabilisées avec du PBS additionné de 0.5% de Trition 100X. Après 2 rinçages PBS et BSA 3% les lamelles sont incubées à l'envers sur une goutte d'au moins 70 μ L de cocktail réactif Click-It, 30min à l'abri de la lumière. Ce cocktail réactif est préparé selon les instructions du fabricant, en remplaçant seulement le produit « reaction buffer additive » par de l'acide ascorbique 0,5M dilué dans de l'eau. Il est préparé pendant la perméabilisation car il doit être utilisé dans les 15min. Les lamelles sont lavées une dernière fois avec du PBS et BSA 3% et montées sur les lames en utilisant comme milieu de montage 10 μ L de PBS/glycérol (50/50, v/v). L'observation se fait au microscope Leica MMAF Imaging NX avec le logiciel MetaMorph (Leica), l'exposition du canal GFP doit être élevée pour détecter le signal mitochondrial, ce qui sature le signal nucléaire des cellules en réplication nucléaire.

4.2 Cytométrie en flux

Les analyses de cytométrie en flux ont été réalisées avec l'appareil Attune Acoustic Focusing Cytometer (Thermo Scientific) exceptées les analyses sur les cellules HAP1 WT et KO NUDT19 qui ont été réalisées avec l'appareil FACS Calibur (BD Biosciences).

Pour évaluer la masse mitochondriale environ 2.10^6 cellules sont incubées 30min avec 150nM de MitoTracker Green FM (Molecular Probes) puis rincées au PBS. Elles sont ensuite récoltées par trypsination et lavées deux fois à l'aide de milieu de culture sans phénol rouge (RPMI 1640 Medium, no phenol red, Gibco). 5.10^5 cellules/mL sont utilisées pour chaque échantillon. Quelques minutes avant acquisition au cytomètre en flux les cellules sont incubées avec 1μ L d'un colorant vital à 1mM (SYTOX Blue Dead Cell Stain, Life Technologies) sur la glace et à l'abri de la lumière. Un contrôle négatif, traité selon le même protocole mais sans marquage par le MitoTracker, a été ajouté à l'expérience. La fluorescence verte est mesurée avec un laser à 488nm et un filtre 530/30nm et la fluorescence bleue avec un laser violet à 405nm et un filtre 450/40nm. En moyenne 10000 évènements sont analysés par échantillon. Le SSC tracé en fonction du FSC permet tout d'abord d'exclure les débris et les cellules mortes selon les paramètres physiques, puis la fluorescence du Sytox Blue est tracée en fonction du FSC sur cette population, ce qui permet de bien sélectionner uniquement les cellules vivantes. Enfin la masse mitochondriale est évaluée grâce à la moyenne de l'intensité de fluorescence du canal MitoTracker sur la population vivante (**Figure 27**).

L'apoptose a aussi été analysée par cytométrie en flux grâce au kit Dead Cell Apoptosis Kit with Annexin V Alexa Fluor 488 & Propidium Iodide (PI) (Molecular Probes), selon les instructions du fabricant. Des cellules traitées avec de la staurosporine 2μ M pendant 4h servent de témoin positif de l'apoptose. Pour cette expérience le milieu de culture surnageant, pouvant contenir des cellules flottantes en apoptose, a été conservé lors de la collecte des cellules. La fluorescence de l'annexine V liée à l'Alexa Fluor 488 est déterminée à l'aide du laser à 488nm et du filtre 530/30nm, et la fluorescence de l'IP à l'aide du laser à 488nm et du filtre 575/24nm. En moyenne 10000 évènements sont analysés par échantillon. Pour corriger le chevauchement spectral entre l'Alexa Fluor 488 et l'IP une compensation de fluorescence a été réalisée, sur l'échantillon traité staurosporine, afin d'éliminer le signal de chaque fluorophore du canal de l'autre fluorophore où il était aussi détecté. La population cellulaire cible a tout d'abord été sélectionnée en traçant le SSC en fonction du FSC, pour exclure les débris mais pas les cellules mortes, selon les paramètres physiques. La population sélectionnée a ensuite été analysée sur un graphe représentant la fluorescence d'IP en fonction de celle de l'Alexa Fluor 488, à l'aide d'un quadrant délimitant les différentes sous-populations, vivante ou apoptotiques (**Figure 28**).

Le cycle cellulaire a aussi été analysé par cytométrie en flux à l'aide du produit FxCycle PI/ RNase Staining Solution (Molecular Probes). Des cellules ont été traitées avec de la demecolcine à 0.01µg/ mL pendant 12h à 37°C afin d'obtenir un contrôle bloqué en phase G2/M. Environ 5.10⁵ cellules sont utilisées par échantillon, et fixées à l'éthanol 70% préalablement refroidi à -20°C. L'éthanol est ajouté goutte à goutte en vortexant pour éviter l'amas de cellules. La fixation est réalisée au minimum 3h à -20°C, puis l'éthanol est éliminé après centrifugation (1000g, 5min car les cellules dans l'éthanol flottent plus facilement). Après un rinçage PBS, 250μ L de réactif est ajouté par échantillon, et incubé 15min dans le noir à température ambiante. L'iodure de propidium est visualisé grâce au canal FL2 (laser à 488nm et filtre 585/42nm). En moyenne 10000 évènements sont analysés par échantillon, passé à vitesse lente. Le SSC tracé en fonction du FSC permet tout d'abord de sélectionner la population cellulaire vivante. Ensuite l'aire du signal FL2 de cette population est tracée en fonction de la hauteur du signal FL2. ce qui permet de sélectionner uniquement les cellules à l'état singulet. Enfin un histogramme représentant le nombre d'évènements en fonction du signal FL2, sur la population de cellules vivantes à l'état singulet, permet de visualiser la quantité de PI absorbé par les cellules et donc la quantité d'ADN, indiquant les phases du cycle cellulaire (Figure 29).



FIGURE 29 - Analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux

Le tracé de l'aire du signal FL2 en fonction de la hauteur du signal FL2 à partir de la population cellulaire vivante permet de sélectionner les cellules à l'état singulet (graphe de gauche). L'histogramme représentant le nombre d'évènements en fonction du signal FL2 permet de visualiser la quantité d'ADN des cellules et indique donc les phases du cycle cellulaire. Le graphe de droite présente l'histogramme obtenu pour des cellules traitées démécolcine pendant 12h, bloquées en phase G2/M.



FIGURE 30 – Plasmide utilisé pour le clonage des protéines recombinantes Nudix



FIGURE 31 – Electrophorèse sur gel SDS-PAGE après purification de la protéine NUDT19 sur colonne de nickel

Dépôts 20 μ L. FT : flowthrough, W : wash, N : fractions collectées.

Etude de protéines recombinantes

5.1 Expression et purification des protéines recombinantes

Les cDNA des gènes d'intérêt MTH1, NUDT6 et NUDT19 ont été tout d'abord clonés, avec l'ajout d'une queue poly(histidines), dans le plasmide BacPAK9, pour une expression en cellules d'insectes avec le système baculovirus (**Figure 30**). La séquence d'adressage mitochondrial de NUDT6 a été supprimée lors du clonage pour obtenir la protéine recombinante. La culture des cellules d'insectes a été réalisée par des chercheurs du laboratoire du Pr. Maria Falkenberg à l'université de Göteborg, Suède (BacPAK Baculovirus Expression System, Clontech). Les cellules ont été récoltées environ 4j après infection. Toutes les étapes de purification sont réalisées au maximum à 4°C.

La purification des protéines recombinantes débute par la lyse des cellules d'insectes. Les cellules sont centrifugées à 4000rpm, pendant 10min. Le surnageant est éliminé et le culot resuspendu dans du PBS froid puis centrifugé de nouveau à 4000rpm, pendant 10min, ce rinçage est réalisé deux fois. Le culot est ensuite resuspendu dans du tampon de lyse (TrisHCl pH 8 20mM, NaCl 500mM, β -mercaptoethanol 10mM, PI 1X) et congelé dans l'azote liquide. Les protéines sont récupérées dans le surnageant après décongélation rapide de l'échantillon et ultra centrifugation à 20000rpm, pendant 45min. L'ADN est fragmenté en passant la solution plusieurs fois à travers l'aiguille d'une seringue.

Ensuite une première étape de purification est réalisée sur colonne de nickel. La résine est équilibrée avec un tampon imidazole 0M (TrisHCl pH 8 25mM, NaCl 0.4M, glycérol 10%, β -mercaptoethanol 10mM, PI 1X) et une centrifugation 4°C, 2800rpm, pendant 5min. La solution de protéines obtenue après l'étape de lyse est ajoutée à la résine et mise en rotation sur roue 45min, ainsi les protéines vont se lier à la résine nickel grâce à leurs étiquettes poly(histidines). Le surnageant est éliminé après centrifugation à 2800rpm, pendant 5min. Deux lavages sont réalisés avec un tampon imidazole 10mM, par rotation sur roue 5min et centrifugation. La résine liée aux protéines recombinantes est resuspendue dans un petit volume de tampon imidazole 10mM et chargée sur la colonne. Du tampon imidazole 250mM, la solution d'élution, est ensuite ajouté sur la colonne. Après élution de 1mL la résine est incubée 10min avec la solution d'élution. 15 fractions supplémentaires de 1mL sont ensuite collectées. La présence de la protéine purifiée est vérifiée par dépôt des protéines sur gel SDS-PAGE (**Figure 31**) puis les fractions sont congelées dans l'azote liquide et stockées à -80°C.

La deuxième étape consiste en une filtration sur gel, sur colonne HiLoad 16/60 Superdex 200 prepGrad (volume de la colonne : 120mL). Le tampon d'élution (HEPES pH 7.2 25mM, glycérol 10%, EDTA pH8 0.5mM, NaCl 0.4M, DTT 1mM, PI 1X) est filtré sous vide avant utilisation. L'élution est réalisée avec un flux de 1mL/ min. Des fractions de 1mL sont collectées



FIGURE 32 – Purification de la protéine NUDT19 par gel filtration

En haut : Chromatogramme de la purification. En bas : Electrophorèse sur gel SDS-PAGE des fractions collectées correspondant au pic sur le chromatogramme, dépôts 20μ L. C et D : fractions collectées.



FIGURE 33 – Purification de la protéine NUDT19 sur colonne héparine En haut : Chromatogramme de la purification. En bas : Electrophorèse sur gel SDS-PAGE des fractions collectées correspondant au pic sur le chromatogramme, dépôts 20μ L. A et B : fractions collectées.

45min après le début de l'élution et pendant 75min ensuite, et les fractions correspondant au pic sur le chromatogramme sont testées par dépôt des protéines sur gel SDS-PAGE (**Figure 32**), puis elles sont congelées dans l'azote liquide et stockées à -80°C.

La dernière étape est une purification sur colonne héparine (HiTrap Heparin 1mL x2). Les fractions de la filtration sur gel contenant la protéine recombinante sont regroupées et diluées avec un tampon de dilution (HEPES pH 7.2 25mM, glycérol 10%, EDTA pH 8 0.5mM, DTT mM, PI 1X) afin que la concentration en sels de l'échantillon soit la même que celle du tampon faible en sels. Le tampon A, faible en sels, a la même composition que le tampon de dilution plus 0.2M de NaCl et le tampon B, riche en sels, a la même composition que le tampon de dilution plus 1.2M de NaCl. L'élution est réalisée grâce à un gradient 100% B en 40min, avec un flux de 1mL/ min, et des fractions de 0.5mL sont collectées. Les fractions correspondant au pic sur le chromatogramme sont testées par dépôt des protéines sur gel SDS-PAGE (**Figure 33**), puis elles sont congelées dans l'azote liquide et stockées à -80°C.

5.2 Dosage de l'activité NTPase

La mesure de la capacité d'hydrolyse des nucléotides par les NUDIX NUDT6 et NUDT19 a été réalisée par dosage du phosphate libéré par l'incubation de ces protéines avec différents nucléotides, modifiés ou non. La NUDIX MTH1 sert de contrôle positif d'activité dans ce dosage.

Le mélange réactionnel de base se compose de TrisHCl 20mM pH 8, MgCl2 4.5mM, DTT 1mM, nucléotide 0.5mM pour les non modifiés ou 0.05mM pour les modifiés, pyrophosphatase 0.4U/ mL (sauf pour le test avec NUDT6 sur nucléotides non modifiés) et de la protéine ou du tampon de dilution seul (témoin négatif). MTH1 et NUDT6 sont dans le même tampon de dilution (le tampon d'élution de la purification sur colonne héparine), alors que NUDT19 est dans un tampon possédant une concentration en NaCl légèrement plus élevée. Il a donc fallu ajouter du NaCl dans les puits correspondant à l'enzyme MTH1 sur les plaques 96 puits des dosages d'activités de NUDT19 pour être à concentrations en sels égales. Les plaques sont ensuite incubées 1h à 37°C.

Le kit Malachite Green Phosphate Assay (BioAssay Systems) est utilisé pour détecter le phosphate libre produit par incubation des enzymes avec les différents nucléotides, selon les instructions du fabricant. La plaque est incubée environ 20min avec les réactifs à température ambiante puis analysée avec un lecteur de plaque (Sigma960, Metertech Inc) à 600nm (**Figure 34**). Différents pH de TrisHCl et différents cofacteurs ont aussi été testés pour les analyses d'activité de NUDT19 comparée à MTH1, avec les mêmes concentrations que le mélange réactionnel de base.



FIGURE 34 – Dosage du phosphate libre à l'aide du kit Malachite Green Phosphate Assay En présence de phosphate libre le réactif prend une couleur verte quantifiable par lecture de l'absorbance à 600nm
Chapitre 6

Analyses statistiques

Le test de Student a été utilisé pour évaluer les différences entre moyennes des échantillons contrôles et tests dans les expériences fournissant des données quantitatives et réalisées au moins en triplicat. La significativité statistique est reconnue à partir de p<0.05. Les barres d'erreur sur les figures représentent les erreurs standards par rapport à la moyenne.

Troisième partie

Résultats



FIGURE 35 – Stratégie d'induction de CDBmt

L'ajout de doxycycline induit l'expression de l'enzyme de restriction liée à une séquence d'adressage mitochondrial. L'enzyme est ainsi importée dans les mitochondries où elle coupe l'ADNmt en deux sites de restriction situés dans les gènes COX1 et ATPase6.



FIGURE 36 – Induction de CDBmt suite à différents temps de traitement avec la doxycycline Les cellules PstI sont traitées à la doxycycline pendant différents temps (2h, 1h, 30min, 10min et 5 min) et l'ADNmt est analysé par Southern Blot juste après induction (pistes 3 à 7) ou 5h après induction (pistes 8 à 11). Un traitement de 12h a aussi été réalisé et l'ADNmt a été analysé juste après induction (piste 3'). Tous les échantillons d'ADN sont digérés BamHI avant d'être déposés sur gel, afin de linéariser l'ADNmt. L'ADN de cellules HEK WT digéré *in vitro* par PstI sert de contrôle (piste 2). La bande à 16.6kb correspond à l'ADNmt intact. La digestion totale de l'ADNmt par PstI entraine l'apparition de 3 bandes (9225pb, 5234pb et 2110pb), mais des digestions partielles sont aussi observées (14459pb et 7344pb).

Chapitre 1

Génération de cassures double-brin mitochondriales

1.1 Induction de cassures double-brin mitochondriales

Pour comprendre quelles stratégies les cellules mettent en place pour gérer les CDB des génomes mitochondriaux nous avons tout d'abord dû créer un système générant des CDB uniquement dans la mitochondrie. Pour cela nous avons modifié un système existant qui consiste en l'enzyme de restriction PstI humanisée et fusionnée à la séquence d'adressage mitochondrial du gène humain COX8 (Srivastava, 2005). Nous avons établi une lignée cellulaire humaine (Flp-In TREx 293, modifiée à partir de la lignée HEK293) stable polyclonale exprimant de manière inductible cette enzyme, grâce à un promoteur régulé par la doxycycline. L'ADNmt possède deux sites de restriction PstI, et, après induction, l'enzyme coupe donc l'ADNmt en deux endroits, comme schématisé sur la **Figure 35**. Nous avons choisi ce système car il permet un ciblage de l'ADNmt, de plus il est inductible et nous permet donc de suivre les cellules pendant une période de récupération après la génération de cassures.

Ce système a ensuite été testé afin de vérifier la génération de CDBmt. Nous avons ainsi visualisé l'état de l'ADNmt par Southern Blot sur de l'ADN extrait de cellules non induites et de cellules traitées avec $1\mu g/mL$ de doxycycline pendant différents temps d'induction. À chaque fois nous utilisons comme contrôle des cellules Flp-In TREx 293 non transfectées, que j'appellerai HEK WT. Ainsi nous avons pu observer que même en l'absence d'induction par la doxycycline des cassures basales de l'ADNmt sont détectées, le promoteur du système Tet-on n'est pas totalement réprimé en l'absence de l'inducteur (**Figure 36**, piste 11 et 1'). La génération de CDBmt après traitement par la doxycycline est efficace. Nous observons une bande correspondant à l'ADNmt intact (16569pb) et des bandes correspondant à la digestion totale (9225pb, 5234pb et 2110pb) et partielle (14459pb et 7344pb) de l'ADNmt par PstI, montrant que notre système est fonctionnel. Nous pouvons détecter l'augmentation du nombre de cassures dès 2h d'induction et une quasi disparition de l'ADNmt après 12h d'induction (**Figure 36**). Nous avons donc choisi d'utiliser 2h de traitement par la doxycycline pour le reste de nos expériences, car nous observons alors une digestion presque complète de l'ADNmt et les différents fragments sont encore détectables.

Nous avons isolé différents clones HEK293 PstI à partir de la population polyclonale non induite et analysé leurs comportements sans induction, dans le but de s'affranchir de l'expression basale observée sur la population cellulaire totale. Cependant les cinq clones analysés présentaient le même profil d'ADNmt et environ le même ratio ADNmt coupé/ ADNmt intact sans doxycycline (**Figure S1**). Nous avons quand même choisi de travailler sur une population



FIGURE 37 – Etude des CDB nucléaires lors de l'induction de l'expression de PstI Niveau d'un marqueur de CDB nucléaires γ -H2AX dans des cellules HEK WT irradiées aux rayons X à des doses de 0, 5 et 15Gy, ainsi que dans des cellules HEK PstI non induites et traitées pendant 2h à la doxycycline. 20 μ g de protéines cellulaires totales ont été analysés par Western Blot avec un anticorps dirigé contre l'histone H2AX phosphorylée (γ -H2AX). Tubuline : témoin de charge.



FIGURE 38 – Evolution du système PstI au cours du temps

Les profils d'ADNmt après induction de PstI pendant 2h, 12h ou 24h ont été comparés par Southern Blot pour le même lot de cellules monoclonales, non congelées depuis la transfection, avec 4 mois d'intervalle. L'induction des CDBmt est plus faible au cours du temps. L'ADNmt est linéarisé par BamHI avant dépôt sur gel, l'ADN de cellules HEK WT digéré *in vitro* par PstI sert de contrôle.

clonale, le clone 4, après avoir vérifié que son comportement correspondait à celui de la population totale après induction. Ainsi toutes les cellules ont initialement le même génotype et la variabilité entre elles est réduite.

L'adressage mitochondrial de l'enzyme de restriction PstI a aussi été vérifié en détectant la présence éventuelle de CDB au niveau nucléaire après induction du système par la doxycycline. L'une des premières étapes de la signalisation des CDB nucléaires est la phosphorylation du variant d'histone H2AX, alors noté γ -H2AX, aux alentours des cassures. Nous avons donc analysé la présence de ce marqueur par Western Blot sur des cellules HEK WT soumises à différentes doses d'irradiation aux rayons X afin d'avoir des témoins positifs de cassures nucléaires, et des cellules HEK PstI non induites et induites 2h sans temps de récupération (+0) (**Figure 37**). L'irradiation, notamment avec une dose de 15Gy, entraine effectivement une augmentation du signal γ -H2AX, confirmant la génération de cassures d'ADN nucléaire, mais les cellules HEK PstI avant ou après induction ont un signal γ -H2AX faible. Ce résultat indique que le système cible efficacement l'ADNmt, sans affecter le génome nucléaire. La réponse cellulaire que nous allons observer sera donc bien spécifique aux CDBmt.

1.2 Evolution du système au cours du temps

Au cours du temps nous avons observé que le même temps d'induction générait moins de CDBmt pour le même lot de cellules HEK PstI clonales, non congelées depuis la transfection (**Figure 38**). En effet si l'on compare les pistes n°3 des deux Southern Blots on observe que la bande correspondant à l'ADNmt intact est plus intense en mars 2015, ce qui signifie que peut que la fuite est beaucoup moins importante en mars 2015 qu'en novembre 2014. De façon similaire on observe, pour les pistes induites, que la génération de cassures est beaucoup plus faible en mars 2015. Par exemple, pour le même temps d'induction de 2h, le ratio ADNmt intact/ fragment 5234pb est environ 6 fois plus élevé en mars 2015 qu'en novembre 2014 (quantification approximative réalisée avec le logiciel Quantity One).

Face à ce constat, des cellules d'une lignée clonale congelées en décembre 2014 ont été décongelées et amplifiées. Ainsi un grand nombre de lots a pu être congelé à un temps t, afin de travailler sur des cellules dans le même état et obtenir des résultats reproductibles. Nous avons vérifié cette reproductibilité en décongelant plusieurs lots de cellules et en analysant l'état de l'ADNmt sans induction et après deux inductions de 2h et 5h. Comme l'indique la **Figure S2** les profils d'ADNmt sont effectivement semblables entre les deux lots, et cette stratégie nous a permis de nous affranchir de cette dérive du système. La génération de cassures est cependant plus faible que ce que l'on avait pu obtenir auparavant, juste après transfection. Cette situation est un peu plus proche des conditions de cassures auxquelles la cellule est susceptible de faire face naturellement, notamment pour les cellules HEK PstI non induites. Cette expression basale de l'enzyme de restriction peut donc aussi nous permettre d'évaluer la réponse cellulaire à des CDBmt modérées. Pour la suite du projet de nouvelles cellules étaient décongelées avant chaque expérience et au maximum tous les 1-2 mois.

Nous n'avons pas exploré les raisons de cette évolution, qui entraine une extinction partielle de l'expression de PstI. Une hypothèse est liée à la construction du système et à la méthode de sélection : En effet les cellules sont continuellement sous pression de sélection avec des antibiotiques, le gène de résistance à la blasticidine étant situé près du gène codant pour le répresseur Tet et le gène de résistance à l'hygromycine près du gène codant pour PstI. Cependant ces gènes de résistance sont sous le contrôle de promoteurs différents que les gènes qu'ils permettent de sélectionner. Il serait donc possible que le gène codant pour PstI soit éteint au cours du temps, par exemple par épigénétique, bien que les cellules résistent toujours aux antibiotiques.



FIGURE 39 – Dégradation de l'ADNmt après CDB

(A) Analyse par Southern Blot de cellules HEK293 contrôles (WT) et de cellules transfectées PstI après digestion par BamHI ou BamHI+PstI pour le contrôle. L'expression de PstI a été induite pendant 2h à l'aide de doxycycline et les cellules ont été suivies pendant une période de récupération de 2j. L'ADNmt est linéarisé par BamHI avant dépôt sur gel, l'ADN de cellules HEK WT digéré *in vitro* par PstI sert de contrôle. (B) Quantification du ratio ADNmt/ ADN nucléaire par qPCR dans des cellules PstI non induites ou induites 2h et suivies sur une période de récupération de 3j (ratio ADNmt/ ADN nucléaire normalisé à 1 pour l'échantillon non induit, moyenne +/- erreur standard, n=3).



FIGURE 40 – Expression du transcrit PstI

Quantification des transcrits PstI par qPCR, après normalisation avec l'ARN de référence TBP, sur des cellules HEK293 WT et des cellules PstI avant et après induction (moyenne +/- erreur standard, n=3).

Chapitre 2

Réponses cellulaires aux CDBmt

2.1 Dégradation de l'ADNmt

2.1.1 Elimination de l'ADNmt lésé

Pour étudier l'effet des CDB sur l'ADNmt nous avons induit l'expression de PstI pendant 2h et suivi les cellules pendant une période de récupération de 3j après induction. Suite à l'induction de PstI et à la génération de CDBmt, l'ADNmt est tout d'abord digéré au niveau des deux sites de restriction PstI, puis rapidement dégradé. Il ne reste que quelques molécules d'ADNmt intactes après 1-3j de récupération, comme le montrent les résultats de Southern Blot (**Figure 39A**) et de qPCR (**Figure 39B**). La qPCR permet de quantifier cette perte d'ADNmt : Après 2h d'induction de PstI (+0) il y a déjà une diminution d'environ 50% du ratio ADNmt/ ADN nucléaire, et 8h après induction (+8h) il reste moins de 10% de la quantité d'ADNmt initiale.

Nous nous sommes demandé si cette dégradation rapide d'ADNmt suite à l'induction de PstI pourrait venir de l'action de l'enzyme de restriction elle-même, qui agirait de manière aspécifique une fois tous les sites de restriction coupés. Pour tester cette hypothèse nous avons suivi la quantité de transcrits PstI produits pendant les phases d'induction et de récupération précoce par RT-qPCR (Figure 40). Le traitement de 2h à la doxycycline augmente très fortement la production de transcrits PstI par rapport à la situation basale (plus de 30 fois plus), mais ces transcrits continuent d'être présents pendant la phase de récupération, jusqu'à 3 japrès l'enlèvement de la doxycycline du milieu cellulaire. La dégradation d'ADNmt pourrait donc provenir de coupures aspécifiques de l'enzyme PstI qui est produite tout au long de cette phase précoce de dégradation. Cependant nous avons écarté cette hypothèse en testant in vitro l'activité non spécifique de PstI sur des plasmides comportant 1 ou 0 site de restriction PstI (Figure S3). Après 24h d'incubation avec l'enzyme, PstI étant de nouveau ajouté après 5h et 22h d'incubation, on observe une linéarisation de l'ADN pour le substrat comportant un site PstI mais pas de dégradation aspécifique. PstI n'a donc pas d'activité aspécifique in vitro, dans son tampon d'activité. Bien que cette expérience soit très loin des conditions cellulaires, il apparait peu probable que PstI ait une forte activité aspécifique ex vivo, où le milieu cellulaire est plus complexe et l'ADNmt empaquetté dans les nucléoides, et soit responsable de la dégradation d'ADNmt lésé observée après induction des CDBmt.

La phase précoce de réponse aux CDBmt consiste donc en une dégradation rapide des molécules lésées, qui s'effectue en moins d'un jour après l'induction des dommages.



FIGURE 41 – Impact des CDBmt et de la dégradation d'ADNmt sur la structure mitochondriale (A) Niveaux de protéines mitochondriales avant et après induction de l'expression de PstI par traitement de 2h avec la doxycycline. $20\mu g$ de protéines cellulaires totales ont été analysés par Western Blot avec des anticorps dirigés contre une protéine de la matrice mitochondriale (PDH) et une protéine de la membrane mitochondriale externe (TOMM20). Tubuline : témoin de charge. (B) Analyse de la quantité de mitochondries par cytométrie en flux avant induction et pendant la période de récupération (moyenne +/- erreur standard, n=3). * P < 0.05, ** P < 0.005 versus cellules PstI non induites (test de Student).



FIGURE 42 – Impact des CDBmt sur le réseau mitochondrial

Les cellules HEK WT et PstI, non induites ou à différents temps post-induction, ont été observées au microscope en épifluorescence après marquage des mitochondries à l'aide du MitoTracker Red CMXRos (rouge) et du noyau au DAPI (bleu). Des mitochondries « boules » sont visibles post-induction. Barres d'échelle : 10μ m.

2.1.2 Impacts mitochondrial et cellulaire

Structure mitochondriale intacte

Nous avons ensuite évalué l'impact de cette perte d'ADNmt sur le réseau mitochondrial. En effet plusieurs études suggèrent que des dommages de l'ADNmt entrainent un défaut de la chaine respiratoire, une augmentation de la production de ROS et éventuellement une chute du potentiel membranaire mitochondrial. L'intégrité de la structure mitochondriale a tout d'abord été vérifiée par Western Blot en quantifiant deux marqueurs mitochondriaux, une protéine matricielle, PDH (pyruvate déhydrogénase), et une protéine de la membrane externe, TOMM20 (translocase of outer membrane). Comme le montre la Figure 41A les niveaux de ces deux marqueurs restent inchangés jusqu'à 3j après induction des CDBmt, alors que l'ADNmt a presque complètement disparu moins d'1j après induction (Figure 39), et même jusqu'à 6j post-induction (Figure S4). De manière complémentaire nous avons estimé la quantité de mitochondries par cytométrie en flux, après incubation des cellules avec le MitoTracker Green, un marqueur qui s'accumule dans les mitochondries indépendamment du potentiel membranaire (ThermoFisher Scientific). Celle-ci ne diminue pas au cours de la phase de récupération, elle augmente même légèrement après 3j de récupération et relativement fortement si nous poussons l'analyse plus loin dans la phase de récupération, à 6j post-induction (Figure 41B). Cette augmentation pourrait être due à un phénomène de compensation : pour faire face à la perte d'ADNmt la cellule augmenterait la biogenèse mitochondriale. Cependant ce résultat pourrait aussi être dû aux conditions expérimentales. En effet les échantillons 6j post-induction comportaient moins de cellules que les autres, mais tous les échantillons ont été marqués avec la même concentration de MitoTracker Green. Il est donc possible que les mitochondries des cellules 6j post-induction, moins nombreuses, aient absorbé plus de marqueur, si la concentration de celuici est limitante. Il est aussi possible que le MitoTracker Green ait coloré d'autres organites de manière aspécifique, ce qui peut arriver d'après le fabricant lorsque sa concentration est trop élevée.

L'étude du potentiel membranaire mitochondrial a été réalisée par microscopie en épifluorescence à l'aide du marqueur Mitotracker Red CMXRos, qui, contrairement au Mitotracker Green, s'accumule uniquement dans les mitochondries polarisées. Des cellules incubées avec un découplant mitochondrial, le CCCP, ont servi de témoins dans cette expérience, permettant de visualiser l'aspect diffus du MitoTracker Red CMXRos en cas de dépolarisation. La **Figure 42** indique que les mitochondries restent polarisées jusqu'à 3j post-induction. À 2-3j post-induction le réseau mitochondrial apparait légèrement plus fragmenté qu'avant induction, avec quelques mitochondries gonflées qui ont un signal plus fort. Cette faible modification du réseau est cependant postérieure à la dégradation de l'ADNmt.

Ces résultats indiquent que la perte d'ADNmt observée suite à l'induction de CDBmt ne provoque pas une destruction de la structure mitochondriale et une réduction du potentiel membranaire.

Effet sur les protéines impliquées dans la maintenance de l'ADNmt

Nous nous sommes aussi demandé si la disparition de l'ADNmt suite à l'induction de CDB impactait les protéines impliquées dans la maintenance de l'ADNmt. La variation d'expression des principales protéines de la réplication mitochondriale, POL γ et TWINKLE, ainsi que du facteur de transcription TFAM a été évaluée par Western Blot jusqu'à 3j post-induction (**Figure 43**, *page suivante*), et jusqu'à 6j post-induction (**Figure S4**). De manière surprenante les quantités des différentes protéines de la réplication ne varient pas significativement au cours



FIGURE 43 – Impact des CDBmt sur l'expression de protéines de la maintenance de l'ADNmt Niveaux de protéines mitochondriales impliquées dans la maintenance de l'ADNmt avant et après induction de l'expression de PstI par traitement de 2h avec la doxycycline. $20\mu g$ de protéines cellulaires totales ont été analysés par Western Blot avec des anticorps dirigés contre l'hélicase TWINKLE, la polymérase POL γ A et TFAM. H3 : témoin de charge.



FIGURE 44 – Visualisation de la perte d'ADNmt par microscopie en épifluorescence Des cellules HEK PstI non induites ou 1j post-induction ont été marquées par le MitoTracker (rouge), le DAPI (bleu) et un anticorps anti-TFAM (vert). Barres d'échelle : 10μ m.



FIGURE 45 – Analyse de la mitophagie et de l'autophagie après génération de CDBmt Niveaux de marqueurs de la mitophagie (PINK1) et de l'autophagie (LC3-II) avant et après induction de l'expression de PstI par traitement de 2h avec la doxycycline. $20\mu g$ de protéines cellulaires totales ont été analysés par Western Blot, les cellules traitées au CCCP, un découplant mitochondrial, constituent des témoins positifs de la mitophagie et de l'autophagie. de la phase précoce de dégradation, la légère diminution d'expression de POL γ entre 2h et 8h post-induction n'étant pas reproductible. Par contre la réduction drastique en ADNmt est accompagnée par une perte de l'expression de TFAM, avec une cinétique similaire (environ -60% après 4h de récupération et -85% après 8h). Ce résultat est cohérent avec d'autres données de la littérature qui indiquent que la quantité de TFAM est fortement corrélée à la quantité d'ADNmt (Kanki *et al.*, 2004) (Ekstrand, 2004).

Cette disparition de TFAM a ensuite été confirmée par une expérience d'immunofluorescence, permettant de visualiser la protéine avant et après induction. Les cellules ont aussi été incubées avec le MitoTracker Red CMXRos avant fixation. La **Figure 44** montre que tous les échantillons possèdent des mitochondries correctement polarisées, mais qu'à partir d'1j postinduction certaines cellules n'expriment plus TFAM. La forte diminution du signal TFAM en Western Blot n'est donc pas due à une baisse homogène de son expression dans toutes les cellules HEK PstI induites mais plutôt à une perte d'expression cellule dépendante. Ce résultat est surprenant puisqu'une population cellulaire clonale est utilisée et que toutes les cellules devraient donc avoir le même comportement. Une expérience d'immunofluorescence similaire, utilisant cette fois un anticorps primaire dirigé directement contre l'ADN simple et double-brin a aussi été réalisée. Là encore, si on regarde le signal mitochondrial uniquement, seulement une partie des cellules sont marquées par l'anticorps anti-ADN, confirmant que la majorité des cellules ont perdu leur ADNmt après CDB (**Figure S5**).

Les protéines de la réplication ne varient pas en quantité au cours de la phase de dégradation, mais cela ne contredit pas l'hypothèse d'une amplification de la réplication suite à la diminution d'ADNmt subie par les cellules après induction des CDB. En effet les protéines peuvent être initialement présentes en quantité suffisante et la régulation entrainant une amplification de la réplication peut se faire à un autre niveau. La quantité de TFAM est corrélée à la quantité d'ADNmt et cette protéine apparait être un bon marqueur de l'ADNmt puisque les images obtenues par immunofluorescence avec un anticorps anti TFAM ou anti ADN sont similaires.

Implication des processus de mitophagie-autophagie

Plusieurs études ont montré que l'élimination de l'ADNmt suite à des dommages était liée à une dégradation de l'organite entièrement, par des processus d'autophagie ou de mitophagie (Busch et al., 2014) (Diot et al., 2016). Bien que nous ayons déjà montré que la structure mitochondriale n'est pas altérée pendant la phase de dégradation précoce de l'ADNmt (Figure 41), nous avons voulu vérifier que ces processus ne sont pas mis en jeu. Nous avons donc estimé les quantités d'un marqueur d'autophagie (LC3) et de mitophagie (PINK1) par Western Blot, sur des échantillons protéiques de cellules induites ou non (Figure 45). Nous avons de nouveau utilisé un traitement avec le CCCP (18h, $10\mu M$ ou $20\mu M$) comme témoin positif, en effet ce découplant mitochondrial est connu pour induire les processus d'autophagie (Chen et al., 2013) et de mitophagie (Narendra et al., 2008). Sur le Western Blot de LC3 la bande avec un poids moléculaire apparent plus important correspond à LC3-I et la bande plus basse à LC3-II, la forme qui s'associe à la membrane de l'autophagosome. En effet, bien que LC3-II provienne de la conjugaison de LC3-I avec le lipide phosphatidylethanolamine et que sa masse moléculaire est donc plus élevée, son hydrophobicité la fait migrer plus rapidement sur un gel SDS-PAGE. Cette figure nous indique que la forme LC3-I est largement majoritaire dans les cellules où des CDBmt ont été induites, et qu'il n'y a donc pas induction de l'autophagie, contrairement aux témoins positifs traités CCCP, où le ratio LC3-II/ LC3-I est beaucoup plus élevé. De la même manière la protéine PINK1, indicatrice de la mitophagie, reste faiblement exprimée alors que l'ADNmt est dégradé, alors qu'elle est bien surexprimée dans les témoins positifs.



FIGURE 46 – Etude de la survie cellulaire après induction de CDBmt L'apoptose a été analysée par cytométrie en flux sur des cellules HEK PstI non induites ou après induction. Les cellules PstI non induites traitées staurosporine (STS) sont un témoin positif de l'apoptose (moyenne +/- erreur standard, n=3). * P > 0.05 versus cellules PstI non induites (test de Student).



FIGURE 47 – Impact des CDBmt sur les protéines de la chaine respiratoire

Niveaux de différents sous unités des complexes respiratoires avant et après induction de l'expression de PstI par traitement de 2h avec la doxycycline. $20\mu g$ de protéines cellulaires totales ont été analysés par Western Blot, avec un cocktail d'anticorps ciblant des sous unités codées par l'ADNmt (COX2 : complexe IV) et par le génome nucléaire (ATP5a : complexe V; UQCR2 : complexe III; SDHB : complexe II; NDUFB8 : complexe I) et avec un anticorps ciblant la sous unité NDUFA8 du complexe I. H3 : témoin de charge.

La dégradation de l'ADNmt après génération de CDBmt n'est donc pas due aux processus d'autophagie ou de mitophagie, puisqu'après 3j de récupération les protéines impliquées dans ces mécanismes ne sont pas activées, alors que l'ADNmt est déjà éliminé après 1j de récupération.

Survie cellulaire après déplétion en ADNmt

Un autre mécanisme possible pour l'élimination de l'ADNmt endommagé est l'élimination de la cellule entière, par apoptose. En effet nous avons pu observer que suite à l'induction de CDBmt la croissance cellulaire était plus faible (Figure S6), pouvant indiquer soit un ralentissement de la multiplication cellulaire, soit une multiplication cellulaire normale mais accompagnée d'une augmentation de la mort cellulaire. Il était improbable que le processus d'apoptose soit entièrement responsable de l'élimination de l'ADNmt lésé puisque des images d'immunofluorescence montrent des cellules avec des mitochondries et un noyau intacts alors qu'elles ont perdu l'expression de TFAM et n'ont plus de signal ADNmt (Figure 44), mais il pouvait y participer. L'étude de l'apoptose a été réalisée par cytométrie en flux, en utilisant l'iodure de propidium (PI) et l'annexine V couplée à un fluorophore, AlexaFluor488, comme marqueurs. Le PI ne peut entrer dans les cellules et se fixer à l'ADN nucléaire que lorsque l'intégrité de la membrane est perdue, c'est-à-dire pour des cellules nécrotiques ou en apoptose tardive. L'annexine V, elle, se lie aux phosphatidylsérines qui sont externalisées précocement lors du processus d'apoptose. Nous avons utilisé des cellules traitées à la staurosporine comme témoins positifs de l'apoptose. Ce composé inhibe les kinases en se fixant sur leur site de liaison pour l'ATP, il est très cytotoxique. La Figure 46 montre que le pourcentage de cellules vivantes ne varie pas significativement après induction de PstI, pendant la phase de dégradation d'ADNmt, alors qu'il diminue pour les cellules traitées staurosporine. De la même manière la proportion des cellules en apoptose précoce ou tardive et des cellules mortes augmente significativement uniquement pour les cellules où l'apoptose a été induite par traitement avec la staurosporine, et pas après induction de CDBmt.

La génération de CDBmt n'influe donc pas sur la survie cellulaire, elle ne déclenche pas l'induction de l'apoptose. Les cellules survivent avec très peu d'ADNmt et un mécanisme spécifique, qui ne passe ni par la destruction de l'organite, ni par celle de la cellule, permet d'éliminer l'ADNmt endommagé.

2.1.3 Fonctionnement de la chaine respiratoire

La survie cellulaire et la structure mitochondriale ne sont pas affectées par la dégradation de l'ADNmt. Cependant ce génome code les gènes de sous unités de la chaine respiratoire et la phosphorylation oxydative devrait être perturbée par cette perte d'ADN. Pour vérifier cette hypothèse nous avons tout d'abord quantifié l'expression protéique d'une sous unité de chaque complexe respiratoire, par Western Blot. Nous avons utilisé un anticorps ciblant NDUFA9 (complexe I) et un cocktail d'anticorps ciblant à la fois cinq protéines impliquées dans la chaine respiratoire : NDUFB8 (complexe I), SDHB (II), UQCR2 (III), COX2 (IV) et ATP5a (V). Ainsi les sous unités COX2, codée par le génome mitochondrial, ainsi que NDUFB8 et UQCR2, codées par le génome nucléaire, sont beaucoup plus faiblement exprimées à partir de 2j post-induction (**Figure 47**). Le délai entre la perte quasi totale d'ADNmt, à partir de 1j post-induction, et la diminution d'expression de ces protéines pourrait s'expliquer par leur stabilité. De manière surprenante les autres sous unités étudiées, codées par le génome nucléaire, ne varient pas pendant la phase de dégradation de l'ADNmt, et restent exprimées à leur niveau initial jusqu'à 3j post-induction, même NDUFA9 qui appartient au même complexe que NDUFB8.



FIGURE 48 – Ré-amplification d'ADNmt intact après la dégradation d'ADNmt suite à des CDBmt

(A) Visualisation du profil d'ADNmt par Southern Blot avant et après 2h d'induction et sur une période de 27j post-induction. De l'ADNmt intact est ré-amplifié à partir de 6-13j post-induction, et l'expression basale de PstI n'est plus visible, comparé aux cellules PstI non induites (dernière piste). L'ADNmt est linéarisé par BamHI avant dépôt sur gel. (B) Quantification du ratio ADNmt/ ADN nucléaire par qPCR dans des cellules PstI non induites ou induites 2h et suivies sur une période de récupération de 27j (ratio ADNmt/ ADN nucléaire normalisé à 1 pour l'échantillon non induit, moyenne, n=2).

Nous avons ensuite mesuré l'activité du complexe IV, par dosage de l'activité cytochrome c oxydase. Les résultats sont cohérents avec le Western Blot puisque les cellules ayant subi l'induction des CDBmt et une récupération de 3j présentent une activité significativement diminuée, presque cinq fois plus faible que les cellules non induites (Figure 49). La génération de CDBmt entraine une perte d'ADNmt et donc du gène COX2. La protéine n'est plus présente à 2j post-induction d'après le Western Blot et l'activité du complexe IV est donc abolie, comme vérifié à 3j post-induction. La phosphorylation oxydative semble affectée par la diminution drastique de la quantité d'ADNmt liée à l'induction de CDBmt et une analyse de l'activité des autres complexes pourrait permettre de le vérifier. Cependant les mitochondries arrivent à maintenir leur potentiel membranaire, comme vu Figure 42.

2.2 Ré-amplification de l'ADNmt

2.2.1 Ré-amplification de molécules d'ADNmt intactes

Dans un deuxième temps nous avons poussé plus loin l'analyse de la réponse cellulaire aux CDBmt, en allongeant la phase de récupération pour suivre le devenir des quelques molécules d'ADNmt restantes. Ainsi la perte d'ADNmt est suivie par une lente ré-amplification d'ADNmt intact, comme l'attestent les résultats de Southern Blot et qPCR (**Figure 48**). Cette réamplification commence environ 6 jours après la génération des CDBmt (piste 6 **Figure 48A**), et augmente fortement jusqu'à 27j post-induction (piste 11 **Figure 48A**). À ce moment le ratio ADNmt/ ADN nucléaire est plus de deux fois supérieur au ratio avant induction (Comparaison des points « Non induit » et « +27j » **Figure 48B**). D'autres expériences de Southern Blots ont montré que la quantité d'ADNmt diminue ensuite lentement jusqu'à revenir approximativement au niveau avant induction après une quarantaine de jours de récupération. Là encore nous pouvons imaginer qu'un processus de compensation se met en place, avec une augmentation de la quantité d'ADNmt pour rétablir l'expression des protéines perdues de la chaine respiratoire et restaurer son bon fonctionnement. Nous n'observons plus de digestions basales totales ou partielles lors de cette ré-amplification, mais uniquement des molécules d'ADNmt intactes.



FIGURE 49 – Mesure de l'activité du complexe IV après dégradation de l'ADNmt L'activité du complexe IV a été mesurée par dosage de l'activité cytochrome c oxydase, sur cellules PstI non induites et 3j post-induction (moyenne +/- erreur standard, n=3). ** P > 0.005 versus cellules PstI non induites (test de Student).



FIGURE 50 – Etude de la réplication lors de la phase de dégradation et de ré-amplification de l'ADNmt suite à des CDB

(A) Visualisation de l'ADN 7S par Southern Blot avant et après induction des CDBmt, jusqu'à 9j postinduction. Les signaux à la taille de l'ADNmt sont saturés pour les pistes 1, 2, 6 et 7. (B) Southern Blot correspondant aux mêmes échantillons en hybridant avec les sondes mitochondriales (nouvelle membrane). L'ADNmt est linéarisé par BamHI avant dépôt sur gel, l'ADN de cellules HEK WT digéré *in vitro* par PstI sert de contrôle. Nous avons cherché à savoir si cette ré-amplification d'ADNmt intact est liée à une augmentation de la réplication en étudiant la quantité d'ADN 7S après induction des CDBmt et jusqu'à 9j post-induction, par Southern Blot (**Figure 50**).

Nous pouvons effectivement détecter une augmentation de l'ADN 7S à partir de 3-6j postinduction, mais le rapport ADN 7S/ ADNmt ne varie pas sensiblement. De plus le signal ADNmt intact est saturé et les dépôts d'ADN totaux ne sont pas tout à fait homogènes, ce qui ne permet pas de conclure sur l'augmentation de la réplication. Nous pouvons aussi remarquer que la diminution de l'ADN 7S est importante juste après la génération de CDBmt, alors que l'ADNmt coupé est encore présent (Figure 50A, piste 3 et 50B, piste 4). Nous avons aussi étudié la réplication par microscopie, en utilisant un analogue de la thymidine, l'EdU, qui est incorporé à l'ADN nouvellement synthétisé et ensuite marqué grâce à une réaction clic par le fluorophore Alexa Fluor 488 (Click-iT EdU Alexa Fluor 488 Imaging Kit, Invitrogen). Cependant le signal nucléaire est très fort dans les cellules qui se sont répliquées ce qui gêne pour distinguer le signal mitochondrial, notamment dans les cellules HEK293 qui ont un cytoplasme relativement resserré autour du noyau. Dans les cellules U2OS, le cytoplasme est plus grand et il est possible d'observer le signal mitochondrial en saturant le signal nucléaire (Figure 51). Pour observer la réplication mitochondriale dans les cellules HEK293 après génération des CDBmt avec cette technique il faudrait d'abord bloquer la réplication nucléaire, par exemple par l'aphidicoline, et éventuellement augmenter le signal EdU (Lentz et al., 2010). Cependant le blocage de la réplication nucléaire risque aussi d'influer sur le comportement des cellules et la réplication mitochondriale. Nous ne pouvons donc pas conclure quant à l'augmentation de la réplication de l'ADNmt suite à la génération de CDBmt.



FIGURE 51 – Visualisation de la réplication de l'ADN

La réplication de l'ADN a été visualisée par microscopie en épifluorescence à l'aide de l'incorporation d'EdU marqué ensuite avec de l'Alexa Fluor 488, sur des cellules U2OS. (A) Observation de cellules avec une excitation faible, visualisation de la réplication nucléaire (B) Observation de cellules où l'ADN nucléaire n'a pas été répliqué avec une excitation forte, visualisation de la réplication mitochondriale (C) Observation de cellules où l'ADN nucléaire a été répliqué avec une excitation forte, visualisation des réplications mitochondriale et nucléaire. Barres d'échelle : 10μ m.



FIGURE 52 – Ré-amplification d'ADNmt après une première induction de PstI et nouvelle induction

(A) Analyse en Southern Blot de cellules HEK WT et HEK PstI. L'expression de PstI est induite 2h à l'aide de doxycycline et les cellules sont suivies pendant 20j. Au 20 ème jour une deuxième induction de l'expression de PstI est réalisée et les cellules sont suivies sur une deuxième période de récupération (notée avec une apostrophe). L'ADNmt est linéarisé par BamHI avant dépôt sur gel, l'ADN de cellules HEK WT digéré *in vitro* par PstI sert de contrôle. (B) Quantification du ratio ADNmt/ ADN nucléaire des cellules HEK PstI avant et après induction de l'expression de PstI, pendant 41 jours après une première induction avec la doxycycline et sur une période de 20j après une deuxième induction réalisée 20j après la première (notée avec une apostrophe) (moyenne +/- erreur standard, n=3).

La phase de dégradation d'ADNmt suite à la génération de CDB est suivie par une augmentation de la quantité de molécules intactes, avec perte de la fuite observée avant induction. Il serait intéressant de pouvoir quantifier la réplication de l'ADNmt pendant cette phase de ré-amplification d'ADNmt intact.

2.2.2 Perte de l'induction de PstI

L'absence de digestions basales totales ou partielles des molécules d'ADNmt ré-amplifiées après CDBmt, observées **Figure 48** pistes 7 à 11, nous a amené à nous demander si l'ADNmt était devenu résistant à PstI ou si l'enzyme n'était tout simplement plus exprimée. Nous avons tout d'abord réalisé une seconde induction de l'expression de PstI, et donc un nouveau traitement de 2h avec la doxycycline, 20j après la première induction, alors que les molécules d'ADNmt ont été ré-amplifiées. La **Figure 52** présente des résultats de Southern Blot et de qPCR et indique que cette seconde induction a un effet beaucoup plus faible que la première : très peu de molécules d'ADNmt sont coupées (**Figure 52 A**, pistes 11-12) et la diminution du ratio ADNmt/ ADN nucléaire est minime (**Figure 52 B**, points « +0h' » et « +2j' »). Ce n'est donc pas seulement la fuite qui est perdue après récupération des cellules pendant une vingtaine de jours, la génération de CDBmt est aussi fortement diminuée.

Nous avons donc quantifié l'expression des transcrits PstI par RT-qPCR lors des deux inductions et pendant les phases de récupération afin d'évaluer l'hypothèse selon laquelle l'expression de PstI serait perdue. D'après la **Figure 53**, l'expression de PstI perdure jusqu'à plus de 3j postinduction, avec un pic à 2j, et est presque abolie à 6j. Cependant lors de la seconde induction (14j après la première) l'expression de PstI est très faible, à peine plus élevée que le niveau basal d'expression observé en l'absence de traitement doxycycline avant la première induction.

Nous pouvons donc en conclure que l'apparente « résistance » de l'ADNmt nouvellement amplifié à PstI provient en fait d'une extinction de l'expression de PstI. Le processus impliqué pourrait être le même que celui responsable de la dérive du système au cours du temps expliqué au 1.2, accéléré à cause de la pression de sélection générée par une première génération de CDBmt.



FIGURE 53 – Expression du transcrit PstI après une deuxième induction Quantification des transcrits PstI par qPCR, après normalisation avec l'ARN de référence TBP, sur des cellules HEK WT et des cellules PstI avant et après induction, puis pendant une deuxième période de récupération après une nouvelle induction réalisée 14j après la première (notée avec une astérique) (moyenne +/- erreur standard, n=3).



FIGURE 54 – Analyse des sites de restriction PstI par digestion in vitro

Quelques centaines de bases autour des sites de restriction PstI d'ADN total de cellules HEK WT, de cellules non induites et de cellules 27j post-induction sont amplifiées par PCR puis digérées *in vitro* par l'enzyme de restriction PstI. Les fragments sont déposés sur gel d'agarose après digestion (gel de gauche). L'ADN non digéré, dont la taille correspond au fragment complet, est prélevé (encadré rouge), de nouveau amplifié par PCR et digéré *in vitro*. Les produits de digestion sont de nouveau déposés sur gel (gel de droite). La figure présente les résultats pour le site PstI situé dans COX1, l'analyse a aussi été faite sur le deuxième site et donne les mêmes résultats.

Séquence Pstl	С		т	G	С	Α	G
Mutation	C/A	С/Т	т/с	G/A	С/Т	A/G	G/A
HEK WT	0%	0.04%	0.02%	0.06%	0.02%	0.04%	0.05%
HEK Pstl	0.01%	0%	0%	0.02%	0.04%	0.86%	0.01%

Tableau 8 – Séquençage NGS du site de restriction PstI situé dans le gène COX1 Environ 100pb autour du site de restriction PstI ont été séquencées par NGS, sur de l'ADN issu de cellules HEK WT et de l'ADN de cellules HEK PstI 13j post-induction. Seule une mutation ponctuelle dans le site PstI, une transition A-G, est augmentée de manière significative dans les cellules PstI comparé aux cellules WT (bleu).

2.2.3 Analyse des sites de restriction après ré-amplification

Suite à la génération massive de CDBmt

Nos résultats indiquent que l'ADNmt est principalement dégradé suite à la génération massive de CDBmt, cependant cela n'exclut pas que quelques molécules lésées soient réparées. En effet certaines études indiquent que les mécanismes de NHEJ (Bacman *et al.*, 2009) ou MMEJ (Tadi *et al.*, 2015) sont actifs dans les mitochondries. Nous avons donc analysé les sites de restriction PstI après génération de CDBmt et ré-amplification à la recherche de mutations dues à des erreurs de réparation, car la réparation par NHEJ peut par exemple introduire des délétions dans l'ADN. En effet, lors du C-NHEJ, les extrémités de la CDB sont en partie dégradées avant d'être ligaturées et, lors du MMEJ, de microhomologies de séquences sont appariées de chaque côté de la CDB, et l'ADN entre ces microhomologies est éliminé. L'analyse des sites de restriction PstI et des éventuelles mutations ne nous permet cependant pas de conclure quant à la présence de HR mitochondriale, car la recombinaison homologue, inter-moléculaire, est un mécanisme de réparation fidèle qui n'introduit pas de mutations.

Tout d'abord nous avons testé la résistance de l'ADNmt ré-amplifié à la digestion par PstI *in vitro*. Pour cela des fragments autour des sites de restriction sont amplifiés par PCR, pour de l'ADN extrait de cellules sauvages, de cellules PstI non induites et de cellules PstI après 27j post-induction. Ces fragments sont ensuite digérés *in vitro* par PstI et migrés sur gel d'agarose (**Figure 54**). Une faible bande correspondant à de l'ADNmt intact est visible pour les dépôts d'ADN de cellules transfectées, induites ou non, alors qu'elle est quasiment absente pour les cellules sauvages. Cet ADN « résistant » est prélevé pour chaque échantillon et amplifié de nouveau par PCR. Il est de la même manière digéré *in vitro* par PstI et migré sur gel d'agarose. Le résultat est alors plus frappant : la bande correspondant à de l'ADNmt intact est très faible pour l'ADN issu de cellules sauvages mais intense pour les cellules transfectées PstI. Le ratio ADNmt intact/ ADNmt coupé est environ 4 fois plus élevé pour les cellules HEK PstI 27j post-induction (quantification à l'aide du logiciel Quantity One). De l'ADNmt « résistant » à la coupure PstI est donc sélectionné après transfection et après induction des CDBmt.

Cette résistance à PstI peut s'expliquer par des mutations dans le site de restriction PstI, qui peuvent soit être dues à un polymorphisme présent dans la population d'ADNmt originelle et amplifié, soit à une réparation non fidèle des cassures. Le séquençage haut débit nous a permis d'analyser ces deux possibilités. Nous avons fait séquencer environ 100pb autour des deux sites de restriction PstI. Pour le site PstI situé dans le gène COX1 nous avons pu analyser environ 40000 molécules d'ADNmt de cellules PstI récoltées 13j post-induction comparées à environ 40000 d'ADNmt de cellules sauvages. Dans les cellules PstI, où l'ADNmt a donc été dégradé puis ré-amplifié, aucune mutation dans le site de restriction non déjà présente dans les cellules sauvages n'a été détectée. Aucune délétion n'a également été décelée. Ces arguments vont contre l'hypothèse d'une réparation des CDBmt dans notre système par un mécanisme comme le NHEJ ou le MMEJ. Cependant la possibilité d'une réparation fidèle, par exemple par recombinaison homologue, ne peut pas être écartée par cette expérience. Une seule mutation ponctuelle dans le site PstI, une transition A-G, est augmentée de manière significative dans les cellules PstI 13j post-induction comparé aux cellules sauvages (Tableau 9). Cette mutation est plus de 20 fois plus abondante dans les cellules PstI que dans les cellules sauvages (0.86% contre 0.04%). Elle reste cependant faiblement abondante, et indique un léger changement de l'hétéroplasmie, probablement sous la pression de sélection qu'exerce PstI. La transition A-G induit une mutation silencieuse et n'a donc pas d'impact au niveau protéique, de plus ce poly-

Pstl- COX1	Séquence Pstl	С	т	G	С	Α	G
	Mutation			G/A		A/G	
	HEK Pstl			6%		29%	
Pstl- ATP6	Séquence Pstl	С	т	G	С	Α	G
	Mutation	C/A					
	HEK Pstl	10%					

Tableau 9 – Séquençage des sites de restriction PstI par clonage de l'ADN dans des plasmides et transfection de bactéries

L'ADN de cellules HEK PstI non induites, cultivées plus d'un mois sans doxycycline et partiellement résistantes à PstI a été analysé. Environ 100pb autour des sites de restriction PstI ont été séquencées après clonage de l'ADN dans des plasmides, transfection de bactéries pour amplifier les molécules individuellement et extraction de l'ADN plasmidique d'une quarantaine de colonies avant séquençage. Plusieurs mutations ponctuelles dans les sites PstI ont une hétéroplasmie élevée (bleu). morphisme est référencé dans GenBank (Par exemple GenBank ID FJ951521.1, KM245132.1 et KY409757.1). Pour le deuxième site de restriction PstI, situé dans le gène ATP6, le séquençage a moins bien fonctionné et seulement environ 300 molécules d'ADNmt issues de cellules PstI récoltées 13j post-induction comparées à environ 300 d'ADNmt de cellules sauvages ont été séquencées. Aucune différence significative n'a été détectée entre les deux échantillons, peut-être à cause du faible nombre de molécules séquencées.

Les deux sites de restriction PstI ont aussi été analysés de manière plus grossière, sur des cellules PstI non induites, cultivées depuis plus d'un mois et partiellement résistantes aux cassures (**Figure 38**). Un fragment d'environ 100pb autour de chaque site de restriction a été amplifié par PCR, puis cloné dans le vecteur pCRII-TOPO TA, et des bactéries ont ensuite été transformées avec ces plasmides. Une quarantaine de colonies ont été amplifiées puis l'ADN plasmidique a été extrait et séquencé (**Tableau 9**). Pour le site PstI situé dans le gène COX1, seulement 65% des colonies, et donc des molécules d'ADNmt initiales en supposant qu'une bactérie est transformée avec un seul plasmide comportant un fragment d'ADNmt, ont un site de restriction intact, alors que 29% présentent une transition A-G (déjà détectée par NGS) et 6% une transition G-A. Pour le site PstI situé dans le gène ATP6, 10% des colonies présentent une transversion C-A dans le site PstI. Ce site de restriction n'a pas été séquencé pour les cellules sauvages, ce qui ne permet pas d'affirmer que la proportion de cette mutation augmente après cassures mais il est probable que ce soit encore un polymorphisme. En effet les mécanismes de réparation non fidèles induisent rarement des mutations ponctuelles et de plus il serait improbable que toutes les erreurs de réparation mènent à une unique mutation.

Dans le cas d'une génération massive de CDBmt dans notre système, nous n'avons pas pu détecter de micro-délétions suggérant une réparation par NHEJ ou MMEJ. La seule différence entre la population d'ADNmt dégradée après cassures puis ré-amplifiée par rapport à la population sauvage, qui n'a jamais été soumise aux cassures, est une légère augmentation de la proportion de molécules d'ADNmt hétéroplasmiques résistantes à PstI. Une expérience plus complète est en cours, afin d'étudier la réponse des cellules à une génération limitée de CDBmt, sous une pression de sélection plus importante. Pour cela des cellules HEK PstI ont été cultivées pendant 3 mois, en l'absence de doxycycline. L'expression basale de PstI permet la génération de CDBmt en quantité limitée, ce qui est plus proche des conditions physiologiques. Une partie des cellules a également été cultivée en milieu galactose, afin que la production d'énergie grâce à la phosphorylation oxydative soit nécessaire pour la survie cellulaire. Cette condition ajoute une pression de sélection car les cellules dont la chaine respiratoire est fonctionnelle, et donc l'ADNmt intact, sont avantagées. Nous allons ensuite étudier l'ADNmt des différents échantillons, par Southern Blot et séquençage.



FIGURE 55 - Variation des niveaux des nucléases mitochondriales après génération de CDBmt (A) Analyse protéique des niveaux des nucléases mitochondriales sur cellules HEK WT et PstI avant et après induction de l'expression de PstI par traitement de 2h avec la doxycycline. $20\mu g$ de protéines cellulaires totales ont été analysés par Western Blot, avec des anticorps ciblant EXOG, ENDOG, MGME1 et FEN1. H3 : témoin de charge. (B) Quantification des transcrits des nucléases mitochondriales sur cellules HEK PstI avant et après induction de l'expression de PstI par traitement de 2h avec la doxycycline, à l'aide d'amorces ciblant ENDOG, EXOG, MGME1 et DNA2, après normalisation avec l'ARN de référence TBP (n=1 pour ENDOG, EXOG et MGME1, moyenne +/- erreur standard, n=4 pour DNA2).

Chapitre 3

Acteurs de la maintenance de l'ADNmt après CDB

3.1 Approche protéines candidates

3.1.1 Nucléases mitochondriales

Localisation

La dégradation de l'ADNmt lésé observée suite à l'induction de CDBmt semble passer par un mécanisme spécifique qui n'implique pas la dégradation de l'organite ou de la cellule dans son ensemble. Des protéines, probablement avec une activité nucléase, doivent donc être responsables de ce processus, et nous avons cherché à les identifier.

Cinq nucléases sont connues pour avoir une localisation mitochondriale : EXOG, ENDOG, MGME1, FEN1 et DNA2, bien que la localisation de FEN1 et DNA2 reste controversée. Elles ont déjà des rôles en partie définis dans la mitochondrie, par exemple dans l'élimination des amorces ARN lors de la réplication (DNA2, FEN1, MGME1), dans l'élimination de l'extrémité sortante lors de la réparation des lésions d'ADN par le mécanisme de LP-BER (DNA2, FEN1, EXOG) ou dans l'apoptose (ENDOG). Cependant cela n'exclut pas qu'elles puissent aussi être impliquées dans la dégradation d'ADNmt suite à des cassures double-brin.

Nous avons tout d'abord étudié la localisation mitochondriale de ces protéines dans notre type cellulaire, par fractionnement subcellulaire puis Western Blots, pour les nucléases MGME1, EXOG et FEN1 (**Figure S7**). L'anticorps DNA2 ne donnant pas de résultats fiables nous n'avons pas pu vérifier la localisation de cette protéine. Comme indiqué dans la littérature nous avons bien retrouvé MGME1 et EXOG dans les mitochondries des cellules HEK293, faisant d'elles de bonnes candidates pour la dégradation de l'ADNmt suite à des CDB. La protéine FEN1 est principalement cytosolique mais on la retrouve aussi dans la fraction mitochondriale.

Rôle dans la maintenance de l'ADNmt suite à des CDBs

Pour étudier le rôle potentiel de ces nucléases dans l'élimination de l'ADNmt lésé suite à des CDB nous avons commencé par suivre leurs variations au cours de la phase précoce de dégradation, après induction de l'expression de PstI. Ces variations ont été suivies au niveau protéique par Western Blots pour MGME1, ENDOG, EXOG et FEN1 et au niveau des transcrits par RTqPCR pour MGME1, DNA2, ENDOG et EXOG (**Figure 55**). Au niveau protéique aucune augmentation significative n'a été détectée après induction des cassures, la quantité de MGME1 semble même légèrement diminuer à partir de 4h post-induction. L'expression des



FIGURE 56 – SiRNA des gènes de nucléases mitochondriales : effet sur la dégradation rapide de l'ADNmt

(A) Analyse par Southern Blot de cellules HEK WT et HEK PstI. Les cellules ont été cultivées en présence ou en absence d'un mélange de siRNA ciblant EXOG et/ ou ENDOG. Trois jours après la transfection avec les siRNA les cellules sont traitées par la doxycycline pendant 2h pour induire l'expression de PstI et le profil de l'ADNmt a été examiné avant induction et pendant la période de récupération. (B), (C) et (D) Analyse similaire au (A) avec des siRNA ciblant MGME1, DNA2 ou FEN1 respectivement.
(E) Analyse similaire au (A) avec des siRNA ciblant les cinq nucléases simultanément, par une double transfection siRNA réalisée à 2 jours d'intervalle. L'ADNmt est linéarisé par BamHI avant dépôt sur gel, l'ADN de cellules HEK WT digéré *in vitro* par PstI sert de contrôle.

transcrits des nucléases ne varie pas non plus significativement durant la phase de dégradation de l'ADNmt (n=1). Cependant l'expression basale de ces protéines pourrait suffire pour éliminer l'ADNmt lésé en cas de cassures, surtout que cette dégradation a lieu très rapidement, laissant peu de temps pour la synthèse de nouvelles protéines. L'augmentation de l'expression des nucléases n'est donc pas une condition nécessaire pour juger de leur implication dans le processus de dégradation de l'ADNmt.

Pour continuer d'évaluer le rôle de ces protéines dans la maintenance de l'ADNmt suite à des CDBs nous avons réalisé des expériences RNAi-induction : Nous avons bloqué l'expression de chaque gène en transfectant les cellules avec les siRNA (small interfering RNA) correspondants. Nous avons ensuite généré des CDBmt 3j après transfection et observé les profils d'ADNmt pendant la phase de dégradation par Southern Blot. À chaque fois nous avons comparé le profil d'ADNmt des cellules transfectées siRNA au profil d'ADNmt de cellules PstI sans siRNA. La Figure 56 montre les profils obtenus en empêchant séparément l'expression de chaque nucléase. Pour les protéines ENDOG et EXOG, le double siRNA a aussi été réalisé car les deux nucléases sont des paralogues, dérivant de la duplication ancestrale d'un gène de nucléase, ce qui pourrait générer des rôles redondants. L'efficacité des siRNA a été vérifiée par Western Blot ou qPCR (Figure 57). L'expression des différentes protéines ciblées est très fortement diminuée suite à la transfection avec les différents siRNA, d'au moins environ 80% pour ENDOG, EXOG, FEN1 et MGME1. L'efficacité des siRNA ciblant la nucléase DNA2 a, elle, été vérifiée au niveau transcriptionnel, et on observe une diminution d'environ 50% des transcrits. Bien que l'expression de chaque gène soit effectivement fortement diminuée grâce aux siRNA, aucune différence n'est observée entre les profils d'ADNmt de cellules transfectées par siRNA ou non, c'est-à-dire avec ou sans expression de la nucléase candidate.



FIGURE 57 – Efficacité des siRNA ciblant les nucléases mitochondriales

L'efficacité des siRNA ciblant les nucléases mitochondriales après transfection simple a été vérifiée par Western Blot avec des anticorps anti (A) ENDOG et EXOG, (C) FEN1 et (D) MGME1, avec H3 comme témoin de charge, et (B) par RT-qPCR avec un couple d'amorces amplifiant les transcrits DNA2, après normalisation avec l'ARN de référence TBP (moyenne +/- erreur standard, n=3).



FIGURE 58 – Blocage de la réplication nucléaire par traitement avec le ddC Les cellules HEK WT ont été traitées avec différentes concentrations de ddC pendant 24 ou 48h et le ratio ADNmt/ ADN nucléaire a été estimé par qPCR (n=1).



FIGURE 59 – Effet du blocage de POL γ sur la dégradation rapide de l'ADNmt suite à des CDB Analyse par Southern Blot d'ADNmt de cellules HEK WT et HEK PstI. Des cellules HEK PstI ont été traitées, ou non, avec 500 μ M de ddC pendant 1j, puis l'expression de PstI a été induite, ou non, pendant 2h par traitement avec la doxycycline, et les cellules ont été suivies sur une période de récupération de 5h ou 1j. Une image plus exposée du Southern Blot a permis de vérifier qu'aucune différence dans la dégradation de l'ADNmt n'était visible pour les pistes traitées ddC où le signal est faible sur cette image (non montrée). L'ADNmt est linéarisé par BamHI avant dépôt sur gel, l'ADN de cellules HEK WT digéré *in vitro* par PstI sert de contrôle. Une rapide dégradation de l'ADNmt est toujours observée, même après déplétion des nucléases individuellement. Cette élimination de l'ADNmt lésé n'est donc pas effectuée par l'une de ces nucléases seule. Pour éliminer la possibilité d'un rôle redondant entre les différentes protéines nous avons réalisé le knock-down simultané des cinq nucléases, suivi de la même manière par l'induction des CDBmt 3j après transfection et analyse du profil d'ADNmt pendant la phase précoce de dégradation (**Figure 56E**). Cette fois une double transfection siRNA a été réalisée, afin de diminuer au maximum l'expression des différentes protéines. Là encore aucune différence entre les échantillons transfectés RNAi ou non n'a été détectée, la cinétique de dégradation de l'ADNmt est la même que ces nucléases soient exprimées ou non.

Nous pouvons conclure de ces expériences qu'il est très peu probable que les nucléases mitochondriales EXOG, ENDOG, MGME1, FEN1 et DNA2 soient impliquées dans la rapide dégradation de l'ADNmt lésé observée après induction de CDBmt. Cependant, après transfection avec les différents siRNA, nous obtenons une diminution de seulement environ 50% des transcrits pour DNA2 et 80-90% des protéines pour les autres nucléases. Il est possible que la quantité de protéines restantes soit suffisante pour dégrader l'ADNmt, et que l'extinction soit insuffisante pour obtenir un effet visible en Southern Blot.

3.1.2 POL γ

La polymérase mitochondriale POL γ , impliquée dans la réplication et la réparation de l'ADNmt, possède une activité 3'-5' exonucléase, utilisée pour l'élimination des nucléotides mal incorporés lors de la réplication de l'ADNmt (Spelbrink *et al.*, 2000). Cette protéine pourrait donc être impliquée dans la dégradation de l'ADNmt suite à l'induction de CDB.

Nous n'avons pas utilisé de siRNA pour abolir l'expression de cette protéine, car nous pensons qu'une diminution quasi totale de la polymérase responsable de la réplication de l'ADNmt pourrait être trop drastique pour les cellules et que la réponse que nous pourrions observer dans ce cas ne serait pas uniquement lié à la génération de CDBmt. Nous avons donc préféré utiliser un traitement au ddC (didésoxycytidine) qui permet de bloquer la polymérase sur son substrat, ce qui empêche également son activité exonucléase. Le ddC, dont la structure est présentée **Figure S8**, est un terminateur de chaine en 3'. En effet il est ajouté par la polymérase en tant qu'analogue du dCTP, après avoir été métabolisé en ddCTP, et l'absence du groupement –OH sur le pentose empêche l'ajout d'autres nucléotides. POL γ se retrouve donc bloquée sur l'ADN, ce qui l'empêche d'exercer ses activités polymérase et exonucléase. Le traitement de cellules avec du ddC induit donc une déplétion en ADNmt, due à l'absence de réplication de l'ADNmt et à sa dilution lors des divisions cellulaires.

Tout d'abord nous avons mis au point le traitement en faisant plusieurs tests avec différentes concentrations de ddC et différents temps d'incubation, et nous avons mesuré le ratio ADNt/ ADN nucléaire par qPCR. L'objectif était de se placer à une concentration suffisante pour bloquer la majorité des protéines POL γ mais avant que la déplétion en ADNmt soit trop forte et qu'il ne soit donc plus possible d'analyser un profil d'ADN après cassures. La **Figure 58** montre les ratios ADNmt/ ADN nucléaire dans différentes conditions. Nous avons choisi de travailler avec une concentration de 500 μ M de ddC et d'induire les cassures 24h après le début du traitement pour étudier le rôle de POL γ dans la maintenance de l'ADNmt après CDB. Le ddC a aussi été ajouté lors de l'induction avec la doxycycline et lors de la phase de récupération de 1j pour éviter que POL γ soit relâchée de l'ADN. Un contrôle supplémentaire, des cellules HEK PstI non induites traitées au ddC, a été ajouté pour étudier le profil d'ADNmt. Le Southern Blot des différents échantillons (**Figure 59**) ne montre pas de différence sur la cinétique de dégradation de l'ADNmt après cassures que les cellules aient été traitées au ddC ou non. La seule



FIGURE 60 – Localisation des protéines à activité nucléase potentiellement impliquées dans la maintenance de l'ADNmt suite à des CDB

(A) Localisation par immunofluorescence des protéines SND1, DFFB et EXD2. L'ADN nucléaire est marqué par le DAPI (bleu), les mitochondries sont visualisées grâce au MitoTracker Red CMXRos (rouge) et les protéines d'intérêt grâce à un anticorps spécifique détecté par un anticorps secondaire couplé à l'Alexa Fluor 488 (vert). Barres d'échelle : $10\mu m$. (B) Localisation par Western Blot avec des anticorps ciblant EXD2 ou SND1 après fractionnement subcellulaire (dépôts inégaux).

différence est un signal plus faible pour les pistes correspondant aux cellules traitées au ddC, que les CDBmt aient été induites ou non, car la quantité d'ADNmt totale est plus faible. Ceci est dû au blocage de POL γ qui entraine l'arrêt de la réplication mitochondriale et à la dilution de l'ADNmt lors des divisions cellulaires.

L'ADNmt polymérase mitochondriale n'est donc pas non plus responsable de l'élimination de l'ADNmt endommagé par des CDB grâce à son activité exonucléase.

3.1.3 Nucléases potentiellement mitochondriales

Localisation

Puisque les cinq nucléases connues pour être mitochondriales ainsi que POL γ ne sont vraisemblablement pas impliquées dans la dégradation de l'ADNmt induite par des CDB nous avons sélectionné d'autres nucléases candidates qui pourraient potentiellement avoir ce rôle. Nous avons tout d'abord isolé une centaine de protéines humaines identifiées avec les mots clés « nuclease » et « DNase » dans la base de données « Protein » de NCBI, qui regroupe les bases de données PDB, RefSeq et UniProtKB/SwissProt. Les probabilités d'adressage mitochondrial de ces candidates ont été ensuite estimées grâce aux logiciels PSORT II et MitoProt. PSORT II prédit un pourcentage d'adressage dans chaque compartiment et MitoProt recherche les séquences d'adressage mitochondrial et indique spécifiquement la probabilité d'adressage mitochondrial. Trois nucléases à forte probabilité d'adressage mitochondrial avec des rôles intéressants dans le noyau ont été sélectionnées : DFFB, SND1 et EXD2. DFFB est prédite principalement nucléaire (43%) et mitochondriale (39%) d'après PSORT, et a une probabilité d'adressage mitochondrial de 94% avec MitoProt. SND1 est principalement cytosolique d'après PSORT, et seulement à 13% mitochondriale, mais MitoProt indique une probabilité de 82% d'adressage mitochondrial. Enfin, EXD2 est principalement nucléaire d'après PSORT (65%) et à 13% mitochondriale, mais MitoProt indique une probabilité de 69% d'adressage mitochondrial.

Le rôle de ces nucléases a déjà été en partie étudié au niveau nucléaire. DFFB (DNA Fragmentation Factor subunit Beta), aussi appelé CAD (Caspase-activated DNase), a un rôle dans l'apoptose et est la sous unité active de l'hétérodimère DFF. Après activation de DFF par la caspase 3, DFFB déclenche la fragmentation de l'ADN et la condensation de la chromatine (Widłak, 2000). SND1 (Staphylococcal Nuclease and Tudor Domain Containing 1) est une protéine multifonctionnelle qui régule la transcription mais aussi l'épissage, la modification et la stabilité des ARNm ainsi que l'extinction de gènes par interférences ARN. C'est l'un des composants majeurs du complexe RISC (RNA induced silencing complex) (Jariwala *et al.*, 2015). Pour la troisième protéine candidate, EXD2 (Exonuclease 3'-5' Domain Containing 2) il a été montré qu'elle a un rôle dans la recombinaison homologue nucléaire. Elle est recrutée à la chromatine suite à des dommages et interagit avec le complexe MRN, elle est requise pour la résection des CDB (Broderick *et al.*, 2016).

La première étape de l'étude de ces protéines présentant une activité nucléase a été de vérifier leur localisation mitochondriale prédite *in silico*. La localisation a été déterminée par immunofluorescence des protéines d'intérêt et co-marquage avec le MitoTracker Red CMXRos qui montre le réseau mitochondrial et le DAPI qui cible l'ADN nucléaire, sur cellules HEK PstI non induites fixées et perméabilisées. La **Figure 60A** montre que contrairement à nos prévisions *in silico* SND1 est plutôt cytosolique et DFFB disséminée dans toute la cellule, avec un signal nucléaire légèrement plus fort. EXD2 quant à elle s'accumule bien préférentiellement dans les mitochondries puisque les marquages EXD2 et MitoTracker co-localisent. La localisation d'EXD2 et de SND1 a aussi été étudiée par Western Blot après fractionnement sub-cellulaire. Cette technique indique qu'EXD2 est à la fois cytoplasmique et mitochondriale et que SND1 est





FIGURE 61 – siRNA des gènes des protéines SND1, DFFB et EXD2 : effet sur la dégradation rapide de l'ADNmt

(A) Analyse par Southern Blot de cellules HEK WT et HEK PstI. Les cellules ont été cultivées en présence ou en absence de siRNA ciblant SND1 ou DFFB. Une double transfection avec les siRNA a été réalisée, à 3j d'intervalle, et 3j après la deuxième transfection les cellules sont traitées par la doxycycline pendant 2h pour induire l'expression de PstI et le profil de l'ADNmt a été examiné avant induction et pendant la période de récupération. (B) Analyse similaire au (A) avec des siRNA ciblant EXD2, transfection simple des siRNA. L'ADNmt est linéarisé par BamHI avant dépôt sur gel, l'ADN de cellules HEK WT digéré *in vitro* par PstI sert de contrôle.

présente à la fois dans le cytoplasme, les mitochondries et le noyau (**Figure 60B**). Cependant le kit de fractionnement utilisé ne permet pas d'obtenir des mitochondries pures, les fractions mitochondriales peuvent contenir des protéines cytoplasmiques accrochées à la membrane externe, ou des lysosomes, ce qui peut expliquer la différence de localisation observée pour SND1 entre l'immunofluorescence et le Western Blot.

Sur nos trois protéines candidates seulement EXD2 semble être mitochondriale. Cependant la localisation a été étudiée sur des cellules HEK PstI non induites, donc très peu soumises à des CDBmt. Il était donc possible que SND1 et DFFB se relocalisent dans les mitochondries en cas de dommages de l'ADNmt, et nous avons testé cette possibilité en analysant la localisation, toujours par immunofluorescence, sur des cellules HEK PstI juste après induction et après 1j de récupération. Après induction SND1 reste cependant cytosolique et DFFB disséminée dans la cellule, avec une accumulation légèrement plus faible dans le noyau.

Rôle dans la maintenance de l'ADNmt suite à des CDBs

Malgré l'absence de localisation mitochondriale de SND1 et DFFB nous avons toutefois réalisé le même type d'expérience RNAi-induction que précédemment, pour étudier la potentielle implication de SND1, DFFB et EXD2 dans la dégradation de l'ADNmt endommagé par des CDB. De la même manière des CDBmt ont été induites après déplétion de chaque protéine par transfection de siRNA, et le profil d'ADNmt durant la phase de dégradation précoce a été visualisé par Southern Blot (Figure 61). L'efficacité de l'extinction de l'expression des protéines a été verifiée (Figure S9). Là encore aucune différence dans la cinétique d'élimination de l'ADNmt n'était visible, en comparant les cellules exprimant ou non les protéines candidates. Les Southern Blots des expériences de RNAi-induction des protéines SND1 et DFFB ne sont pas très nets mais ils permettent toutefois de voir qu'il n'y a pas de différences importantes avec les dépôts témoins. Ceci ainsi que leur absence de localisation mitochondriale même après induction des CDBmt est suffisant pour juger qu'elles ne sont donc probablement pas impliquées dans le processus de dégradation d'ADNmt. EXD2 n'apparait pas non plus avoir un rôle dans la maintenance de l'ADNmt après CDB. Ainsi il est très peu probable que les trois protéines que nous avions estimé être de bonnes candidates pour la dégradation de l'ADNmt suite à la génération de CDBmt, SND1, DFFB et EXD2, soit responsable de la dégradation d'ADNmt.

EXD2 : Rôle dans la réparation des CDB nucléaires

Nous nous sommes toutefois intéressés un peu plus à EXD2, et notamment à son implication dans la réparation des CDB nucléaires. En effet la localisation très préférentiellement mitochondriale de cette nucléase, d'après nos données d'immunofluorescence (**Figure 60**), apparait peu compatible avec le rôle essentiel de EXD2 dans la recombinaison homologue nucléaire montré par Broderick et al (Broderick *et al.*, 2016).

Cependant il était là encore possible que la nucléase se relocalise dans le noyau en cas de CDB nucléaires, afin d'effectuer la résection des extrémités. Nous avons donc généré une quantité massive de CDB nucléaires, par irradiation aux rayons X sur des cellules HeLa, et nous avons comparé la localisation d'EXD2 entre les cellules non irradiées et les cellules irradiées. Pour vérifier la génération de CDB nucléaires nous avons co-marqué les cellules avec un anticorps primaire dirigé contre γ -H2AX, un marqueur des CDB nucléaires qui sert à signaler les dommages. L'irradiation de cellules HeLa à 13Gy entraine effectivement la génération de nombreuses CDB nucléaires, comme indiqué par l'intensité du signal γ -H2AX dans le noyau des cellules irradiées. Cependant EXD2 reste très fortement mitochondriale, même en cas de


FIGURE 62 – Localisation d'EXD2 après génération de cassures de l'ADN nucléaire Des cellules HeLa ont été soumises ou non à une irradiation aux rayons X, à une dose de 13Gy et ont été observées après marquage par immunofluorescence. L'ADN nucléaire est visualisé grâce au DAPI (bleu), le marqueur de cassures nucléaires γ -H2AX à l'aide d'un anticorps marqué par un anticorps secondaire lié à l'Alexa Fluor 488 (vert) et la protéine EXD2 à l'aide d'un anticorps marqué par un anticorps secondaire lié à l'Alexa Fluor 555 (rouge). Barres d'échelle : $10\mu m$.



FIGURE 63 – Localisation de protéines de la réparation des CDB nucléaires potentiellement mitochondriales par Western Blot

La localisation de protéines de la réparation des CDB nucléaires potentiellement mitochondriales dans des cellules HEK WT et HeLa a été analysée après fractionnement subcellulaire à l'aide d'anticorps ciblant RAD54L, RAD54B, POL μ , RAD6A, RAD6B et TREX1. C : fraction cytoplasmique; M : fraction mitochondriale; N : fraction nucléaire (dépôts inégaux).

cassures elle ne se relocalise pas dans le noyau (**Figure 62**). Son rôle direct dans la recombinaison homologue nucléaire, par résection des extrémités des cassures, est donc remis en question et nécessiterait des analyses supplémentaires.

3.1.4 Protéines potentiellement impliquées dans la réparation mitochondriale

Initialement mon projet de thèse portait sur les mécanismes de réparation de l'ADNmt suite à des CDB et nous avions commencé, en parallèle de l'établissement du modèle de génération de CDBmt avec des cellules transfectées PstI, l'étude de protéines candidates potentiellement impliquées dans la réparation des CDBmt. Cette analyse s'est limitée à l'étude de la localisation mitochondriale de certains facteurs de la réparation des cassures nucléaires, puisque nous n'avons pas pu détecter de réparation dans notre modèle et que nous nous sommes ensuite focalisés sur l'aspect dégradation.

La probabilité d'adressage mitochondrial de 43 protéines décrites impliquées dans la réparation des CDB nucléaires par la littérature a été déterminée avec les logiciels MitoProt et PSORT, et 8 protéines ont été sélectionnées. Pol μ et XRCC4 sont plutôt impliquées dans le NHEJ nucléaire, RAD54 dans la HR et Rad6 dans les deux processus. Trex1 est une DNase dont le rôle dans la réparation des CDB n'est pas clair. La protéine NUDT6 fait partie de la famille des hydrolases Nudix et l'étude des membres mitochondriaux de cette famille a fait l'objet d'un sous projet dans le cadre de ma thèse, l'analyse de la protéine NUDT6 sera donc détaillée partie 3.3.

La localisation de ces protéines a été réalisée par Western Blot après fractionnement subcellulaire (**Figure 63**). L'étude de XRCC4 n'a finalement pas été réalisée en l'absence d'anticorps fiable. La protéine RAD54L, une hélicase DEAD-like, présente un profil de localisation intéressant en Western Blot, en effet elle est présente à la fois dans le cytoplasme et la mitochondrie, avec une masse moléculaire légèrement plus faible, ce qui peut correspondre au clivage d'une séquence d'adressage mitochondrial. L'étude de la localisation a ensuite été réalisée en microscopie sur cellules HeLa par immunofluorescence ou transfection des protéines liées à la GFP. Le **Tableau 10** résume les informations de localisation que nous avons pu obtenir par Western Blot et microscopie.

	Western Blot		Microscopie
	HEK293	HeLa	HeLa
RAD54L	С, М	N?	C?, M?
RAD54B	N	N	N
ΡΟLμ	С, М	C, M, N	C?, M?
RAD6A	M, N	C, M, N?	N
RAD6B	C, M?	M, N?	C, N
TREX1	C?	M, N	С

Tableau 10 – Bilan de la localisation de protéines de la réparation des CDB nucléaires potentiellement mitochondriales par Western Blot et microscopie

C : fraction cytoplasmique; M : fraction mitochondriale; N : fraction nucléaire.



FIGURE 64 – Localisation de protéines de réparation nucléaires par microscopie La localisation par microscopie a été réalisée sur des cellules HeLa. La protéine RAD54L a été visualisée par transfection stable d'un plasmide codant pour RAD54L liée à l'eGFP (vert), co-marquage des mitochondries (rouge). RAD54B a été visualisée par immunofluorescence à l'aide d'un anticorps ciblant la protéine et marquée par un anticorps secondaire couplé à l'Alexa Fluor 488 (vert), co-marquage de l'ADN nucléaire (bleu). POL μ a été visualisée par transfection stable d'un plasmide codant pour POL μ



FIGURE 65 – Représentation graphique des résultats de protéomique

L'intensité du signal de chaque protéine détectée dans les cellules HEK WT lors de l'analyse protéomique des fractions mitochondriales est représentée en fonction de l'intensité du signal de la même protéine dans les cellules HEK PstI non induites. Une valeur arbitraire de 10 est donnée lorsque la protéine n'est pas détectée dans l'une des conditions.

Les images de microscopie acquises pour les protéines RAD54B, RAD54L et POL μ sont présentées **Figure 64**.

Les protéines RAD54L et POL μ semblent mitochondriales même si l'utilisation d'un microscope confocal serait nécessaire pour valider leur colocalisation avec le signal du MitoTracker. L'analyse du rôle de ces protéines au niveau mitochondrial n'a pas été continuée puisque le phénomène majoritaire obtenu dans notre système après génération de CDBmt est une dégradation de l'ADNmt et non une réparation des cassures.

3.2 Approche globale

3.2.1 Protéomique

Une seconde approche a consisté à essayer d'identifier de nouvelles protéines candidates potentiellement impliquées dans la maintenance de l'ADNmt soumis à des CDB de manière plus globale, sans étude préalable de la localisation mitochondriale comme dans la partie précédente. Nous avons ainsi réalisé plusieurs analyses protéomiques par spectrométrie de masse comparant la condition sauvage à la condition où les cellules sont soumises à des CDBmt après induction de PstI.

Un premier essai a permis d'analyser des fractions mitochondriales de cellules HEK WT et HEK PstI non induites (**Figure S10**), en utilisant une HPLC nano débit couplée à un spectromètre de masse ayant une source nanoelectrospray. Environ 2800 protéines ont été identifiées, dont les principales protéines de la maintenance de l'ADNmt (POL γ , TFAM, TWINKLE, mtSSB, TFB1/2M, POLRMT, FEN1...), ce qui indique que l'analyse a une bonne profondeur. Le ratio de l'intensité du signal dans la condition sauvage et dans la condition PstI pour chaque protéine donne une idée des protéines dont la quantité mitochondriale varie sous l'effet de CDBmt dues à l'expression basale de PstI. Cependant aucune protéine à activité nucléase ou impliquée dans la maintenance de l'ADN mitochondrial ou nucléaire n'est apparue vraiment sur ou sous exprimée dans les cellules PstI, cette méthode d'analyse protéomique n'étant pas quantitative et permettant uniquement de repérer les variations d'abondance très importantes (**Figure 65**).

Nous avons donc décidé d'utiliser une méthode quantitative, le SILAC (stable isotope labeling with amino acids in cell culture). Dans cette technique les cellules des différentes conditions sont cultivées dans des milieux contenants différents isotopes d'acides aminés. Les différentes populations cellulaires sont alors mélangées dans des proportions égales et analysées par spectrométrie de masse. Les peptides chimiquement identiques mais de compositions en isotopes différentes sont différenciées par le spectromètre de masse grâce à leurs masses. Les ratios d'intensités pour ces peptides reflètent les ratios d'abondance entre les conditions des protéines correspondantes. Nous avons réalisé trois analyses protéomiques avec différentes populations cellulaires : HEK WT + HEK PstI toutes deux non traitées doxycycline; HEK WT non traités PstI + HEK PstI traitées doxycycline pendant 5h et enfin HEK WT et HEK PstI toutes deux traitées doxycycline pendant 5h. Ces analyses ont donné entre 1700 et 2400 protéines, mais peu de protéines de la maintenance de l'ADNmt ont été détectées. Par exemple POL γ , TWINKLE et TFB1/2M sont absentes de ces analyses. La profondeur est donc diminuée et le grand nombre de protéines identifiées rend difficile l'isolation de protéines candidates potentiellement impliquées dans la maintenance de l'ADNmt suite à des CDBs. Ce fichier nous a cependant aidé à choisir les protéines à activité nucléase potentiellement mitochondriales que nous avons étudiées, SND1, DFFB et EXD2 (cf 3.1.3), car elles étaient présentes dans la liste, donc vraisemblablement mitochondriales.

Nous avons donc décidé de réaliser l'analyse protéomique non pas de fractions mitochondriales mais de mitoplastes. En effet les fractions mitochondriales peuvent contenir des protéines cytoplasmiques accrochées aux membranes, ou des lysosomes car le kit sépare essentiellement le noyau, le cytoplasme et les organites, et le grand nombre de protéines détectées peut noyer le signal des protéines qui nous intéressent. La préparation de mitoplastes par centrifugations différentielles et ultra centrifugation a été faite sur des cellules HEK WT et HEK PstI induites + 12h cultivées dans des milieux appropriés pour faire de la protéomique quantitative par SILAC. Nous avons cependant pu isoler peu de matériel et la pureté de la fraction n'a pas pu être vérifiée par Western Blot. Après analyse protéomique environ 400 protéines ont pu être détectées, avec un fort enrichissement en protéines mitochondriales puisque plus d'un tiers sont étiquetées mitochondriales. La purification semble donc avoir fonctionné, mais la concentration de l'échantillon était trop faible et les différences entre les deux conditions sont faibles et peu significatives. De plus plusieurs protéines de la maintenance de l'ADNmt n'ont pas été détectées (POL γ , TWINKLE, TFB1/2M). L'expression de la protéine TFAM apparait bien être réduite après induction des CDBmt, puisque le ratio sauvage/ PstI 12h post-induction de cette protéine vaut 0.675, ce qui valide en partie la méthode. Une seule candidate nucléase que nous avons étudiée se trouve dans la liste de protéines identifiées, SND1, mais elle est présente dans les mêmes proportions entre les deux conditions. Nous avions cependant localisé cette protéine plutôt au niveau cytoplasmique par immunofluorescence et observation au microscope (3.1.1).

Les différentes expériences de protéomique, visant à détecter des protéines potentiellement impliquées dans la dégradation de l'ADNmt lésé par des CDB, ne nous ont pas permis d'identifier de nouvelles candidates.

3.2.2 Crible RNAi

En plus de la protéomique nous avons commencé à mettre en place une nouvelle méthode d'analyse globale, toujours dans le but d'identifier les protéines impliquées dans l'élimination de l'ADNmt après CDB. Cette approche se base sur un crible RNAi, que nous mettons tout d'abord au point avec une banque d'environ 80 gènes, principalement des nucléases nucléaires (librairie de siRNA sur mesure avec 4 siRNA ciblant chaque gène, Chery-pick siRNA library plate, Dharmacon). Ce projet est réalisé en collaboration avec le laboratoire du Pr. Maria Fal-kenberg à l'université de Göteborg, Suède, et notamment avec la postdoc Xie Xie.

Le principe de ce test est d'éteindre l'expression du gène cible sur des cellules HEK293 PsI, puis d'induire les CDBmt par traitement avec la doxycycline et d'observer la présence de TFAM en immunofluorescence 1j post-induction (cf **Figure 44**). Si le niveau de TFAM est le même pour un puits traité siRNA et pour le puits contrôle cela signifie que le gène éteint n'est pas responsable de la dégradation de l'ADNmt suite à des CDB, en tous cas à lui seul. Si au contraire le signal TFAM du puits traité siRNA est plus élevé que pour le puits contrôle cela signifie que l'ADNmt a été moins dégradé et donc que le gène éteint est impliqué dans l'élimination d'ADNmt. Nous avons ajouté dans notre banque de siRNA quelques gènes contrôles de la maintenance de l'ADNmt, comme POL γ , TWINKLE et bien entendu TFAM. Leur extinction doit mener à une diminution forte de la quantité d'ADNmt et donc du signal TFAM, comparé aux cellules contrôles HEK PstI 1j post-induction, même si celles-ci ont déjà un signal TFAM faible après génération des CDBmt et récupération pendant 1j.

Nous avions prévu de réaliser ce crible dans des plaques 96 puits noires à fond en verre (Nunc MicroWell 96-Well Optical-Bottom Plates with Coverglass Base, Thermo Scientific) afin d'obtenir une bonne qualité d'image lors de l'observation au microscope manuel ou automatique. Cependant nous avons dû faire face à un problème technique, en effet les cellules



Nombre de cellules analysées/ puits

FIGURE 66 – Test crible RNAi

Une librairie de siRNA ciblant 80 gènes codant pour des nucléaises nucléaires ainsi que des gènes contrôles a été utilisée lors de ce test, sur des cellules HEK PstI. 41 puits/ 96 étaient exploitables. L'expression de PstI a été induite par traitement de 2h avec la doxycycline 3j après transfection siRNA, sauf pour certains puits témoins non induits et non transfectés siRNA (No dox). Le rapport des intensités de fluorescence de TFAM, après marquage par immunofluorescence, et du DAPI a été mesuré à l'aide d'un microscope automatique (en bleu) ainsi que le pourcentage de cellules exprimant TFAM (en orange). Les gènes dont les siRNA correspondants semblent augmenter le ratio d'intensités de fluorescence et/ ou le pourcentage de cellules positives au marquage TFAM sont encadrés en jaune et ceux qui semblent les diminuer en violet. Non-target : siRNA ne ciblant aucun gène ; No 1st : cellules non incubées avec l'anticorps primaire ciblant TFAM lors du marquage d'immunofluorescence. (Expérience réalisée par Xie Xie)



FIGURE 67 - Vérification manuelle du test crible RNAi

Les puits sur ou sous exprimant TFAM comparé au contrôle transfecté par un siRNA ne ciblant aucun gène dans l'expérience de la **Figure 66** ont été de nouveau analysés, cette fois manuellement, par comptage des cellules exprimant TFAM avec un microscope en épifluorescence classique. Ce comptage a été réalisé à deux reprises (bleu et orange). Les chiffres indiqués pour chaque point correspondent au nombre de cellules analysées pour chaque puits et chaque comptage. (Expérience réalisée par Xie Xie) HEK293 sont semi adhérentes et adhèrent très mal à la surface en verre des plaques.

La première étape de la mise au point du crible est donc l'optimisation de l'adhérence des cellules, en recouvrant le fond des plaques de poly-L-lysine (PLL) ou en utilisant des plaques à fond plastique de qualité suffisante pour la microscopie. Nous avons comparé les ratios d'intensité de fluorescence TFAM/ DAPI entre des plaques à fond en verre, en verre recouvert de PLL ou en plastique, sur des cellules HEK293 WT, après transfection ou non avec un siRNA ciblant TFAM (**Figure S11**). Les puits ayant été transfectés avec des cellules diluées dans le milieu OptiMEM, remplacé par du DMEM après 5h d'incubation, ont perdu beaucoup de cellules durant ce changement de milieu pour les plaques en verre, et les cellules effectivement transfectées par le siRNA ont pu se détacher préférentiellement. Les ratios d'intensité de fluorescence sont donc peu cohérents, sauf pour les plaques à fond plastique, dont les cellules se détachent beaucoup moins. Les réglages du microscope automatique de la plateforme d'imagerie de l'université de Göteborg ayant été réalisés avec la plaque à fond en verre nous avons cependant décidé de continuer les tests avec un fond en verre recouvert de PLL. Nous avons éliminé au maximum les étapes de lavages et décidé de diluer les cellules dans du DMEM lors de la transfection des siRNA, pour éviter l'étape de changement de milieu.

Un deuxième problème a nécessité des modifications du protocole. En effet nous avons remarqué que l'intensité du signal TFAM était dépendante du nombre de cellules marquées, et elle n'était donc pas fiable pour comparer deux puits qui ne comportent pas le même nombre de cellules. Par exemple un puits avec peu de cellules présente un ratio d'intensités TFAM/ DAPI plus élevé, alors que la seule différence entre les puits est la densité cellulaire (**Figure S12**). Ce constat nous a amené à fixer un seuil et éliminer de notre analyse les puits avec moins de 100 cellules. Nous avons aussi pensé que la concentration en anticorps, primaires ou secondaires, devait être limitante, et nous avons fait plusieurs essais avec différentes concentrations, pour finir par choisir une dilution d'anticorps primaire 1 :50 et d'anticorps secondaire 1 :250.

Nous avons enfin réalisé un premier test de crible RNAi sur notre librairie, avec les ajustements du protocole discutés précédemment. Seulement 41 puits sur 96 contenaient assez de cellules pour une mesure des intensités de fluorescence fiable, ce qui montre que l'adhérence des cellules nécessite encore d'être optimisée. Deux paramètres ont été évalués par un microscope automatique pour ce crible test : le ratio d'intensités de fluorescence TFAM/ DAPI mais aussi le pourcentage de cellules exprimant TFAM (Figure 66). Ces deux paramètres varient assez similairement, ce qui indique que nous avons réussi relativement bien à nous affranchir du problème de dépendance entre l'intensité du signal TFAM et le nombre de cellules (indiqué en abscisse du graphique Figure 66). Différents puits contrôles ont été utilisés : cellules transfectées par un siRNA non ciblé (non-target), non transfectées siRNA et non traitées doxycycline (no dox), et non incubées avec l'anticorps primaire lors de l'étape de marquage (no 1st). Leurs ratios d'intensités de fluorescence et de pourcentages de cellules positives à TFAM sont cohérents. Lors de ce crible test quelques siRNA semblent augmenter le pourcentage de cellules exprimant TFAM (encadrés en jaune Figure 66), et les protéines correspondantes pourraient donc être impliquées dans la dégradation d'ADNmt après CDB, alors que d'autres siRNA semblent le diminuer (encadrés en violet Figure 66). Ce pourcentage a été de nouveau évalué au microscope en observant des images manuellement, pour certains puits où il était augmenté ou diminué d'après l'analyse au microscope automatique (Figure 67). Les puits siRNA DFFB, ZRANB3, RAD51C et TATDN1 apparaissent effectivement avoir un pourcentage de cellules exprimant TFAM légèrement plus élevé que le contrôle siRNA non ciblé. Si ce résultat est confirmé lors de nouveaux cribles il pourra être intéressant d'étudier individuellement le rôle de ces protéines dans la maintenance suite à des CDBmt. La protéine DFFB est impliquée dans l'apoptose, ZRANB3 est une endonucléase avec une activité hélicase qui intervient lors



FIGURE 68 – Localisation de NUDT6 en microscopie

Des cellules HeLa ont été transfectées avec un plasmide codant pour la protéine NUDT6 liée à l'eGFP (vert) et ont été observées en microscopie. Le MitoTracker Red CMXRos (rouge) permet de vérifier la colocalisation de NUDT6 avec les mitochondries pour les cellules transfectées de manière stable. Barres d'échelle : 10μ m.





La localisation de NUDT19 a été étudiée par immunofluorescence avec un anticorps ciblant NUDT19 marqué par un anticorps secondaire lié à l'Alexa Fluor 488 (vert) et co-marquage des mitochondries (rouge) et de l'ADN nucléaire (bleu) dans les cellules HAP1 et HEK293. Elle a aussi été étudiée par transfection transitoire avec un plasmide codant pour la protéine liée à l'eGFP (vert) et co-marquage des mitochondries (rouge) dans les cellules HeLa. Barres d'échelle : 10μ m.

du blocage de la fourche de réplication nucléaire, RAD51C joue un rôle dans la recombinaison homologue nucléaire et TATDN1 est probablement une désoxyribonucléase. Cependant le pourcentage de cellules exprimant TFAM dans les puits transfectés par ces siRNA n'atteint pas le pourcentage du puits non traité doxycycline, ce qui signifie qu'une partie de l'ADNmt est toujours éliminé, suggérant que plusieurs protéines pourraient être impliquées dans la dégradation d'ADNmt lésé.

3.3 Potentiel rôle protecteur des Nudix : NUDT6 et NUDT19

Les Nudix sont une famille de protéines qui catalysent l'hydrolyse de nucléosides diphosphates liés à un autre groupement. Au niveau nucléaire NUDT1, aussi appelée MTH1, permet l'assainissement du réservoir de nucléotides en hydrolysant les nucléotides puriques oxydés. Elle a donc un rôle protecteur en empêchant l'incorporation de ces nucléotides modifiés dans l'ADN lors de la réplication. Certains membres de la famille Nudix, NUDT6 et NUDT19, ont un fort pourcentage d'adressage mitochondrial et nous avons décidé d'étudier le rôle de ces protéines. En effet les mitochondries sont le siège de la phosphorylation oxydative, qui produit de nombreux ROS, et il est donc possible qu'un système permette de contrer l'oxydation des nucléotides libres dans ce compartiment, comme dans le noyau. Les Nudix mitochondriales n'ont probablement pas directement un rôle dans la maintenance de l'intégrité de l'ADNmt suite à des CDB, mais elles pourraient avoir un rôle protecteur en empêchant la génération de certaines de ces cassures. En effet, si des nucléotides modifiés libres sont incorporés dans l'ADNmt lors de la réplication, des mécanismes de réparation peuvent être déclenchés pour éliminer la lésion, notamment à l'aide du BER. Or l'un des intermédiaires de réparation dans ce processus est un ADN possédant une cassure simple-brin. Si, pour une raison ou une autre, la réparation n'est pas correctement continuée, cette cassure simple-brin peut évoluer en CDB. L'assainissement du réservoir mitochondrial de nucléotides oxydés pourrait donc diminuer la génération de CDBmt. Le rôle de NUDT6 a surtout été décrit au niveau transcriptionnel, car NUDT6, aussi appelé GFG, est l'anti-sens du FGF-2 (fibroblast growth factor 2). Le transcrit NUDT6 permet ainsi de réguler l'expression du FGF, et impacte le cycle cellulaire (Baguma-Nibasheka et al., 2012; McEachern et Murphy, 2014). NUDT19 quant à elle possède une activité décapping des ARNm (Song et al., 2013) et une activité acyl-CoA diphosphatase dans le péroxysome (Ofman et al., 2006).

3.3.1 Localisation

La première étape de notre étude des Nudix NUDT6 et NUDT19 a été la vérification de leur localisation mitochondriale, qui a été réalisée par microscopie en épifluorescence.

Nous n'avons pas réussi à avoir des résultats fiables avec différents anticorps anti-NUDT6, sur plusieurs lignées cellulaires (HEK293, HeLa, HAP1). Nous avons donc établi la localisation de la protéine uniquement par transfections transitoire et stable de cellules HeLa avec un plasmide codant pour le cDNA de NUDT6 lié à l'eGFP. Les images de microscopie indiquent une colocalisation du marqueur mitochondrial MitoTracker Red CMXRos et de la GFP (**Figure 68**), ce qui valide la localisation mitochondriale de NUDT6.

La localisation de NUDT19 a été réalisée à la fois par immunofluorescence sur des cellules HEK293 WT et HAP1 WT et par transfection transitoire de cellules HeLa avec un plasmide codant pour le gène lié à l'eGFP (**Figure 69**). Toutes les méthodes semblent indiquer une colocalisation du MitoTracker Red CMXRos et de la protéine, validant la localisation mitochondriale de NUDT19.



FIGURE 70 – Activités d'hydrolyse de nucléotides des Nudix NUDT6 et NUDT19 comparées à celle de MTH1

Les activités d'hydrolyse de nucléotides de (A, B) NUDT6 et (C, D) NUDT19 ont été comparées à celle de MTH1, sur des nucléotides non modifiés (A, C) et modifiés (B, D), par dosage spectrophotométrique du phosphate libéré après incubation des enzymes avec les nucléotides. De la pyrophosphatase a été ajoutée dans tous les dosages, sauf en (A), afin d'hydrolyser les molécules de di ou triphosphates qui peuvent être formées sous l'action des protéines. Le signal obtenu sans enzyme a été soustrait aux signaux obtenus avec NUDT6, NUDT19 ou MTH1. ((A, B) n=1; (C,D)moyenne +/- erreur standard, n=3)



FIGURE 71 – Activité d'hydrolyse de nucléotides de NUDT19 comparée à celle de MTH1, en variant le cofacteur et le pH

La mesure d'activité d'hydrolyse a cette fois été réalisée sur un mélange des nucléotides non modifiés (NTPs) ou des désoxynucléotides non modifiés (dNTPs). (A) Différents cofacteurs ont été utilisés, à pH 8, (B) puis différents pH ont été testés, en utilisant soit MgCl2, soit ZnCl2 comme cofacteur (moyenne +/- erreur standard, n=3).

Les deux Nudix NUDT6 et NUDT19 apparaissent donc bien mitochondriales, même si la localisation de la protéine NUDT6 a seulement été réalisée indirectement, par transfection d'une protéine exogène liée à l'eGFP. Nous ne sommes ainsi pas certains que le transcrit NUDT6 soit effectivement traduit en protéine dans les types cellulaires que nous avons testés.

3.3.2 Activité d'hydrolyse des nucléotides

La mesure de l'activité d'hydrolyse de nucléotides a été réalisée par dosage du phosphate libéré lors de l'incubation des différentes protéines recombinantes avec les nucléotides. La protéine recombinante MTH1 a été utilisée comme contrôle pour évaluer les activités de NUDT6 et NUDT19, sur des nucléotides modifiés ou non.

Les activités ont tout d'abord été testées dans des conditions réactionnelles courantes, à pH 8 et avec Mg2+ comme cofacteur, sur différents nucléotides individuellement. De la pyrophosphatase a été ajoutée, sauf pour le test d'activité de NUDT6 sur les nucléotides non modifiés (Figure 70A), afin d'hydrolyser les molécules de di et triphosphate qui peuvent être produites lors de l'hydrolyse des nucléotides par les enzymes. En effet notre méthode de dosage du phosphate quantifie uniquement le phosphate libre sous forme de monophosphate et sans pyrophosphatase il est possible de ne pas détecter une activité d'hydrolyse de nucléotides. Les résultats indiquent une forte activité d'hydrolyse par MTH1 sur la majorité des nucléotides testés, et notamment les nucléotides modifiés, qui sont utilisés à une concentration 10 fois inférieure que les nucléotides non modifiés dans toutes les expériences. Cependant, aucune activité d'hydrolyse par NUDT6 ou NUDT19 n'est détectable, pour aucun nucléotide (Figure 70). Nous avons donc décidé de varier les conditions réactionnelles, pour l'étude de NUDT19 seulement, car le gène NUDT6 pourrait être seulement transcrit et non traduit en protéine, et que la protéine recombinante précipite très facilement, rendant difficile les analyses d'activité. Nous avons donc réalisé la réaction d'hydrolyse avec différents ions divalents en tant que cofacteurs, sur un mélange de nucléotides non modifiés et un mélange de nucléotides modifiés, pour les protéines MTH1 et NUDT19 (Figure 71A). L'activité d'hydrolyse de NUDT19 reste très faible voire nulle quel que soit le cofacteur, et semble très légèrement présente avec le cofacteur Zn2+. Pour MTH1 l'activité est maximale lorsque le cofacteur est Mg2+, ce qui a déjà été démontré. Nous avons ensuite fait varier le pH, en utilisant Mg2+ comme cofacteur, ou Zn2+ pour un test uniquement sur les nucléotides non modifiés (Figure 71B). Là encore aucune activité d'hydrolyse des nucléotides significative n'est détectée pour NUDT19, alors que l'activité de MTH1 est importante, notamment à pH 7.8.

Ainsi il apparait peu probable que NUDT6 ou NUDT19 aient une activité d'hydrolyse des nucléotides leur permettant d'assainir le réservoir mitochondrial de nucléotides.

3.3.3 Etude des cellules KO

Bien que les Nudix NUDT6 et NUDT19 ne possèdent vraisemblablement pas une activité d'hydrolyse des nucléotides permettant d'éviter l'incorporation de nucléotides modifiés dans l'ADN lors de la réplication nous avons cherché à évaluer leurs rôles, notamment en rapport avec leur localisation mitochondriale.

Pour cela nous avons travaillé avec des lignées cellulaires HAP1 KO pour ces protéines. Les cellules HAP1 sont haploïdes et les lignées KO sont établies grâce à la méthode CRISPR, par l'entreprise Horizon Discovery. Nous avons tout d'abord vérifié l'extinction des protéines dans les lignées KO. En l'absence d'anticorps fiable anti-NUDT6 nous avons quantifié les transcrits NUDT6 par qPCR. Les transcrits sont quand même amplifiés pour les cellules HAP1 KO



FIGURE 72 – Quantification de l'ADNmt dans les cellules KO NUDT6 Quantification du ratio ADNmt/ ADN nucléaire dans les cellules HAP1 WT et HAP1 KO NUDT6 par qPCR (moyenne +/- erreur standard, n=3).



FIGURE 73 – Temps de doublement des cellules KO NUDT19 (A) Représentation graphique des temps de doublement des cellules HAP1 WT et HAP1 KO NUDT19 à chaque passage. (B) Moyenne des temps de doublement (moyenne +/- erreur standard, n=14). * P < 0.05 versus cellules HAP1 WT.

NUDT6, même si plus faiblement que pour les cellules HAP1 WT (**Figure S13 A**), cependant les courbes de fusion n'ont pas la même allure pour les deux lignées cellulaires. Après migration des échantillons amplifiés sur gel d'agarose 2%, des bandes de différentes tailles sont détectées (**Figure S13 B**). Les cellules KO NUDT6 expriment un transcrit légèrement plus court, ce qui correspond à la délétion génique de 10pb induite par la méthode CRISPR. La délétion est en partie au niveau de l'une des amorces ce qui peut expliquer que l'amplification des transcrits des cellules KO NUDT6 est plus faible que pour les cellules WT, puisque l'amorce s'hybride moins bien. La protéine NUDT6 est donc probablement non fonctionnelle dans les cellules KO NUDT6, même si son expression dans les cellules WT est aussi discutable. L'extinction de la protéine NUDT19 dans la lignée cellulaire HAP1 KO NUDT19 a quant à elle été vérifiée par Western Blot et immunofluorescence. L'expression de la protéine est bien éteinte dans les cellules KO NUDT19 comparé aux cellules WT (**Figure S14**).

Les cellules HAP1 KO NUDT6 n'ont pas une croissance significativement différente des cellules WT et la quantification du ratio ADNmt/ ADN nucléaire par qPCR indique également une même quantité d'ADNmt entre les cellules KO NUDT6 et WT (Figure 72).

Les cellules HAP1 KO NUDT19 ont été étudiées de manière plus poussée, toujours par comparaison avec les cellules HAP1 WT. Leur croissance est légèrement ralentie, avec un temps de doublement augmenté d'une heure environ (**Figure 73**). La quantité d'ADNmt a également été estimée par qPCR, en quantifiant le ratio ADNmt/ ADN nucléaire, et il apparait que les cellules KO possèdent significativement légèrement moins d'ADNmt que les cellules WT (**Figure 74**).



FIGURE 74 – Quantification de l'ADNmt dans les cellules KO NUDT19 Quantification du ratio ADNmt/ ADN nucléaire dans les cellules HAP1 WT et HAP1 KO NUDT19 par qPCR (moyenne +/- erreur standard, n=12). * P < 0.05 versus cellules HAP1 WT.



FIGURE 75 – Structure et fonctionnement des mitochondries dans les cellules KO NUDT19 (A) Observation du réseau mitochondrial de cellules HAP1 WT et HAP1 KO NUDT19 après marquage en immunofluorescence de TFAM (vert), des mitochondries polarisées à l'aide du MitoTracker Red CMXRos (rouge) et de l'ADN nucléaire avec du DAPI (bleu). Barres d'échelle : 10μ m. (B) L'activité du complexe IV a été mesurée par dosage de l'activité cytochrome c oxydase, sur cellules HAP1 WT et KO NUDT19 (moyenne +/- erreur standard, n=3). (C) Niveaux de protéines mitochondriales dans les cellules HAP1 WT et HAP1 KO NUDT19. 20μ g de protéines cellulaires totales ont été analysés par Western Blot avec des anticorps dirigés contre PDH, TOMM20 et les protéines de la maintenance de l'ADNmt TWINKLE, POL γ et TFAM et un cocktail d'anticorps ciblant différentes sous unités de la chaine respiratoire. Tubuline et H3 : témoins de charge.



FIGURE 76 – Etude de l'apoptose dans les cellules KO NUDT19

L'apoptose a été analysée par cytométrie en flux sur des cellules HAP1 WT et HAP1 KO NUDT19. Les cellules HAP1 WT traitées staurosporine (STS) sont un témoin positif de l'apoptose (moyenne +/- erreur standard, n=3). * P > 0.05 versus cellules HAP1 WT (test de Student).

Au niveau mitochondrial le réseau, visualisé par microscopie en épifluorescence à l'aide du MitoTracker, apparait intact dans les cellules KO, les mitochondries sont correctement polarisées et il n'y a pas de différences entre cellules WT et KO (Figure 75A). La Figure 75C indique aussi que toutes les protéines mitochondriales testées (PDH et TOMM20, les protéines de la maintenance de l'ADNmt TFAM, POL γ et TWINKLE, ainsi qu'une sous unité de chaque complexe respiratoire) sont exprimées de manière similaire dans les deux lignées cellulaires. L'activité du complexe IV, mesurée par dosage de l'activité cytochrome c oxydase, est également la même entre cellules WT et KO (Figure 75B). Des expériences de cytométrie en flux ont révélé que l'apoptose n'est pas affectée par l'absence de NUDT19, seul le contrôle traité staurosporine montre une augmentation de la mort cellulaire (Figure 76). Enfin, l'étude du cycle cellulaire, par cytométrie en flux également, n'est pas reproductible. En effet, certaines expériences ont montré une accumulation des cellules KO NUDT19 en phase G2/M comparé aux cellules WT alors que d'autres ne révèlent aucune différence (Figure 77). Une carence en SVF, afin d'induire le blocage des cellules en phase G1 pour obtenir des cellules contrôles au profil prédictible, n'a pas donné le résultat attendu sur ce type cellulaire, les cellules HAP1 supportent mal l'absence de SVF et meurent rapidement. Nous avons donc essayé de bloquer les cellules en phase G2/M par traitement de 12h avec la démécolcine, ce qui a fonctionné (Figure 29). Cette expérience doit être refaite afin d'évaluer l'éventuel impact de NUDT19 sur le cycle cellulaire.

Pour résumer, l'étude de NUDT6 n'a pas été très poussée car l'expression du gène au niveau protéique n'est pas certaine. L'analyse des cellules KO NUDT19 a quant à elle révélé peu de différences avec les cellules WT pour les paramètres mesurés. Les cellules KO présentent seulement une légère diminution de la quantité d'ADNmt, et peut être une accumulation de cellules en phase G2/M, ce qu'il reste à vérifier. Des expériences supplémentaires sont nécessaires pour déterminer le rôle de NUDT19 au niveau mitochondrial.



FIGURE 77 – Etude du cycle cellulaire dans les cellules KO NUDT19 Le cycle cellulaire a été analysé par cytométrie en flux sur les cellules HAP1 WT et HAP1 KO NUDT19. La figure présente les résultats de deux expériences indépendantes. L'expérience 1 indique une accumulation des cellules KO dans la phase G2/M comparé aux cellules WT alors que l'expérience 2 ne montre pas de différence importante entre les deux conditions

Quatrième partie

Discussion et perspectives



FIGURE 78 – Cassures de l'ADNmt suite à un traitement par la bléomycine

Des cellules embryonnaires de *Drosophiles* (cellules S2) ont été traitées à la bléomycine (75 μ g/ mL) pendant 0 à 30 min, puis l'ADN total a été analysé par Southern Blot à l'aide d'une sonde ciblant l'ADNmt. Expérience : Layal Ishak.

Chapitre 1

Système de génération de CDBmt

1.1 Un système inductible à adressage mitochondrial

Dans ce projet nous avons étudié les conséquences de la production de CDBmt. *In vivo* ces dommages peuvent être produits par blocage de la fourche de réplication, par des sources endogènes ou exogènes tels l'exposition aux ROS générés par la chaine respiratoire, certains virus, les irradiations ionisantes ou ultraviolettes ou par d'autres agents clastogènes. L'étude de la maintenance de l'ADNmt suite à des CDB peut être faite *ex vivo*, par traitement de cellules avec la bléomycine, ou irradiation aux rayons X. Cependant, même si ces deux techniques génèrent effectivement des cassures de l'ADNmt (**Figure 78**), probablement aussi sur cellules humaines (Yeung *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2011), elles induisent aussi d'autres types de dommages, telles les cassures simple-brin pour la bléomycine ou les cassures simple-brin et les oxydations de bases pour les rayons X, et affectent également le génome nucléaire. La réponse observée n'est donc pas spécifique aux CDB ni à l'ADNmt.

Afin de générer spécifiquement des CDB ciblées à l'ADNmt de manière contrôlée nous avons mis au point un système inductible à adressage mitochondrial. Une lignée cellulaire humaine commercialement disponible (Flp-In T-REx 293, des cellules HEK293 modifiées) a été transfectée de manière stable avec l'enzyme de restriction PstI fusionnée à une séquence d'adressage mitochondrial, sous le contrôle d'un promoteur inductible par la doxycycline. Après traitement des cellules avec la doxycycline nous obtenons effectivement des CDB de l'ADNmt, sans atteinte de l'ADN nucléaire, uniquement au niveau des sites de restriction PstI. Cette enzyme avait déjà été utilisée par une autre équipe afin d'étudier la maintenance de l'ADNmt suite à des CDBmt, mais avec une expression constitutive, ce qui avait conduit à une perte presque totale de l'ADNmt pour certains clones cellulaires (Srivastava et Moraes, 2001). L'utilisation d'un système inductible a ainsi l'avantage de permettre un certain contrôle de la quantité de CDBmt générées ainsi que le suivi des cellules pendant une période de récupération.

Cependant, une expression basale de PstI est détectée dans notre système, même en l'absence d'inducteur. La répression non totale du promoteur était présente dans les cinq populations clonales que nous avons testées, même en utilisant un sérum de veau fétal certifié sans tétracycline pour préparer les milieux de culture cellulaire. Grâce à cette fuite nous pouvons étudier l'impact de la génération d'une petite quantité de CDBmt sur les cellules et l'ADNmt, ce qui est plus proche des conditions physiologiques que la génération massive de CDBmt induite par traitement avec la doxycycline, ce qui ne serait pas possible avec un système à expression constitutive. Cependant ce problème d'expression basale du transgène même en l'absence d'inducteur est un problème récurrent du dispositif Tet-On (Meyer-Ficca *et al.*, 2004), et questionne

l'efficacité de ce système inductible dans les cas où une expression totalement réprimée ou activée est nécessaire. Plusieurs optimisations ont été développées pour éliminer ou diminuer cet inconvénient. Il a par exemple été montré que l'ajout d'éléments riches en AU, déstabilisant les ARNm, à l'extrémité 3' non traduites de la construction inductible, peut réduire la fuite (Pham et al., 2008), mais cette technique est très peu utilisée. Une autre amélioration nécessite l'utilisation de silencieux transcriptionnels contrôlés par la tétracycline (tTS) (Zhu et al., 2001). La protéine tTS est une protéine de fusion contenant un répresseur Tet (TetR), tout comme la protéine rtTA, ainsi que le domaine KRAB-AB du répresseur transcriptionnel Kid-1. En l'absence de tétracycline, ou de doxycycline, tTS se lie à la séquence opératrice TetO, en amont du promoteur, et réprime la transcription du transgène. L'ajout de doxycycline permet la dissociation de tTS, puis, à une concentration suffisante, la doxycycline interagit aussi avec la protéine rtTA, qui pourra se lier sur TetO et activer la transcription du gène d'intérêt. Cette modification du système Tet-On permet effectivement de diminuer l'expression basale, à la fois dans des modèles cellulaires et murins. Cependant elle présente aussi un inconvénient : l'expression du transgène est retardée suite à l'ajout de doxycycline. En effet après 6h de traitement doxycycline dans un système comportant cette amélioration, seulement 20-30% de transcrits du gène d'intérêt étaient détectés comparés à un système Tet-On sans amélioration tTS, comportant le même transgène (Mallo et al., 2003). Ce retard est probablement dû au temps nécessaire pour que suffisamment de molécules entrent dans la cellule, permettent la dissociation de tTS et TetO, et se lient ensuite à rtTA, qui pourra enfin lever la répression transcriptionnelle. Etant donné que nous voulions étudier la dégradation de l'ADNmt sur des cinétiques courtes ce système n'aurait probablement pas été très adapté.

1.2 Choix de l'enzyme de restriction

L'ADNmt possède deux sites de restriction PstI. L'expression de PstI suite au traitement avec la doxycycline génère donc deux coupures et la formation de deux molécules partielles d'ADNmt. Cette situation est rare au niveau physiologique, car les CDBmt sont normalement peu nombreuses et la probabilité qu'une même molécule d'ADNmt soit coupée deux fois est faible. De plus la formation de deux molécules pourrait limiter les phénomènes de réparation, si elles s'éloignent trop avant la formation d'une synapse de réparation. L'enzyme PstI crée aussi des cassures à extrémités cohésives, dont les quelques nucléotides sortant peuvent probablement être éliminés simplement par instabilité dans le milieu cellulaire, générant alors des cassures à bords francs.

Nous avons voulu réaliser le même système inductible permettant cette fois l'expression d'une enzyme de restriction possédant un seul site de restriction sur l'ADNmt dans le gène codant pour l'ARNn 16S, l'enzyme PvuII, afin d'évaluer l'impact du nombre de CDBmt par molécule d'ADNmt sur la maintenance de l'ADNmt après cassures. L'enzyme de restriction PvuII crée des cassures à bords francs, contrairement à PstI. Un tag V5 a aussi été ajouté à la construction afin de vérifier plus facilement la localisation et la persistance de la protéine après induction. Le gène de PvuII a été humanisé en changeant certains codons du gène bactérien par des codons synonymes plus courants pour les ribosomes de mammifères, et la même séquence d'adressage mitochondrial que pour le gène de PstI a été ajoutée (celle du gène COX8). Il a ensuite été cloné dans le plasmide pcDNA5. Le séquençage du plasmide a permis de confirmer la séquence du gène PvuII inséré. Des cellules Flp-In TREx 293 ont été co-transfectées avec les plasmides pcDNA5-pvuII et pOG44 selon le même protocole que lors de l'établissement de la lignée HEK PstI, et sélectionnées grâce aux antibiotiques de sélection. L'expression de PvuII a ensuite été testée par induction de 30min à 24h avec la doxycycline et analyse du profil



FIGURE 79 – Test d'induction de CDBmt avec l'enzyme de restriction PvuII suite à différents temps de traitement avec la doxycycline

Les cellules PvuII sont traitées à la doxycycline pendant différents temps (24h, 2h et 30min) et l'ADNmt est analysé par Southern Blot juste après induction. Tous les échantillons d'ADN sont digérés BamHI avant d'être déposés sur gel, afin de linéariser l'ADNmt. L'ADN de cellules HEK WT digéré *in vitro* par PvuII sert de contrôle (piste 2). La bande à 16.6kb correspond à l'ADNmt intact. La digestion totale de l'ADNmt par PvuII entraine l'apparition de 2 bandes (11,6 kb et 5kb).

d'ADNmt par Southern Blot. Aucune coupure de l'ADNmt n'a été détectée, pour aucun temps d'induction, et le tag V5 n'a pas non plus été décelé par analyse Western Blot de cellules PvuII induites (Figure 79). La protéine ne s'exprimait donc pas dans notre système, bien que les cellules soient résistantes aux antibiotiques de sélection et que le gène soit donc probablement inséré dans leur génome. Il est possible que l'humanisation du gène PvuII n'ait pas été correcte et que l'ADNc ne puisse pas être traduit par les ribosomes des cellules humaines.

Nous projetons maintenant de transfecter des cellules Flp-In TREx 293 avec le cDNA de l'enzyme de restriction EagI, qui génère une seule cassure de l'ADNmt à extrémités cohésives, dans le gène codant pour l'ARNr 16S, toujours avec le même système inductible. L'humanisation du gène EagI est en cours.

1.3 Perte de l'expression de PstI

Une première induction de l'expression de PstI avec la doxycycline entraine la coupure de la grande majorité des molécules d'ADNmt, mais, au contraire, une seconde induction après une période de récupération cause très peu de CDBmt, car l'enzyme est très faiblement exprimée au niveau transcriptionnel. Nous n'avons pas étudié les raisons de ce silence transcriptionnel mais une hypothèse est l'extinction épigénétique du gène PstI en réponse aux dommages causés aux cellules lors de la première induction. En effet la génération des CDBmt lors de la première induction a un coût pour les cellules, qui se multiplient alors plus lentement et n'ont plus une phosphorylation oxydative fonctionnelle. L'extinction du gène PstI, par exemple par méthylation de l'ADN, pourrait être un mécanisme de protection. Cette méthylation pourrait être détectée à l'aide d'une MS-HRM (Methylation-Sensitive High Resolution Melt). Pour cela l'ADN doit être mis en présence de bisulfite, qui va désaminer les cytosines non méthylées, les transformant en uraciles, alors que les cytosines méthylées ne seront pas modifiées. Le gène PstI doit ensuite être amplifié par qPCR et les courbes de fusion doivent être analysées à la recherche de variation résultant de la présence d'uraciles ou de cytosines. Les échantillons peuvent aussi être analysés par séquençage haut débit pour avoir la localisation des méthylations. Il est aussi possible que certaines cellules subissent un réarrangement dans la séquence PstI ou les régions régulatrices et perdent ainsi leur capacité à exprimer l'enzyme en présence de l'inducteur. Cette hypothèse pourrait aussi être vérifiée par séquençage du génome nucléaire au niveau du site d'insertion, afin de vérifier la présence du promoteur et du gène PstI. Les cellules HEK PstI sont constamment cultivées avec des antibiotiques de sélection, la blasticidine et l'hygromycine, qui doivent normalement empêcher la perte du transgène. Cependant l'expression des gènes de résistance à ces antibiotiques n'est pas gouvernée par le même promoteur que l'expression du gène PstI. Il est donc possible que les cellules résistent aux antibiotiques de sélection bien qu'elles n'expriment plus le gène d'intérêt.

Nous avons aussi remarqué une diminution de la génération de CDBmt lors d'une première induction à la doxycycline réalisée après plusieurs mois d'entretien des cellules PstI. Bien que cette diminution puisse venir en partie d'une augmentation des molécules d'ADNmt hétéroplasmiques possédant une mutation dans les sites de restriction, l'expression de l'enzyme de restriction est probablement aussi diminuée. L'expression basale de PstI même en l'absence d'inducteur pourrait créer une pression de sélection qui peut suffire à déclencher l'extinction du gène pour protéger les cellules.



FIGURE 80 – Caractérisation de délétions de l'ADNmt obtenues après l'induction de CDBmt dans un modèle murin

Des cassures de l'ADNmt ont été générées dans un modèle murin pendant 3 jours à l'aide de l'enzyme de restriction PstI à adressage mitochondrial s'exprimant seulement dans les neurones adultes. Quelques semaines après l'induction des cassures les souris ont été sacrifiées et l'ADNmt du cortex cérébral a été analysé. Plusieurs délétions de l'ADNmt ont été détectées, dont les trois présentées sur la figure, où environ 3,8kb ont été délétés. Les séquences autour des délétions sont présentées. La délétion 2 présente des répétions directes (lettres en gras soulignées) de chaque côté du point de cassure, l'un dans la région délétée et l'autre à l'extérieur. La délétion 3 suggère une réparation par NHEJ après élimination des extrémités sortantes des cassures grâce au mécanisme proposé en bas de la figure (Fukui et Moraes, 2009).



FIGURE 81 – Analyse *in vitro* de la capacité de réparation des CDBmt humaines Le plasmide pUC-19 a été traité par différentes enzymes de restriction, PstI, BamHI ou SmaI, pour créer une CDB contenant une extrémité 3' débordante, une extrémité 5' débordante ou des bords francs, respectivement. Les séquences de reconnaissance et les sites de cassures des différentes enzymes sont représentés à droite de la figure. Les molécules d'ADN coupées ont été incubées avec des protéines mitochondriales humaines extraites de cellules de fibroblastes GM847. La réparation des CDB a ensuite été détectée par qPCR et mesurée à l'aide de Picogreen, une sonde fluorescente qui se lie à l'ADN doublebrin. La quantité d'ADN réparée a pu être estimée par rapport à une courbe standard, et est présentée à gauche de la figure (Houten *et al.*, 2016).

Chapitre 2

Réponses cellulaires aux CDBmt

2.1 Résultats controversés sur la réparation des CDBmt

Bien que de nombreuses protéines impliquées dans la maintenance des CDB nucléaires aient été détectées dans les mitochondries, les mécanismes de réparation des CDBmt restent controversés, notamment chez les mammifères.

Des preuves de recombinaison de l'ADNmt suite à des CDB induites par l'endonucléase Scal à adressage mitochondrial ont été trouvées chez la souris, les évènements de recombinaison intramoléculaires étant beaucoup plus courants que la recombinaison intermoléculaire. La plupart des évènements de recombinaison impliquaient une région proche de la D-loop et certains sites de restriction Scal préférentiellement (Bacman et al., 2009). Le même type de résultats a été obtenu lors de l'induction de CDBmt grâce à l'enzyme de restriction PstI exprimée dans les muscles squelettiques, toujours dans un modèle murin. Là encore les réarrangements impliquaient préférentiellement la région de la D-loop et un site PstI, et seules des petites séquences répétées ont pu être parfois détectées au niveau des sites de recombinaison (Srivastava, 2005). Cette enzyme de restriction a aussi été utilisée pour générer des CDBmt in vivo grâce à un système inductible Tet-Off ciblant les neurones de souris. Après induction des cassures 22 délétions d'environ 4kb à 10kb se sont accumulées et, en se basant sur la présence ou l'absence de répétions à proximité des cassures, elles pourraient à la fois impliquer le MMEJ, la HR ou le C-NHEJ (Figure 80) (Fukui et Moraes, 2009). Au contraire, la même enzyme de restriction à adressage mitochondrial, PstI, a été utilisée pour induire des CDBmt dans des cellules humaines d'ostéosarcomes, mais n'a pas généré de recombinaison à un niveau significatif (Srivastava et Moraes, 2001). Jusqu'à maintenant la réparation des CDBmt n'a pas été démontrée dans des cellules humaines, mais elle a été détectée in vitro. Des plasmides ont été linéarisés avec différentes enzymes de restriction créant des cassures à extrémités 3' sortantes (PstI), 5' sortantes (BamHI) ou à bords francs (SmaI) et incubés avec des extraits protéiques de mitoplastes humains. La réparation des CDBmt a ensuite pu être mesurée par qPCR (Figure 81) (Houten et al., 2016).

D'autres études *in vitro* ont aussi montré la capacité des mitochondries humaines et murines à utiliser le mécanisme de réparation MMEJ. Des extraits protéiques mitochondriaux issus de tissus de rats ou de la lignée cellulaire humaine HeLa ont été incubés avec différents ADN double-brin oligomériques mimant des cassures double-brin et possédant, ou non, des microhomologies de séquences (Tadi *et al.*, 2015). Aucun évènement de C-NHEJ n'a pu être détecté, ce qui contredit certaines études *in vivo*, alors que la réparation par MMEJ a été décelée dès l'ajout de séquences homologues de 5nt dans les substrats. L'efficacité du MMEJ augmente avec la longueur de la microhomologie et dépend aussi de la distance entre le site de cassure et

la séquence homologue. Ce résultat reste à être confirmé ex vivo et in vivo.

Dans nos expériences nous avons pu majoritairement observer la dégradation des molécules d'ADNmt lésées suite à l'induction de PstI et à la génération massive de CDBmt. Après une période de récupération, en l'absence d'inducteur, des molécules d'ADNmt apparemment intactes sont ré-amplifiées. Nous avons cherché à comprendre cette repopulation et étudié la présence de mécanismes de réparation des CDBmt dans notre modèle, mais nous n'avons détecté aucun élément pouvant nous indiquer une quelconque réparation par HR, MMEJ ou C-NHEJ. En effet nous avons séquencé l'ADNmt autour des sites de restriction PstI après génération d'une quantité massive de CDBmt suivie par une période de récupération où des molécules d'ADNmt intactes sont ré-amplifiées et nous l'avons comparé à de l'ADNmt de cellules non soumises à des CDB. Nous n'avons détecté aucune délétion qui pourrait suggérer une réparation des cassures par C-NHEJ ou MMEJ. Bien que la HR soit un mécanisme de réparation fidèle et puisse ne pas être décelée avec nos techniques d'analyses il apparait peu probable qu'elle soit active dans les mitochondries, ou alors de manière très minoritaire, car la perte d'ADNmt est très importante. Nous n'avons pas non plus détecté de mutations ponctuelles créées de novo mais uniquement l'augmentation de la proportion d'un polymorphisme de l'ADNmt dans l'un des sites de restriction.

2.2 Délétions de l'ADNmt

De nombreuses pathologies mitochondriales sont causées par des délétions de l'ADNmt, par exemple le syndrome de Pearson, le syndrome de Kearns-Sayre et l'ophtalmoplégie externe progressive. Ces délétions pourraient provenir de la réparation non fidèle des CDBmt, par C-NHEJ ou MMEJ, comme ce qui est observé dans certains modèles murins où une enzyme de restriction à adressage mitochondrial est utilisée pour générer des CDBmt (Bacman et al., 2009; Srivastava, 2005). La réparation par MMEJ notamment serait cohérente avec certaines mutations observées chez des patients atteints de maladies mitochondriales ou de cancers, dont les délétions de l'ADNmt sont flanquées par de petites séquences répétées (Houten et al., 2016). Ces molécules délétées créées de novo peuvent ensuite s'accumuler car elles sont plus petites que l'ADNmt intact et peuvent donc posséder un avantage réplicatif. Il a par exemple été montré dans un modèle murin où des CDBmt étaient générées pendant une courte période grâce à un système inductible exprimant PstI dans les neurones que les grandes délétions s'accumulent comparées aux plus petites délétions lors du vieillissement des souris (Fukui et Moraes, 2009). La génération de délétions de l'ADNmt est donc très nocive pour les cellules, puisqu'il y a perte d'information génique et que cette perte à tendance à s'amplifier au cours du temps. Nous n'avons cependant détecté aucune délétion de l'ADNmt dans notre modèle après génération massive de CDBmt suivie d'une période de récupération où l'ADNmt est ré-amplifié. Nous visualisons seulement une bande correspondant à l'ADNmt total en Southern Blot après réamplification et le séquençage par NGS d'environ 40000 fragments d'ADNmt autour d'un site PstI n'a pas non plus révélé de délétion, même en faible quantité.

Cependant les délétions de l'ADNmt observées dans certaines pathologies peuvent s'expliquer autrement. En effet il a été suggéré qu'elles ne proviennent pas de la réparation par NHEJ ou recombinaison mais qu'elles sont plutôt le résultat du blocage de la fourche de réplication et de mécanismes de réparation couplés à la réplication faisant intervenir les protéines du réplisome (Phillips *et al.*, 2017). L'analyse nucléaire du génome de patients présentant des délétions multiples a aussi montré que des gènes nucléaires impliqués dans la réplication de l'ADNmt sont souvent mutés (Van Goethem *et al.*, 2001; Longley *et al.*, 2010). Nos résultats vont dans le

sens de ces hypothèses puisque la génération de CDBmt n'entraine pas la formation de délétions dans notre modèle.

2.3 Quantité de CDBmt et réponses cellulaires

Notre système inductible de génération de CDB ciblées à la mitochondrie déclenche des cassures de l'ADNmt très nombreuses, puisque presque toutes les molécules subissent au moins une cassure en 2h de traitement par la doxycycline. Cette quantité de CDBmt n'est pas physiologique et il est possible que la cellule mette en place des mécanismes particuliers pour faire face à une telle accumulation de dommages.

L'expression basale de PstI que nous observons en l'absence de doxycycline peut cependant nous permettre d'étudier l'impact d'une production modérée de CDBmt, ce qui est plus susceptible de se produire naturellement. Après avoir cultivé ces cellules, sans induction, pendant plus d'un mois, nous les avons ensuite traité à la doxycycline et avons visualité l'état de l'ADNmt par Southern Blot. Moins de cassures étaient générées, l'ADNmt apparaissait résistant au clivage par PstI, ce qui aurait pu être dû à un mécanisme de réparation non fidèle entrainant la perte du site de restriction. Cependant, le séquençage autour des sites de restriction PstI de l'ADNmt de cellules non induites cultivées pendant plusieurs mois et apparemment résistantes n'a amené aucune preuve soutenant cette hypothèse. En effet seules des mutations ponctuelles dans les sites de restriction ont été détectées, avec une proportion élevée (deux mutations ponctuelles dans le site situé dans le gène COX1, avec environ 35% de molécules mutées, et une autre mutation ponctuelle dans le site situé dans le gène ATP6, avec environ 10% de molécules mutées). Le mécanisme mis en place suite à la génération modérée de CDBmt ne semble donc toujours pas inclure des processus de réparation, mais consiste plutôt en une sélection et une amplification des molécules non reconnues par l'enzyme de restriction, avec donc une modification de l'hétéroplasmie.

Une autre série de tests est en cours pour étudier la réponse cellulaire à un faible taux de CDBmt. Les cellules sont toujours cultivées en l'absence d'inducteur, l'expression basale de PstI suffisant à induire des dommages de l'ADNmt et un stress cellulaire. Dans cette expérience les cellules sont en outre cultivées dans un milieu faible en glucose ou dans un milieu contenant du galactose, afin de les forcer à produire l'énergie cellulaire par l'intermédiaire de la phosphorylation oxydative, et non pas par la glycolyse, indépendante des mitochondries. Ce milieu de culture ajoute donc une pression de sélection aux cellules, puisqu'elles ont alors réellement besoin de l'ADNmt qui code des protéines essentielles au bon fonctionnement de la chaine respiratoire. En effet, les cellules ρ 0, dépourvues d'ADNmt, peuvent cependant survivre dans un milieu riche en glucose supplémenté en pyruvate et uridine (Kukat *et al.*, 2008). Ce stress supplémentaire pourrait permettre d'augmenter la sélection des molécules d'ADNmt résistantes aux cassures générées par l'enzyme PstI, et donc présentant des sites de restriction altérés. Cette méthode devrait nous permettre de détecter plus facilement les mutations et les éventuelles délétions puisque leurs proportions devraient être augmentées.

La visualisation des cellules HEK PstI en immunofluorescence avec un marquage ciblant la protéine TFAM, dont la quantité est corrélée à la quantité d'ADNmt, a révélé que certaines cellules perdent TFAM, et donc leur ADNmt, 1j post-induction, alors que d'autres non. Ce résultat est surprenant puisque nous travaillons avec des populations clonales, et que toutes les cellules ont donc les mêmes génomes et la même insertion du gène PstI. Cependant il est possible que des modifications épigénétiques aient affecté certaines cellules en particulier, supprimant l'expression du gène PstI même après traitement avec la doxycycline, ou que certaines cellules aient subi un réarrangement entrainant la perte du gène PstI.

2.4 Elimination de l'ADNmt endommagé

Suite à l'induction de CDBmt nous observons une perte importante et rapide d'ADNmt, survenant en 1j post-induction. D'autres études ont montré un effet similaire suite à la génération massive de dommages persistants de l'ADNmt dans des modèles cellulaires, par exemple suite à l'exposition à un stress oxydatif à l'aide de H2O2 (Shokolenko *et al.*, 2009) ou à la création de sites abasiques et de cassures simple-brin à l'aide d'un système inductible Tet-On exprimant des enzymes spécifiques (Shokolenko *et al.*, 2013). La production massive de CDBmt après transfection de cellules humaines et murines par l'enzyme de restriction EcoRI à adressage mitochondrial et expression constitutive a également mené à la perte d'ADNmt, cette fois totale, et à la génération de cellules $\rho 0$ (Kukat *et al.*, 2008).

2.4.1 Implication de l'autophagie et de l'apoptose

Une hypothèse pour expliquer la perte d'ADNmt est l'élimination de la mitochondrie endommagée ou même de la cellule entièrement, par autophagie ou apoptose, après détection d'une quantité de dommages mitochondriaux trop importante. Plusieurs études supportent cette hypothèse. Par exemple chez le nématode les dommages de l'ADNmt causés par l'exposition aux UVC, générant des distorsions de l'hélice, sont éliminés après quelques jours par des mécanismes impliquant des gènes de l'autophagie et de la dynamique mitochondriale (Bess et al., 2012). Le même type de résultats a été obtenu dans des cellules de mammifères, où la mitophagie renforcée grâce à la surexpression de Parkin pendant 45 jours a permis d'éliminer la majorité des mitochondries contenant des molécules d'ADNmt portant une mutation délétère dans le gène COX1, dans des cellules cybrides hétéroplasmiques (Suen et al., 2010). Le processus de mitophagie aide donc à maintenir une population mitochondriale saine, ce qui est crucial pour la survie cellulaire. La dynamique mitochondriale couplée à l'autophagie sont en grande partie responsables du contrôle qualité des mitochondries et permettent d'éliminer les mutants pathologiques de l'ADNmt avec une efficacité dépendant du type cellulaire. Par exemple l'ADNmt muté (m3243G) s'accumule dans des cellules de rhabdomyosarcome (RD.Myo) alors que l'ADNmt sauvage est favorisé dans des cellules d'adénocarcinome (A549.B2). Cette différence est liée au ratio d'hétéroplasmie, à la dynamique mitochondriale et à la mitophagie. En effet plus les molécules d'ADNmt sont nombreuses plus les marqueurs de la mitophagie sont exprimés dans les cellules A549.B2, alors que c'est l'inverse pour les cellules RD.Myo. De plus les cellules A549.B2 ont un réseau mitochondrial beaucoup plus fragmenté que les cellules RD.Myo (Malena et al., 2016).

Cependant dans notre modèle nous observons une perte d'ADNmt très rapide, et il serait donc peu probable que la dynamique mitochondriale et la mitophagie soient responsables de cette élimination. De plus il y a un décalage entre la perte d'ADNmt, qui se produit en 1j postinduction, et ce qui pourrait être de petites altérations mitochondriales, comme l'augmentation de la quantité de mitochondries ou la présence de mitochondries fractionnées « boules » visibles en microscopie après marquage avec le MitoTracker Red CMXRos, qui se produit 1-3j post-induction. La diminution de certaines protéines mitochondriales impliquées dans la chaine respiratoire (NDUFB8, COX2 et UQCR2) est aussi postérieure à la dégradation de l'ADNmt puisqu'elle survient 2j post-induction. Seule la diminution de TFAM a lieu simultanément à la perte d'ADNmt, avec la même cinétique. L'augmentation de la masse mitochondriale, quantifiée par cytométrie en flux à l'aide du MitoTracker Green, pourrait de plus être un artefact dû à la variation du nombre de cellules entre les différentes conditions lors du marquage. En effet les cellules HEK PstI 6j post-induction, beaucoup moins nombreuses lors du marquage,

ont un signal MitoTracker plus élevé, ce qui pourrait indiquer que la concentration du marqueur est limitante dans les autres conditions. L'analyse du marqueur de la biogenèse mitochondriale PGC1- α , par exemple par Western blot, pourrait donner des informations supplémentaires sur l'impact mitochondrial des CDBmt.

La vitesse de la dégradation d'ADNmt que nous observons ne peut pas être due uniquement à un blocage de la réplication de l'ADNmt à cause des CDB, car il a par exemple été montré que la perte d'ADNmt suite à l'expression d'une forme inactive dominante de la polymérase POL γ se produit en plus de 6j dans les cellules HEK293 (Jazayeri *et al.*, 2003). Elle est aussi conforme aux résultats publiés par Shokolenko et al., qui détectent la perte du génome mitochondrial 6h à 1j après l'induction de l'expression des enzymes UNG1 mutée ou exoIII, qui génèrent des sites abasiques ou des cassures simple-brin (Shokolenko *et al.*, 2013). Cette équipe a aussi suggéré que l'élimination de l'ADNmt peut se produire selon deux processus, avec une cinétique rapide ou lente suivant le type cellulaire (Shokolenko *et al.*, 2014).

Pour confirmer que la perte d'ADNmt que nous détectons dans notre modèle n'est pas liée à une perte des organites endommagés, nous avons quantifié les marqueurs de l'autophagie et de la mitophagie, LC3-II et PINK1 pendant la phase d'élimination d'ADNmt. Les niveaux de ces marqueurs restent stables alors qu'ils augmentent bien dans des cellules où la mitophagie a été induite par traitement au CCCP, indiquant que ces mécanismes ne sont pas responsables de la perte d'ADNmt dans notre système. Nous aurions également pu visualiser l'autophagie plus directement, par microscopie en fluorescence, en transfectant les cellules afin qu'elles expriment la protéine LC3 liée à la GFP et en observant la colocalisation de la GFP avec un marqueur des mitochondries (Kim et Lemasters, 2010). Nous avons aussi vérifié que la dégradation de l'ADNmt n'était pas due à une élimination des cellules en entier, en mesurant l'apoptose pendant la phase de dégradation d'ADNmt. Là encore l'apoptose n'augmente pas significativement, la génération de CDB n'est pas due à une élimination de l'organite ou de la cellule endommagées mais probablement à un mécanisme spécifique qui dégrade directement l'ADNmt endommagé.

2.4.2 Etude de la dégradation enzymatique de l'ADNmt

Pour tester l'hypothèse d'une dégradation plus directe et enzymatique de l'ADNmt suite à la génération de CDB nous avons cherché à identifier des protéines qui pourraient être impliquées dans la perte d'ADNmt. Ainsi nous avons testé les cinq nucléases à ADN connues pour être mitochondriales : EXOG, ENDOG, FEN1, DNA2 et MGME1. Les protéines EXOG et EN-DOG sont des paralogues qui proviennent probablement de la duplication d'un gène ancestral de nucléase durant l'évolution. EXOG a à la fois une activité endonucléase et 5'-exonucléase, avec une préférence pour l'ADN simple-brin et une capacité à cliver l'ADN superenroulé, alors qu'ENDOG a uniquement une activité endonucléase, et pas de préférence de substrat (Cymerman et al., 2008). EXOG est uniquement située dans les mitochondries et joue un rôle majeur dans le LP-BER mitochondrial et la réparation des cassures simple-brin. Les cellules où l'expression de cette protéine est abolie accumulent plus de dommages de l'ADN et développent des dysfonctionnements mitochondriaux qui déclenchent l'apoptose (Tann et al., 2011). Le rôle mitochondrial d'ENDOG n'est pas totalement élucidé. Cette nucléase est impliquée dans le métabolisme de l'ADN à la fois au niveau mitochondrial et nucléaire et joue un rôle dans différents mécanismes tels l'apoptose (Kalinowska et al., 2005) ou la recombinaison nucléaire (Huang et al., 2006). Récemment sa structure cristallographique a démontré qu'elle a une forte activité endonucléase aspécifique (Lin et al., 2016). Il a aussi été suggéré qu'ENDOG et EXOG

pourraient avoir un rôle dans la dégradation de l'ADNmt suite à l'infection au VHS (Duguay et Smiley, 2013). FEN1 possède une activité 5'-flap endonucléase et une activité 5'-3' exonucléase sur l'ADN double-brin clivé (Balakrishnan et Bambara, 2013). DNA2, elle, possède des activités 5'-flap endo/exonucléase et endonucléase, avec une préférence pour l'ADN simple-brin, ainsi que 5'-3' hélicase (Fortini et al., 2011). FEN1 et DNA2 sont impliqués dans la réplication et le BER au niveau nucléaire et mitochondrial. Ces nucléases éliminent les structures « flaps » formées au niveau mitochondrial lors du déplacement des amorces pendant la réplication ou de la réparation par LP-BER : DNA2 clive les longues extrémités sortantes recouvertes de RPA, laissant quelques nucléotides à la base, alors que FEN1 coupe les petits « flaps » directement à la base de l'extrémité sortante. Le clivage des longs « flaps » nécessite donc l'action de DNA2 dans un premier temps puis de FEN1 (Zheng et al., 2008; Liu et al., 2008). La dernière nucléase, MGME1, a principalement une activité 5'-3' exonucléase, mais est aussi capable d'une faible activité endonucléase sur les substrats linéaires. Elle a une forte préférence pour l'ADN simplebrin (Szczesny et al., 2013). Elle est aussi impliquée dans l'élimination des amorces durant la réplication de l'ADN mitochondrial (Uhler et Falkenberg, 2015). Une déplétion en MGME1 entraine l'accumulation d'ADN mitochondrial 7S et d'intermédiaires provenant du blocage de la réplication (Kornblum et al., 2013).

Nous avons réalisé l'extinction de ces cinq nucléases à l'aide d'une approche siRNA, individuellement ou simultanément au cas où elles auraient un rôle redondant. Cependant la déplétion de ces protéines n'a pas changé la cinétique de perte de l'ADNmt suite à l'induction de CDBmt, indiquant qu'elles ne sont pas impliquées dans l'élimination des fragments linéaires d'ADNmt générés après cassures. Une équipe travaillant sur la protéine MGME1 a aussi récemment étudié son implication dans la dégradation de l'ADNmt suite à la génération de CDBmt. Un système similaire au nôtre a été utilisé, exprimant de manière inductible l'enzyme de restriction EagI à adressage mitochondrial dans des cellules HEK293. L'extinction de l'expression de MGME1, réalisée grâce au système CRISPR/Cas9, a permis d'empêcher la dégradation de l'ADNmt lésé (Poster A74, conférence Euromit 2017). Ces résultats n'ont pu être obtenus qu'après extinction totale de MGME1 et une expérience similaire utilisant l'enzyme de restriction PstI à la place d'EagI a entrainé une diminution de la dégradation de l'ADNmt endommagé beaucoup plus faible. MGME1 dégrade uniquement l'ADN simple-brin, elle ne peut donc pas être la seule responsable de la dégradation d'ADNmt double-brin linéaire obtenu après CDB. Les auteurs suggèrent que l'hélicase TWINKLE serait responsable de la séparation de l'ADN double-brin avant digestion par MGME1. L'implication de cette nucléase dans l'élimination de l'ADNmt suite à des CDBmt doit être approfondie.

Dans notre système les cinq nucléases connues pour être mitochondriales n'apparaissent pas impliquées dans la dégradation d'ADNmt suite à la génération de CDB, et nous avons donc cherché d'autres protéines candidates. La polymérase mitochondriale POL γ possède une activité exonucléase, lui permettant de dégrader quelques nucléotides pour corriger d'éventuelles erreurs de réplication. Chez des souris l'inactivation de l'activité exonucléase de POL γ entraine l'accumulation de mutations de l'ADNmt et un phénotype de vieillissement précoce (Trifunovic *et al.*, 2004). Nous avons donc évalué l'impact du blocage de POL γ sur la dégradation d'ADNmt suite aux CDB, bien que la polymérase ne puisse pas dégrader à elle seule les longs fragments d'ADN obtenus après cassures. Nous avons bloqué POL γ sur l'ADNmt par traitement des cellules avec un analogue de la cytidine, la didéoxycytidine, ce qui empêche l'activité polymérase mais aussi l'activité exonucléase. Cependant la cinétique de perte de l'ADNmt suite à l'induction de CDBmt n'a pas été modifiée et POL γ n'est donc probablement pas impliquée dans la dégradation d'ADNmt.

Nous avons cherché de nouvelles candidates potentiellement impliquées dans l'élimination
de l'ADNmt après cassures, en estimant *in silico* le pourcentage d'adressage mitochondrial d'une banque de protéines à activité nucléase. Nous avons ainsi sélectionné trois protéines : SND1, DFFB et EXD2, qui étaient aussi retrouvées dans l'une de nos analyses protéomiques de fractions mitochondriales. Cependant, malgré les prédictions *in silico*, seule EXD2 s'est révélée mitochondriale, même après induction de l'enzyme PstI et génération des CDBmt. Nous avons réalisé l'extinction de l'expression de ces candidates à l'aide d'une approche siRNA, mais leur déplétion n'a toujours pas modifié la cinétique de dégradation de l'ADNmt suite à l'induction de CDBmt. La détermination *in silico* de protéines candidates ainsi que le test de leur implication dans l'élimination d'ADNmt individuellement sont fastidieux et peu efficaces, car le choix des protéines retenues est en partie arbitraire. Nous avons donc décidé de mettre en place une approche à plus grande échelle par crible RNAi. Cette méthode sera détaillée dans les perspectives (Chapitre 3).

2.5 Ré-amplification d'ADNmt intact

Une phase de ré-amplification de molécules d'ADNmt intactes fait suite à la dégradation des molécules lésées après induction. Cette ré-amplification d'ADNmt est très importante et relativement rapide puisque quasiment tout l'ADNmt est dégradé à 6j post-induction et atteint de nouveau le niveau d'ADNmt présent avant induction dès 9j post-induction, soit en 3 jours. De plus l'amplification d'ADNmt continue et, 27 jours après l'induction, la quantité d'ADNmt est plus de 2 fois plus élevée qu'avant induction. Elle diminue ensuite pour se stabiliser à un niveau équivalent à la quantité d'ADNmt présente avant induction. Nous pouvons émettre l'hypothèse qu'un processus de compensation se met en place, avec une augmentation de la quantité d'ADNmt pour rétablir l'expression des protéines perdues de la chaine respiratoire et restaurer son bon fonctionnement.

Puisque nous n'avons pas détecté d'évènements de réparation et que l'ADNmt endommagé est dégradé, cet ADNmt intact semble provenir de l'amplification par réplication des molécules d'ADNmt non lésées lors de l'induction. Nous avons donc étudié la réplication de l'ADNmt après CDBmt. Les niveaux des protéines de la réplication mitochondriale, TWINKLE et POL γ , restent stables jusqu'à 6j post-induction. Nous pouvons cependant émettre l'hypothèse que suffisamment de protéines de la réplication sont présentes pour pouvoir amplifier au maximum le peu de molécules intactes présentes pendant cette phase de dégradation de l'ADNmt. Nous avons aussi analysé la réplication mitochondriale après CDBmt en quantifiant l'ADN 7S, qui est produit lors d'évènements avortés de la réplication. Cependant les signaux obtenus en Southern Blot sont peu quantifiables et nous n'avons pas réussi à créer des amorces qPCR spécifiques de l'ADN 7S permettant d'obtenir des résultats reproductibles. Il semble toutefois d'après les résultats de Southern Blot que le ratio ADN 7S/ ADN total ne varie pas sensiblement au cours de la phase de dégradation et du début de la phase de ré-amplification de l'ADNmt, jusqu'à 9j post-induction. Pour observer la réplication de l'ADNmt nous avons aussi utilisé la microscopie en épifluorescence, avec l'incorporation d'un analogue de la thymidine, l'EdU marqué ensuite avec un fluorophore. Nous n'avons pas réussi à observer la réplication mitochondriale sur les cellules HEK293, bien que nous ayons pu la détecter dans des cellules U2OS, qui possèdent un plus gros cytoplasme. Il faudrait essayer de bloquer la réplication nucléaire, par exemple par traitement avec l'aphidicoline, quelques heures avant et durant la phase d'incorporation d'EdU pour pouvoir amplifier le signal mitochondrial et faciliter sa détection. Nous nous sommes pour l'instant focalisés sur l'étude de la dégradation de l'ADNmt qui a lieu juste après l'induction de CDBmt, et l'analyse de la phase de ré-amplification de molécules d'ADNmt intactes doit encore être étudiée plus en détails.

Comme expliqué précédemment les cassures détectées avant induction en l'absence de doxycycline, dues à l'expression basale de PstI, ne sont alors plus visible en Southern Blot, et une seconde induction n'entraine que très peu de digestion de l'ADNmt. En analysant les sites de restriction PstI, par séquençage ou digestion in vitro, et en mesurant la quantité de transcrits PstI produits suite à une deuxième induction avec la doxycycline, nous avons vu que cette apparente résistance au clivage par PstI vient principalement d'une perte d'expression de PstI au cours du temps et non pas de la résistance des molécules d'ADNmt à l'action de l'enzyme. Le séquençage des sites PstI après ré-amplification nous a indiqué que le pourcentage de molécules d'ADNmt hétéroplasmiques possédant une mutation dans le site de restriction est plus élevé comparé aux cellules HEK WT non soumises aux cassures, mais qui possèdent toutefois un faible taux de molécules possédant ces polymorphismes. La transition A-G dans le site PstI situé dans le gène COX1 induit une mutation silencieuse et est référencée dans GenBank, alors que les autres mutations ponctuelles, moins fréquentes dans les cellules séquencées, ne sont pas référencées dans la base de données MITOMAP. La transition G-A dans le site situé dans le gène COX1 induit le remplacement d'une thréonine par une asparagine, deux acides aminés polaires non chargés et la transversion C-A dans le site situé dans le gène ATP6 induit le remplacement d'une alanine, hydrophobe, par une thréonine, polaire non chargée. Les molécules d'ADNmt résistantes à PstI sont donc pré-existantes et sont sélectionnées durant les phases de dégradation de l'ADNmt puis ré-amplification.

Chapitre 3

Perspectives

3.1 Présence de protéines de la réparation nucléaire dans les mitochondries

Initialement ce projet de thèse portait sur les mécanismes de réparation de l'ADNmt suite à des CDB et nous avions commencé à étudier la localisation mitochondriale de différentes protéines impliquées dans la réparation des CDB nucléaires. Puisque nous n'avons finalement pas détecté d'évènements de réparation mais majoritairement un processus de dégradation de l'ADNmt lésé nous nous sommes focalisés sur cet aspect et n'avons pas poussé plus loin l'étude des protéines de la réparation dans les mitochondries.

Nous avons cependant localisé les protéines RAD54L, une hélicase DEAD-like impliquée dans la HR nucléaire, et POL μ , une polymérase impliquée dans le NHEJ, dans les mitochondries. Cette localisation a été réalisée par deux méthodes, l'analyse Western Blot de fractions subcellulaires et l'observation en microscopie en épifluorescence de cellules transfectées avec des plasmides exprimant la protéine liée à l'eGFP. Il serait intéressant de confirmer la localisation mitochondriale de ces protéines, par exemple par microscopie confocale, car leur présence dans ce compartiment subcellulaire a potentiellement un intérêt pour le fonctionnement de la cellule. Même si nous n'avons pas détecté d'évènements de réparation de l'ADNmt après CDB il se peut que les protéines POL μ et RAD54L aient quand même un rôle dans les mitochondries, différent du rôle qu'elles peuvent avoir au niveau nucléaire.

3.2 EXD2 : rôle mitochondrial ou nucléaire?

La protéine EXD2 était l'une de nos candidates dans la dégradation de l'ADNmt suite à des CDB. Nous avons pu déterminer sa localisation mitochondriale par analyse Western Blot de fractions subcellulaires et observation par microscopie en épifluorescence de la co-localisation de la protéine marquée en immunofluorescence et d'un marqueur des mitochondries. Cependant l'étude de la cinétique de dégradation de l'ADNmt suite à la génération de CDB dans des cellules transfectées avec des siRNA ciblant EXD2 a révélé que cette protéine n'est pas impliquée dans le processus d'élimination de l'ADNmt.

Cette 3'-5' exonucléase potentiellement impliquée dans la HR nucléaire serait nécessaire à la résection des extrémités des CDB, elle serait recrutée au niveau de la chromatine suite à des dommages et interagirait avec le complexe MRN (Broderick *et al.*, 2016). Cependant la localisation très préférentiellement mitochondriale de EXD2 que nous avons pu observer remet en cause le rôle de EXD2 dans la réparation nucléaire. Nous avons donc étudié l'éventuelle



FIGURE 82 – Localisation de NUDT19 à l'aide du microscope Zeiss LSM 800

(A) La localisation de NUDT19 a été étudiée par immunofluorescence avec un anticorps ciblant NUDT19 (vert), et co-marquage de l'ADN nucléaire (bleu) et des mitochondries à l'aide du MitoTracker (rouge) ou du peroxysome à l'aide d'un anticorps ciblant PMP70 (rouge), une protéine de la membrane du peroxysome. La localisation a été réalisée sur des cellules HAP1 et HEK293, avec un microscope Zeiss LSM 800. (B) Agrandissements des images précédentes, selon les encadrés blancs. Barres d'échelles : 10μ m.

relocalisation de EXD2 en cas de cassures de l'ADN nucléaire. Pour cela nous avons généré des CDB nucléaires en irradiant des cellules aux rayons X et nous avons ensuite comparé la localisation cellulaire d'EXD2 dans ces cellules et dans des cellules témoins non irradiées. La nucléase reste mitochondriale après irradiation et il apparait donc peu probable qu'elle puisse être impliquée directement dans la réparation des CDB nucléaires.

Nous avons mis nos résultats en commun avec l'équipe du Dr. Spelbrink (Radboud Center for Mitochondrial Medicine, Nijmegen, Pays-Bas), qui travaillait également sur cette protéine. Ils ont montré qu'EXD2 était plus particulièrement localisée à la membrane externe mitochondriale. Elle a un rôle dans la dynamique mitochondriale, puisqu'empêcher son expression par siRNA entraîne un étalement du réseau mitochondrial et que sa surexpression entraîne au contraire un regroupement des mitochondries en périnucléaire. Ces résultats suggèrent que les défauts de réparation des CDB nucléaires reportés suite à une déplétion d'EXD2 sont probablement une conséquence indirecte due à l'altération du réseau mitochondrial. Ces travaux ont permis de soumettre un article scientifique court en collaboration (Manuscrit en annexe).

3.3 Rôles des Nudix mitochondriales

En parallèle de notre recherche des protéines responsables de la dégradation de l'ADNmt après induction de CDB nous nous sommes intéressés à une famille de protéines, les hydrolases Nudix. En effet nous avons pu identifier deux Nudix mitochondriales, NUDT6 et NUDT19, et avons étudié leurs rôles. Nous avions émis l'hypothèse que, comme la Nudix nucléaire MTH1, elles étaient capables d'hydrolyser les nucléotides modifiés dans le réservoir de nucléotides libres, et pouvaient donc empêcher leur incorporation dans l'ADNmt lors de la réplication. Elles auraient donc eu un rôle préventif vis-à-vis des CDBmt, car les nucléotides oxydés incorporés peuvent ensuite entrainer un blocage de la réplication générant des cassures de l'ADN. Leur réparation par le BER crée aussi des cassures simple-brin qui peuvent s'accumuler si le processus de réparation est interrompu et évoluer en CDB.

Nous avons réalisé des tests d'activité sur protéines recombinantes purifiées, avec MTH1 comme témoin positif et différents nucléotides, modifiés ou non, comme substrats. Nous n'avons cependant pas détecté d'activité d'hydrolyse de nucléotides pour NUDT6 et NUDT19. De plus nous avons un doute sur l'expression protéique de NUDT6, car aucun anticorps n'a permis de détecter cette protéine, et seule la transfection de cellules avec un plasmide exprimant la protéine liée à l'eGFP a permis d'étudier sa localisation. Nous émettons l'hypothèse que ce gène agit uniquement au niveau transcriptionnel, en régulant par exemple l'expression de son antisens, le FGF-2 (Baguma-Nibasheka *et al.*, 2012; McEachern et Murphy, 2014). L'étude de la Nudix NUDT19 a été plus poussée. L'analyse des cellules HAP1 KO NUDT19 a révélé peu de différences avec les cellules WT. La quantité d'ADNmt est seulement légèrement réduite dans les cellules KO. De plus les cellules KO présentent aussi peut être une accumulation de cellules en phase G2/M, bien que nos expériences de cytométrie en flux n'aient pas été reproductibles pour l'instant et que ce résultat doive encore être vérifié.

Des expériences supplémentaires sont nécessaires pour déterminer le rôle de NUDT19 au niveau mitochondrial et nous souhaitons tout d'abord tester des activités qui ont déjà été publiées, notamment une activité décapping des ARNm (Song *et al.*, 2013) et une activité acyl-CoA diphosphatase dans le péroxysome (Ofman *et al.*, 2006). En parallèle nous vérifions aussi la localisation mitochondriale ou péroxysomale de NUDT19 en microscopie confocale à l'aide d'un co-marquage des mitochondries ou du péroxysome et de la protéine. De premières études semblent indiquer que NUDT19 a une localisation double, à la fois dans le péroxysome et la mitochondrie, avec une localisation préférentielle dépendant du type cellulaire (**Figure 82**). Ainsi

NUDT19 semble principalement localisée dans les mitochondries des cellules HAP1 et dans le peroxysome des cellules HEK293, et l'étude d'autres types cellulaires est en cours.

3.4 Crible RNAi

L'un des objectifs de ce projet était d'identifier les protéines impliquées dans la maintenance de l'ADNmt suite à l'induction de CDB. Nous avons testé les protéines à activité nucléase connues pour être localisées dans les mitochondries, EXOG, ENDOG, FEN1, DNA2, MGME1 et la polymérase POL γ , en analysant l'état de l'ADNmt après induction des CDB dans des cellules où l'expression de ces protéines était abolie, et elles se sont révélées non responsables de la dégradation de l'ADNmt lésé. Nous avons donc cherché d'autres candidates possédant une activité nucléase et un fort pourcentage d'adressage mitochondrial d'après analyse des séquences *in silico*, et nous avons choisi de tester les protéines SND1, DFFB et EXD2. Là encore l'extinction de l'expression de ces candidates par siRNA n'a pas modifié la cinétique de dégradation de l'ADNmt après CDB. Nous avons donc décidé de mettre au point une méthode permettant de cribler de nombreuses protéines à la fois, car le choix des candidates testées après analyse *in silico* est relativement aléatoire, et l'étude de chaque protéine individuellement est couteuse en temps.

Ce projet est réalisé en partenariat avec le laboratoire du Pr. Falkenberg, à l'université de Göteborg, Suède. Nous avons élaboré une banque de siRNA sur mesure ciblant 80 gènes codant pour des nucléases ainsi que des gènes témoins ciblant des protéines connues de la maintenance de l'ADNmt, TWINKLE, POL γ et TFAM et un gène ciblant une protéine normalement non impliquée dans le processus étudié, la GAPDH. La librairie, fournie dans une plaque 96 puits par l'entreprise Dharmacon, comporte aussi un puits contenant un siRNA ne ciblant aucun gène et des puits vides. Le principe général du crible est de transfecter des cellules HEK PstI par transfection en mode inverse dans des plaques 96 puits avec les différents siRNA de la librairie. Puis, 3j après transfection, l'expression de PstI est induite par traitement de 2h avec la doxycycline. Enfin, 1j post-induction, les cellules sont fixées, perméabilisées et marquées par immunofluorescence avec un anticorps primaire anti TFAM ainsi qu'à l'aide de DAPI, afin de pouvoir quantifier l'intensité de fluorescence TFAM normalisée par rapport au DAPI, ou le nombre de cellules exprimant TFAM. En effet la perte d'ADNmt est corrélée à la perte de la protéine TFAM et, si un siRNA cible une protéine impliquée dans la maintenance de l'ADNmt après CDB, la dégradation de l'ADNmt devrait être modifiée et le signal TFAM du puits correspondant devrait donc être altéré. L'observation des cellules et la quantification des intensités de fluorescence est réalisée sur un microscope manuel pour les tests de mise au point, dans l'objectif d'utiliser un microscope automatique pour les cribles, afin de quantifier les signaux sur le plus grand nombre de champs possibles. Le crible sera réalisé à la fois sur des cellules HEK PstI et sur des cellules HEK WT, pour différencier les gènes codant pour des protéines impliquées dans la maintenance suite à des CDBmt de ceux codant pour des protéines impliquées dans la maintenance de l'ADNmt en général, par exemple dans la réplication. Les gènes pour lesquels les siRNA correspondant entrainent une variation du ratio des intensités de fluorescences TFAM/ DAPI comparé aux contrôles seront ensuite analysés plus en détails individuellement.

Nous avons cependant fait face à des difficultés lorsque nous avons commencé à mettre au point le crible RNAi. En effet les cellules HEK293 sont peu adhérentes et adhèrent mal sur la surface en verre très lisse des plaques 96 puits que nous avions choisies pour la résolution qu'elles permettent d'obtenir en microscopie. Il a donc fallu augmenter l'adhérence des cellules en traitant préalablement les surfaces des plaques avec de la poly-L-lysine et en diminuant les



FIGURE 83 – Crible RNAi partiel et implication de MGME1 dans la dégradation de l'ADNmt Un crible RNAi de 40 nucléases a été réalisé et les images obtenues pour les puits transfectés avec des siRNA non-spécifiques ou ciblant la protéine MGME1, sur cellules HEK WT et HEK PstI 1 jour postinduction, sont présentées. Les cellules ont été marquées par le DAPI (bleu) et un anticorps anti-TFAM (vert).

étapes de changements de milieux et de rinçages. La perte de cellules au cours de tout le processus (transfection de siRNA, induction des CDBmt, marquage fluorescent) est cependant toujours relativement importante et nécessite encore des améliorations du protocole. Un deuxième problème auquel nous avons dû faire face est l'impact du nombre de cellules présentes dans le puits sur l'intensité de fluorescence TFAM mesurée. En effet, pour des conditions similaires où seul le nombre de cellules par puits change, les puits contenant moins de cellules avaient une fluorescence TFAM plus élevée. L'anticorps primaire ciblant la protéine TFAM était visiblement limitant et nous avons donc fortement augmenté sa concentration afin de s'affranchir de ce problème. A une dilution 1 : 50 l'intensité de fluorescence varie peu en fonction du nombre de cellules par puits. Pour plus de sécurité nous avons aussi décidé d'éliminer des analyses les puits contenant trop peu de cellules.

Lors de nouveaux essais nous avons réussi à nous affranchir du problème d'adhérence des cellules en utilisant des plaques 96 puits à fond plastique recouvertes de poly-L-lysine. De plus nous avons ajouté une étape de pré-fixation des cellules en ajoutant du formaldéhyde 4% directement dans les puits contenant le milieu de culture pendant 15min à 37°C (volume à volume, concentration finale en formaldéhyde 2%). Ensuite nous utilisons le protocole de marquage habituel, en commençant par l'étape de fixation avec 4% de formaldéhyde.

Nous avons donc finalement pu tester une partie de notre librairie de siRNA, environ 40 nucléases, et nous avons obtenu une candidate inattendue compte tenu de nos résultats précédents. En effet après siRNA ciblant la nucléase MGME1 la perte du signal TFAM après marquage en immunofluorescence suite à l'induction des CDBmt est plus faible, ce qui suggère que la perte d'ADNmt, et donc sa dégradation, sont limitées lorsque MGME1 n'est pas exprimée (**Figure 83**). Nous devons maintenant confirmer ce résultat, qui semble dépendre fortement de l'efficacité des siRNA. Nous devons également élucider plus précisément le mécanisme d'action de MGME1 et ses éventuels partenaires car, comme discuté précédemment (2.4.2), cette nucléase a principalement une activité sur l'ADN simple-brin.

En fonction des résultats obtenus nous pourrons aussi étendre les gènes ciblés, en utilisant une librairie de siRNA plus complète, par exemple la librairie MitoCarta, contenant 1200 siRNA ciblant la quasi totalité du protéome mitochondrial. En effet cette méthode est relativement efficace puisqu'environ 80 gènes candidats peuvent être testés sur une même plaque 96 puits, et que l'analyse de la fluorescence peut être réalisée automatiquement. De plus il existe des plateformes où tout est automatisé et où il est possible de réaliser des cribles RNAi à l'échelle du génome.

L'identification des protéines responsables de la dégradation de l'ADNmt suite à la génération massive de dommages est l'une des perspectives majeure de ce projet. Ce crible RNAi pourrait permettre de déterminer des candidates de manière efficace, dont nous pourrons ensuite étudier le rôle plus précisément individuellement.

Annexes

Article 1

Selective mitochondrial DNA degradation following double-strand breaks



Citation: Moretton A, Morel F, Macao B, Lachaume P, Ishak L, Lefebvre M, et al. (2017) Selective mitochondrial DNA degradation following double-strand breaks. PLoS ONE 12(4): e0176795. <u>https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176795</u>

Editor: Maria Sola, Instituto de Biologia Molecular de Barcelona, SPAIN

Received: January 14, 2017

Accepted: April 17, 2017

Published: April 28, 2017

Copyright: © 2017 Moretton et al. This is an open access article distributed under the terms of the <u>Creative Commons Attribution License</u>, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by Clermont University; the Auvergne Region (Jeune Chercheur grant to GF); the LABEX PRIMES (ANR-11-LABX-0063) of Université de Lyon, within the program "Investissements d'Avenir" (ANR-11-IDEX-0007) operated by the French National Research Agency (ANR), the Swedish Research Council (2013-3621 to MF); Knut & Alice Wallenberg Foundation (to MF); The Swedish Cancer Foundation (CAN 2016/ RESEARCH ARTICLE

Selective mitochondrial DNA degradation following double-strand breaks

Amandine Moretton¹, Frédéric Morel¹, Bertil Macao², Philippe Lachaume¹, Layal Ishak¹, Mathilde Lefebvre¹, Isabelle Garreau-Balandier¹, Patrick Vernet¹, Maria Falkenberg², Géraldine Farge¹*

1 Université Clermont Auvergne, CNRS/IN2P3, Laboratoire de Physique de Clermont, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France, 2 Institute of Biomedicine, University of Gothenburg, P.O. Box 440, SE-405 30, Gothenburg, Sweden

* geraldine.farge@uca.fr

Abstract

Mitochondrial DNA (mtDNA) can undergo double-strand breaks (DSBs), caused by defective replication, or by various endogenous or exogenous sources, such as reactive oxygen species, chemotherapeutic agents or ionizing radiations. MtDNA encodes for proteins involved in ATP production, and maintenance of genome integrity following DSBs is thus of crucial importance. However, the mechanisms involved in mtDNA maintenance after DSBs remain unknown. In this study, we investigated the consequences of the production of mtDNA DSBs using a human inducible cell system expressing the restriction enzyme PstI targeted to mitochondria. Using this system, we could not find any support for DSB repair of mtDNA. Instead we observed a loss of the damaged mtDNA molecules and a severe decrease in mtDNA content. We demonstrate that none of the known mitochondrial nucleases are involved in the mtDNA degradation and that the DNA loss is not due to autophagy, mitophagy or apoptosis. Our study suggests that a still uncharacterized pathway for the targeted degradation of damaged mtDNA in a mitophagy/autophagy-independent manner is present in mitochondria, and might provide the main mechanism used by the cells to deal with DSBs.

Introduction

Mitochondria are cellular organelles that possess their own circular genome. The mitochondrial DNA (mtDNA) is compact, with no introns, and contains only 37 genes. Therefore, most of the proteins that are acting in mitochondria are encoded in the nucleus and imported into the mitochondria. Point mutations, deletions, but also depletion of mtDNA, are found in numerous pathologies, such as mitochondrial diseases [1], cancers [2], neurodegenerative disorders [3] and even during the normal ageing process [2, 4]. As oxidative phosphorylation takes place in the vicinity of the mitochondrial genome, mtDNA is believed to be prone to oxidative damage due to reactive oxygen species (ROS) [5]. Other mtDNA lesions, such as DNA breaks, can also occur during replication or repair of mtDNA [6]. If DNA damage is left unrepaired or is not correctly repaired it can lead to mutations, therefore accurate mtDNA





816 to MF); European Research Council (to MF). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

maintenance systems are essential for cell viability. In mitochondria, damage such as oxidative damage is mostly repaired by Base Excision Repair (BER). The proteins involved are well characterized and are mostly the same proteins as in the nuclear BER [7]. However, it remains unclear which mechanisms are responsible for mtDNA maintenance after double-strand breaks (DSBs). In Saccharomyces cerevisiae mtDSBs are repaired by homologous recombination, with the involvement of members of the RAD52 epistasis group [8]. Evidence of mtDSB repair has also been found in Drosophila cells [9]. However, although it has been shown that some of the factors needed for DSB repair in the nucleus are present in mammalian mitochondria, for example XRCC1 [10] or an alternate form of Ku80 [11], it is still debated whether or not mtDSBs are repaired in mammalian cells, and, if so, by which mechanisms. Some studies suggest that recombination occurs after mtDSBs, with intramolecular recombination being more frequent than intermolecular recombination [12]. In mouse models, it has been suggested that mtDSBs are repaired by non-homologous end-joining (NHEJ), with a region close to the D-loop being involved in most recombination events [13]. In contrast, another study has proposed that classical NHEJ is undetectable, but that instead microhomology-mediated end-joining (MMEJ) has a central role in the maintenance of mtDNA integrity after DSBs [14]. This result is supported by a study showing that around 85% of deletions in mtDNA of human cells are flanked by short repetitive sequences, suggesting the existence of recombination events [15].

A different scenario is that, after the generation of mtDSBs, the damaged mtDNA molecules undergo degradation. In most cells there are indeed thousands of mtDNA molecules, and the elimination of some of them should not compromise mitochondrial function. Little is known about the mechanisms of degradation of mtDNA which seems to occur in response to damage that mitochondria cannot repair [16, 17]. Different processes with different kinetics have been suggested, depending on the cell type [18]. The two most likely mechanisms proposed are (i), the degradation of the damaged mtDNA by nucleases and (ii), the elimination of the mitochondria carrying damaged mtDNA by autophagy/mitophagy. The actors of mtDNA degradation are currently unknown. To date, five DNA nucleases have been localized in the mitochondria: ExoG, EndoG, MGME1, DNA2 and FEN1, but their exact functions are still not completely elucidated [19]. ExoG is exclusively mitochondrial and has been implicated in BER and mitochondrial single-strand break repair [20]. EndoG is located in the mitochondrial intermembrane space and under certain conditions relocates to the nucleus where it could play a role in apoptosis [21] and in recombination [22]. MGME1, DNA2 and FEN1 are believed to be involved in mitochondrial primer processing during replication [23]. Moreover, MGME1 could also be implicated in intramolecular recombination of mtDNA [24] and in 7S DNA turn-over [25], whereas DNA2 and FEN1 may also play a role in mitochondrial BER [26, 27]. Damage repair or degradation of mutated mtDNA are not the only possibilities for the organism or the cell to maintain the integrity of its genome. If damage cannot be repaired, signaling pathways can also trigger apoptosis, leading to cell death, or induce fission mechanisms to segregate mitochondria with overwhelming damage, which will be eliminated by autophagy/mitophagy [28, 29].

There are three main techniques that have been developed to manipulate and create DSBs specifically in the mitochondrial genome [30]. In the first technique, restriction enzymes preceded by a mitochondrial targeting sequence (MTS) have been used to cut mtDNA at specific restriction sites [31]. Following this strategy, the use of the endonuclease EcoRI in human, mouse and rat cell lines has led to the generation of ρ^0 cells, devoid of mtDNA [32]. Mouse cells stably expressing mitochondrial SacI showed a similar pattern, with depletion of mtDNA but without a total loss. This strategy was also used *in vivo* on a mouse model containing two polymorphic mtDNA sequence variants, resulting in either three or five restriction sites for

SacI. After injection of recombinant viruses encoding for mitochondrial SacI in these animals, intra- and inter-molecular recombination events following mtDSBs were observed [13]. The two other techniques are based on zinc-finger nucleases (ZFNs) and transcription activator-like effector nucleases (TALENs). These two nucleases contain two domains, a DNA-cleaving domain and a DNA-binding domain specific to the targeted DNA sequence. All these techniques have mainly been used to develop therapeutic tools to cure mitochondrial diseases. Within the same mitochondria, mutated DNA can coexist with wild-type DNA, a phenomenon called heteroplasmy. With mtDNA disease mutations, the symptoms typically appear only when the heteroplasmy level in the patient's mitochondria reaches a certain threshold [33]. The preferential targeting of nucleases to mutant mtDNA molecules would thus eliminate them and decrease the heteroplasmy level, providing a possible treatment strategy. The remaining wild-type DNA could then be restored to normal levels through replication [34]. Such a shift in heteroplasmy level has for instance successfully been achieved with a ZFN-based approach in a cell model [35].

In this work we have used a human inducible cell system expressing the restriction enzyme PstI targeted to mitochondria. Induction of PstI resulted in an efficient generation of mtDSBs, followed by a fast loss of the damaged DNA molecules. We found that none of the known mitochondrial nucleases are involved in the mtDNA degradation process and that the DNA loss is not due to autophagy, mitophagy or apoptosis. We further established that the DNAloss phase is followed by a new amplification of intact mtDNA molecules but found no support for the existence of a DSB repair mechanism in mitochondria.

Materials and methods

Transfection and cell culture

The pcDNA3 vector containing the PstI gene flanked by the cytochrome c oxidase subunit VIII mitochondrial targeting sequence was a kind gift of Dr. Carlos Moraes. The construct was re-cloned in pcDNA5/FRT/TO vector (Invitrogen) and the resulting construct was confirmed by DNA sequencing. An inducible stable cell line expressing PstI was created using the Flp-In T-Rex 293 cell line (Invitrogen). Cells were co-transfected with the pcDNA5/FRT/TO construct and pOG44 (Invitrogen) -which encodes the Flp recombinase- at a molar ratio of 1:10 using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Forty-eight hours after transfection Hygromycin (150 μ g/mL) (Invivogen) and Blasticidin (15 μ g/mL) (Invivogen) were added to the medium for selection. Expression of PstI was induced by adding 1 μ g/mL doxycycline to the growth medium for the indicated time.

For siRNA down-regulation experiments, 0.5x10⁶ cells were transfected with a set of 2 or 3 siRNAs (5 to 20nM each) using Lipofectamine RNAiMAX in Opti-MEM medium. After 5h, Opti-MEM medium was replaced by fresh complete medium and cells were used for further analysis 3 days after transfection. The siRNAs used were the following: ExoG: HSS115057 (ThermoFisher Stealth siRNAs), s19298 (Ambion), SI03075534 (Qiagen); EndoG: s707 (Ambion), SI03083878 (Qiagen); MGME1: SI04336976 (Qiagen), HSS132389 and HSS132390 (ThermoFisher Stealth siRNAs); DNA2: HSS141856, HSS141857 and HSS141858 (Thermo-Fisher Stealth siRNAs); FEN1: HSS103627, HSS103629 and HSS176903 (ThermoFisher Stealth siRNAs). For experiments in which siRNA transfection was followed by PstI induction, doxy-cycline was added to the cells 3 days after siRNA transfection.

Transgenic cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with high glucose (GlutaMAX, Gibco), supplemented with 1mM Na pyruvate, 10% FCS (tetracycline free, Biowest), 100U/mL penicillin and streptomycin (HyClone, Thermo Scientific), 150 μ g/mL Hygromycin (Invivogen) and 15 μ g/mL Blasticidin (Invivogen). The non-transfected Flp-

In T-Rex 293 (referred to as wild-type in the experiments) were grown under similar conditions but without Hygromycin.

Southern blot analysis

Total DNA was isolated from 1-3x10⁶ cells using a NucleoSpin Tissue Kit (Macherey-Nagel). Nucleic acid concentration and purity were measured using a Nanodrop (Nanodrop ND-1000, Thermo Scientific). One microgram of DNA was digested with BamHI or BamHI and PstI. Digestion products were separated on 1% agarose gel and transferred on nylon membrane. The membranes were hybridized with radiolabeled mitochondrial probes and imaged using a phosphoimager (BioRad). Primers sequences used for producing mitochondrial probes were as follows: Hi890 fwd: 5'-CAC GGG CTT ACA TCC TCA TT-3'; Hi890 rev: 5'-TGG CTC AGT GTC AGT TCG AG-3'; Pst fwd: 5'-TTC ATG ATC ACG CCC TCA TA-3'; Pst rev: 5'-TTT TAT GGG CTT TGG TGA GG-3'; Sac fwd: 5'-GCT AA ACCT AGC CCC AAA CC-3'; Sac rev: 5'-AAA CAG GCG GGG TAA GAT TT-3'.

Real-time quantitative PCR

All reactions were performed on a MasterCycler RealPlex (Eppendorf) using MESA GREEN qPCR Mastermix Plus for SYBR Assay (Eurogentec). Copy numbers of mitochondrial DNA were determined by amplifying by real-time quantitative PCR a portion of the *cytochrome b* gene, using the single copy gene for amyloid precursor protein *APP* as a nuclear standard. The PCR (94°C for 2 min, 40 cycles of 94°C for 20s, 60.4°C for 20s and 72°C for 45s) were performed using 10ng of total DNA and the following primers: cytochrome b fwd: 5'-GCC TGC CTG ATC CTC CAA AT-3', cytochrome b rev: 5'-AAG GTA GCG GAT GAT TCA GCC-3'; APP fwd 5'-TTT TTG TGT GCT CTC CCA GGT CT-3', APP rev: 5'-TGG TCA CTG GTT GGT TGG C-3'. Each measurement was performed in duplicate. The specificity of the amplification is controlled by the analysis of the melting curve. The amplification efficiencies were determined with standard curves, performed for both primers pairs with different total DNA dilutions. The ratio of mitochondrial DNA / nuclear DNA was estimated using the cycle thresholds (C_T) values obtained.

The relative level of PstI mRNA was estimated by real-time quantitative PCR using the TBP transcript as an internal control. Total RNA was isolated from 0.5 to 1.5×10^6 cells using TRI Reagent (Molecular Research Center Inc.) according to the manufacturer's protocol. cDNAs were synthesized via random hexamer primers (Promega) and M-MLV Reverse Transcriptase (Promega). PCR (94°C for 2 minutes, 40 cycles of 94°C for 20 s, 60°C for 20 s, 72°C for 45 s) were performed using the following primers: PstI fwd: 5'-ATT ACA AGC CCA ATT CCC GC-3', PstI rev: 5'-TAG GAA CGT GGG TCA GGA AC-3'; TBP fwd: 5'-ACG CCA GCT TCG GAG AGT TC -3' and TBP rev: 5'-CAA ACC GCT TGG GAT TAT ATT CG-3'. A standard curve for each gene and for the internal control was generated using a dilution series (1:10 to 1:80) of cDNAs consisting of pooled cDNAs from each sample. Each quantification was performed in duplicate.

Western blot analysis

Total cell lysates were analyzed by SDS PAGE and immunoblotting. Primary antibodies used for western blotting were as follows: ATP5a, UQCR2, SDHB, COII, NDUFB8 (Abcam 110411, 1: 1000); 49KDa (home made, 1: 500); NDUFA9 (Abcam 14713, 1: 1000); H3 (Abcam 10799, 1: 10 000); Twinkle (home made, 1: 1000); TFAM (home made, 1: 5000); exoG (Proteintech 21523-1-AP, 1: 500); MGME1 (Sigma HPA040913, 1: 200); a-tubulin (Sigma T9026, 1: 5000); endoG (Abcam 9647, 1: 1000); Fen1 (home made, 1: 1000); PDH (MitoSciences MSP07, 1:

2500); Tomm20 (Abcam 56783, 1: 500); LC3B (Abcam 48394, 1: 2000); PINK1 (Abcam 75487, 1:1000). Secondary antibodies were as follows: Rabbit (HRP) anti-mouse (Sigma A9044, 1: 10 000) and Goat (HRP) anti-rabbit (Abliance BL2407, 1: 10 000). The detection of proteins was performed using Luminata forte western HRP Substrate (Millipore) or SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific). The relative abundance of specific proteins was evaluated by densitometric quantification of signal intensity, and analyzed using Quantity One image analysis software (BioRad).

Flow cytometry

All flow cytometry analyses were performed using an Attune Acoustic Focusing Cytometer. For mitochondrial mass measurements, cells were incubated 30 min with 150 nM MitoTracker Green FM (Molecular Probes) and washed with PBS. Cells were then harvested and washed twice with medium without phenol red. 5.10^5 cells/mL were used for each sample. A few minutes before FACS acquisition, cells were incubated on ice in the dark with a vital dye (SYTOX Blue Dead Cell Stain, Life Technologies) to exclude dead cells from the analysis. A negative control was treated with the same procedure but without MitoTracker staining. This negative control represents the background due to cell's autofluorescence. MitoTracker Green fluorescence was measured using a 488 nm laser and a 530/30 nm filter, and Sytox-blue fluorescence was measured using a 405 nm violet laser and a 450/40 nm filter. On average, 10000 events were analyzed per sample. A two gating strategy was performed to define the target cell population to analyze: first, to exclude dead cells and debris, cells were gated on a two physical parameters dot plot measuring forward scatter (FSC) versus side scatter (SSC), second, Sytox Blue-negative cells are gated. The mitochondrial mass was evaluated by the mean fluorescence intensity of the MitoTracker channel.

Cellular apoptosis was measured using the Dead Cell Apoptosis Kit with Annexin V Alexa Fluor 488 & Propidium Iodide (PI) (Molecular Probes) according to manufacturer's instructions. A positive control for apoptosis was treated with 2 μ M staurosporine for 4h before harvesting the cells. Cells floating in the medium were also collected for this analysis. Annexin V Alexa Fluor 488 fluorescence was determined using a 488 nm blue laser and a 530/30 nm filter and PI fluorescence using a 488 nm violet laser and a 575/24 nm filter. On average, 10000 events are analyzed per sample. To correct the spectral overlap between Alexa Fluor 488 and PI, a process of fluorescence compensation was used, with the sample treated with staurosporine. This ensured to remove signal of each fluorochrome from the channel of the other one where it was also detected. A gating strategy was performed to define the target cell population to analyze: to exclude debris, but not dead cells, cells were gated on a two physical parameters dot plot measuring forward scatter (FSC) versus side scatter (SSC). The gated cell population was next analyzed in a dot plot with quadrant gates measuring Alexa Fluor 488 versus PI fluorescence.

NGS

A fragment of mtDNA of 400-500bp surrounding the PstI restriction site located in the COX1 gene was amplified using Pfu DNA polymerase and primers containing Multiplex Identifiers (MIDs) for pooled sequencing. The sequences of the primers used are the following: WT-fwd 5'-CGT ATC GCC TCC CTC GCG CCA TCA GAC GAG TGC GTA GAC GTA GAC ACA CGA GCA T-3'; WT-rev 5'-CTA TGC GCC TTG CCA GCC CGC TCA GAC GCT CGA CAG CCG AGA AAG TGT TGT GGG A-3'; PstI-fwd 5'-CGT ATC GCC TCC CTC GCG CCA TCA GAC GAC ACA CGA GCA T-3'; PstI-rev 5'-CTA TGC GCC TCA GAC ACA CGA GCA T-3'; PstI-rev 5'-CTA TGC GCC TTG CCA GCA GCA T-3'; PstI-rev 5'-CTA TGC GCC TCA GAC ACA CGA GCA T-3'; PstI-rev 5'-CTA

GGG A-3'. PCR products were verified by electrophoresis on 1.2% agarose gels and purified using NucleoSpin Gel and PCR Clean-up according to the manufacturer's protocol (Macherey-Nagel). The DNA concentration of each purified PCR product was determined using Qubit dsDNA HS Assay Kit (Molecular Probes). Equal amounts of PCR amplicons harboring different barcode sequences were pooled together in an equimolar ratio and subjected to pyrosequencing using a Roche 454 GS-FLX+ Titanium platform executed by Eurofins MWG (Ebersberg, Germany). Sequencing data were analyzed using the GS Data Analysis Software (Roche).

Results

A massive production of mtDNA DSBs triggers a rapid loss of mtDNA

We were interested in understanding how mitochondria deal with the presence of DSBs in their genome. We thus needed a system to create DSBs specifically in the mitochondrial DNA. For this, we modified an existing system consisting of a restriction enzyme (PstI) fused to the mitochondrial targeting sequence of the human COX8 gene [36], and generated an inducible stable cell line (HEK293 FlpIn-TREx) expressing this enzyme. Using Southern blot, our first observation was that, even in the absence of induction with doxycycline, we always observed a basal leakiness of PstI expression (Fig 1B, lane 3). We then checked the efficiency of our system using 1 μ g/mL of doxycycline for different induction times ranging from 5min to 10h (not shown). After induction, we observed (Fig 1B) the band corresponding to the full-length mtDNA (16569bp), and bands corresponding to the PstI total (9225 bp, 5234 bp and 2110bp), and partial (14459 bp and 7344 bp) digestions of mtDNA (Fig 1A), showing that our system is functional. We found that 2h was enough to obtain an almost complete digestion of the mtDNA, therefore we set this induction time for all the subsequent experiments.

To assess the effect of DSBs on mtDNA, we induced the expression of PstI for 2h and followed the cells for a recovery period of up to 3 days after induction. The expression of PstI results in the digestion of mtDNA, which is followed by an extremely rapid loss of mtDNA, as evidenced by the Southern blot (Fig 1B) and qPCR (Fig 1C) results. After 2h induction (+0h), there is already a decrease of \sim 50% in the amount of mtDNA and, at 8h after induction (2h induction + 8h recovery), less than 10% of the mtDNA is left. Finally, between 1 and 3 days after induction, only a very small proportion of mtDNA ($\sim 2\%$) still remains. This drastic reduction in the mtDNA content is accompanied by a loss of TFAM (-60% at t = 4h and -85% at t = 8h), which is not surprising as the amount of TFAM is strongly correlated to the amount of mtDNA present in cells [37, 38] (Fig 1D). Additionally, we observed a loss of the mitochondrial-encoded subunit CO2 and of the nuclear-encoded NDUFB8 and UQCR2 subunits of the respiratory chain (Fig 1D). This decrease takes place at a later stage (t = 2days), which might be due to a larger stability of these proteins. During the experiment, we also monitored the amount of the other respiratory chain subunits as well as the quantity of mtDNA metabolism proteins (the replicative helicase and polymerase, TWINKLE and POLG) and, surprisingly, we found no significant changes in the amount of these proteins during the time course of the experiment (Fig 1D).

Depletion of 5 mitochondrial exo/endonucleases does not change the mtDNA-loss kinetics

Next, we evaluated the role of five known mitochondrial nucleases (EndoG, ExoG, MGME1, DNA2 and FEN1) in the fast mtDNA degradation process we observe after PstI digestion. We first followed by Western Blot the expression of these proteins for three days after induction of





https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176795.g001

DSBs (Fig 2A). In the case of DNA2, the antibody gave inconclusive results, so for that nuclease we used RTqPCR (not shown). We did not observe an obvious increase in the amount of any of these proteins during the fast mtDNA degradation phase (between 0 and +6h after induction). On the contrary, it seems that the amount of EndoG and MGME1 slightly decreased in parallel to the mtDNA loss. Second, we used siRNA to individually knock down EndoG, ExoG, MGME1, DNA2 and FEN1. The efficiency of the siRNA was verified by Western Blot (or RTqPCR for DNA2) (S1 Fig). Three days after siRNA transfection, PstI expression

PLOS ONE



Fig 2. Effect of silencing different mitochondrial DNA nucleases on the rapid mtDNA depletion. A. Levels of different mitochondrial DNA nucleases before induction and during the recovery period after induction of PstI for 2h with doxycycline. Total cell lysates (20 μg) were analyzed by western blot with antibodies against ExoG, EndoG, MGME1, and FEN1. H3: Histone H3B (loading control). B. Southern blot analysis of the control HEK293 cells (WT) and stably transfected cells (PstI cells) after digestion by BamHI or BamHI + PstI for the control. The cells were grown in presence or absence of a mix of siRNAs targeting ExoG and/or EndoG. Three days after siRNA transfection, doxycycline was added to the cells for 2h to induce PstI expression, and the cell's DNA was examined before induction and during the recovery period, at 0h, 5h and 1 day after induction. **C**, **D**, **E**. Similar experiments as in 2B, except that the siRNAs were targeting MGME1, DNA2 or FEN1, respectively.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176795.g002

was induced and the cell's mtDNA was analyzed at time 0h, 5h and 1 day after induction (Fig 2B–2E). As observed previously, the expression of PstI results in a fast loss of mtDNA. However, we did not detect any modification of the kinetics of mtDNA loss upon siRNA knock-down of any of the targets. As we suspected a redundancy in the role of these proteins, we performed a double knock-down of ExoG and EndoG (Fig 2B) as well as a simultaneous knock-down of the five nucleases (S2 Fig). The results were however similar, i.e. no change in the kinetics of mtDNA loss. We thus conclude that these proteins are unlikely to be involved in the fast mtDNA loss that occurs after generating DSBs.

mtDNA loss is not due to a loss of mitochondria

Currently, the general belief is that, when mtDNA is damaged, it is eliminated via autophagy/ mitophagy [<u>39</u>, <u>40</u>]. We thus set out to investigate if the loss of mtDNA we observed could be



Fig 3. The rapid loss of mtDNA is not correlated to a loss of mitochondria, autophagy or apoptosis. Levels of A. mitochondrial proteins and C. an autophagy marker before induction and during the recovery period after induction of Pstl for 2h with doxycycline. Total cell lysates (20 μ g) were analyzed by western blot with antibodies against markers of the mitochondrial matrix (PDH), mitochondrial outer membrane (Tomm20), autophagy (LC3) and mitophagy (PINK1). CCCP is used as a positive control and Tubulin is used as loading control. Analysis of **B**. cell mitochondrial content and **D**. apoptosis by flow cytometry before induction and during the recovery period. * $P \leq 0.05$ versus non-induced Pstl cells for each cell population (Student's t-test).

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176795.g003

explained by a loss of mitochondria due to autophagy. First, using Western blot, we determined the amount of two mitochondrial markers, a mitochondrial matrix enzyme (PDH, pyruvate dehydrogenase) and a membrane protein (TOMM20, translocase of outer mitochondrial membrane). As shown on Fig 3A, the amount of these proteins remained unchanged up to 3 days after induction of DSBs, whereas mtDNA has almost completely disappeared after 8h after DSBs induction (Fig 1). Second, we estimated the mitochondrial mass by flow cytometry using MitoTracker Green. After induction of DSBs, we did not observe a decrease of the mitochondrial mass, instead, a slight increase could be observed at day 3 after DSBs induction (Fig 3B). To further elucidate if the mtDNA loss is due to autophagy/mitophgy, we estimated the amount of a marker of autophagy (LC3) and a marker of mitophagy (PINK1) by Western blot during the recovery period after DSBs induction (Fig 3C). As a positive control we used HEK293 WT cells treated for 18h with 10 µM or 20 µM CCCP. CCCP is an uncoupling agent known to induce generalized autophagy [41] and mitophagy [42]. Again, no change in the amount of these markers could be observed, supporting the hypothesis that that mtDNA degradation is not due to a degradation of mitochondria via autophagy/mitophagy. Finally, we also showed by flow cytometry using annexin V and PI staining that mtDNA degradation was not due to a loss of the cells by apoptosis (Fig 3D). These data show that mtDNA loss is not

due to a loss of mitochondria by autophagy, mitophagy or apoptosis but may, on the contrary, trigger a slight increase of the amount of mitochondria, which could reflect a compensatory mechanism.

Repopulation of cells with Pstl-resistant mtDNA molecules

Our results point to a rapid degradation of mtDNA as a consequence of a massive production of DSBs. However, although it remains debated, it has been suggested that human mitochondria have the capability of repairing DSBs via homologous recombination or NHEJ [12]. We thus decided to follow the cells for a longer period of time (up to 40 days after DSBs induction) to see if the degradation phase could be followed/accompanied by a repair mechanism. We observed that the initial period of mtDNA loss was followed by a slow return of full-length mtDNA molecules, starting around 6 days after DSBs induction (Fig 4A, lane 5). The amount of mtDNA slowly increased to a peak value roughly 20 days after induction (Fig 4B). Surprisingly, at this stage, we could observe only the full-length mtDNA molecules, and no partially or totally digested molecules. Moreover, a second induction with doxycycline at day 21 only produced a slight digestion of the mtDNA molecules (Fig 4B, orange bars). In order to find the cause of this apparent 'resistance' to PstI digestion, we first tested the presence of mutations in the PstI sites of the newly amplified mtDNA population. Mutations could be due to (i), a polymorphism in the PstI sites in the original mtDNA population that would have been selectively amplified, or (ii), a repair of some of the mtDNA molecules by an unfaithful repair mechanism (i.e. NHEJ) that would have created mutations within the PstI site. Using NGS, we sequenced a stretch of \sim 100bp containing the PstI site located in the COX1 gene. We analyzed ~40000 mtDNA molecules from PstI cells at day 13 after induction and compared them to \sim 40000 from wild-type cells. We found that the only interesting mutation was an A to G transition that modifies the PstI site (Table 1). This mutation was more than 20 times more abundant in the PstI cells than in the wild-type cells (0.86% vs. 0.04%). However, although significantly increased compared to wild-type, this percentage of mutation within the PstI site cannot explain the apparent resistance to PstI observed by Southern blot, where a large majority of the mtDNA molecules (estimation 95%) is not digested by PstI. We next hypothesized that the apparent 'resistance' was caused by a loss of expression of PstI. We performed RTqPCR and found that, indeed, after 6 days, the expression of PstI has nearly vanished (Fig 4C). After a second induction (orange bars), a slight expression of PstI can be observed, close to the level of the leakage in the non-induced PstI cells, but much lower than the level of expression of PstI after the first induction (grey bars). We thus conclude that the newly amplified molecules are not 'resistant' to PstI digestion because of the amplification of a mutated version of the mtDNA (either due to polymorphism or repair) but to an extinction of PstI expression over time.

Discussion

In this study, we investigated the consequences of the production of mitochondrial DSBs. *In vivo*, these damages can be generated by replication fork arrest, endogenous or exogenous sources such as exposure to ROS produced during the oxidative phosphorylation, viruses, ultraviolet and ionizing radiation or other clastogens. To create mtDSBs in a controlled way, we used an inducible system targeted to the mitochondria. Cells were stably transfected with the restriction enzyme PstI fused to a mitochondrial targeting sequence and under the control of a promoter inducible with doxycycline. After doxycycline induction we efficiently obtained DSBs specifically on mtDNA, located at the PstI restriction sites. The use of an inducible system has the advantage to control the amount of mtDSBs created. However, the cells that we





Fig 4. The loss of mtDNA is followed by a slow repopulation with intact mtDNA molecules. A. Southern blot analysis of the control HEK293 cells (WT) and stably transfected cells (Pstl cells) after digestion by BamHI or BamHI + Pstl for the control. Pstl expression was induced for 2h with doxycycline and cells were followed for 20 days. At day 20, a second induction of 2h with doxycycline was performed and the cells were followed during the second recovery period (marked with an apostrophe). B. Quantification of the mtDNA/ nDNA ratios in the Pstl stably transfected cells, from 0h to 41 days after a 2h induction with doxycycline and
from 0h to 20days after a second 2h doxycycline induction. (mean \pm s.e., N = 3). **C**. Quantification of the level of PstI transcripts in the control HEK293 cells (WT) and stably transfected cells (PstI cells), during 2 sequential inductions of PstI expression with doxycycline (mean \pm s.e., N = 3). TBP is used as a reference RNA.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176795.g004

used showed a background expression of PstI even in the absence of the inducer. This basal leakiness was present in all the clonal populations we checked even thought we used tetracycline-free serum. Transgene leakage in inducible overexpression systems is a recurrent problem [43]. In our case, even if the leakiness enabled us to study the impact of a low amount of mtDSBs on the cells and on mtDNA (which would not be possible with a constitutive system), it questions the efficiency of such an inducible system in conditions where a total on/off system is required. Nonetheless, as even the lowest possible PstI expression can be expected to give at least some mtDNA digestion, the analysis of non-induced cells show this has very little effect on cell growth, even when the cells were cultivated in low glucose or galactose media, showing that cells can thus cope well with this level of damage. It is also interesting to note that in our system, a second induction with doxycycline following the first digestion and a period of recovery, led to almost complete loss of expression of PstI. The reasons of this silencing are still unclear, but it could be that epigenetics mechanisms come into play in response to the damage caused to the cells after the first induction in order to inactivate the foreign gene. It is also possible that some cells underwent rearrangement in the PstI coding sequence/regulatory regions and thus lost their inducibility.

Data on mammalian mtDNA repair after DSBs are rather controversial. In mouse, there are suggestions of mtDNA deletions caused by mtDNA recombination events following DSBs induction by the mitochondrial-targeted endonucleases ScaI [13] and PstI [36]. In both cases, a region close to the D-loop was involved in most recombination events. On the contrary, in human osteosarcoma cells, no recombination could be detected at significant level after the use of PstI targeted to mitochondria [31]. In vitro studies on digested plasmids have also indicated the ability of human and rodent mitochondria to perform MMEJ, the efficiency of the recombination being increased with the length of homology [14, 29]. On the contrary, it has also been suggested that the formation of deletions was not due to MMEJ or homologous recombination but was the result of a repair mechanism coupled to mtDNA replication and mediated by the replisome [44]. In our experiments, the induction of PstI expression resulted in the generation of a massive amount of DSBs. The majority of the cut mtDNA molecules was rapidly degraded but could, after a recovery time, slowly repopulate the cells. In order to understand this repopulation, we sequenced 100 bp of mtDNA containing one of the two PstI sites. Interestingly, we did not find any mutations or short deletions that could suggest repair by NHEJ or MMEJ. The only difference we could notice after DSBs generation was an increase in the proportion of a point mutation in the PstI restriction site, probably reflecting an amplification of a pre-existing polymorphism. Finally, after induction of mtDSBs we observed an

Table 1. Sequencing of the Pst1 site.

Pst1 sequence	С		т	G	С	Α	G
Mutation	C/A	C/T	T/C	G/A	C/T	A/G	G/A
WTcells	0%	0.04%	0.02%	0.06%	0.02%	0.04%	0.05%
Pst1 cells	0.01%	0%	0%	0.02%	0.04%	0.86%	0.01%

Sequencing was performed for the control cells (WT) and stably transfected cells (Pst1) 13 days after Pst1 induction (~40 000 reads for each).

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176795.t001

almost total loss of mtDNA, which argues against an efficient repair system of DSBs in our cell model (HEK293) upon generation of a massive amount of DSBs. Although it is impossible to completely rule out that homologous recombination (which is error-free) did not occur in our system, it seems very unlikely or must be a very rare event since most of the mtDNA molecules were rapidly degraded.

After generation of a large amount of mtDSBs we observed a massive and rapid loss of the mitochondrial genome (Fig 1B & 1C). Our data are in line with previous studies using restriction endonucleases targeted to mitochondria, showing either a shift from heteroplasmy to a unique mtDNA haplotype, not recognized by the restriction enzyme [45, 46] or a total or almost total loss of the mitochondrial genome, in case of homoplasmy [31, 32]. A total loss of mtDNA (generation of ρ^0 cells) was however only obtained in the case of a constitutive expression of the enzyme [32]. An important depletion of mtDNA followed by a repopulation after withdrawal of the inducer was also observed when damages to mtDNA were generated with the use of the bacterial exonuclease III, which creates single-strand breaks [17]. One hypothesis that can explain the loss of mtDNA is the elimination of the damaged mitochondria via autophagy/mitophagy or by massive apoptosis. Several studies point in this direction in different organisms. For instance, in the nematode, knockdown studies showed that removal of helixdistorting mtDNA damage caused by UVC exposure involved genes in autophagy and mitochondrial dynamics [47]. In mammalian cells, mitophagy triggered by an overexpression of Parkin has been shown to be responsible for the elimination of mitochondria containing mtDNA with deleterious mutations [48]. Similarly, upregulation of mitochondrial dynamics and mitophagy has been shown to correlate with efficient removal of a pathological mutant mtDNA in a cell-type-dependent manner [49]. However, the rate of mtDNA loss we observed here is extremely fast (starting within 2h, almost complete after 1 day), while we only observed slight alterations in apoptosis and mitochondrial mass at the later stages during recovery after induction (Fig 3B & 3D). Quantification of LC3 and PINK1 during the kinetics of mtDNA loss also showed no increase of these markers of autophagy and mitophagy (Fig 3C), confirming that these mechanisms are unlikely responsible for the loss of mtDNA in our system. The massive and rapid loss of mtDNA is therefore not due to elimination of the whole mitochondria but probably due to a still unknown mechanism directly processing damaged mtDNA. The rate of mtDNA degradation we observed is consistent with results published by Shokolenko et al., who detected a substantial elimination of mitochondrial genome after 6h to 1day after induction of mutated UNG1 or exoIII expression (generation of abasic site or single-strand breaks) [17]. This fast rate of mtDNA loss cannot be due to a blockage of mtDNA replication, as mtDNA loss following the expression of a dominant inactive form of the replication DNA polymerase (POLG) takes more than 6 days in HEK cells [50].

To test the hypothesis of more direct (and enzymatic) degradation of mtDNA following DSBs in our system, we searched for proteins that could be involved in this process and therefore we tested the five DNA nucleases known to be present in the mitochondria. Our two first obvious candidates were ExoG and EndoG. ExoG is solely located in the mitochondria and is the major 5'-exonuclease for mitochondrial LP-BER and single-strand break repair. Cells depleted in ExoG accumulate more DNA damages and develop mitochondrial dysfunctions triggering apoptosis [20]. EndoG has been well studied over the last decades, but its molecular function in mitochondria is still unclear. It plays a role in DNA metabolism in both mitochondria and nucleus, in various processes such as apoptosis [51] or nuclear recombination [52]. Recently its crystal structure in complex with DNA demonstrated that it has a strong non-specific endonuclease activity [53]. It has also been suggested that these two proteins could contribute to the mtDNA degradation observed following HSV infection [54]. FEN1 and DNA2 are believed to be involved in BER pathway in both nucleus and mitochondria. They can

process intermediate 5' flap structures during DNA replication and long-patch BER [26, 27]. MGME1 is also implied in primer processing occurring in mtDNA replication [23]. Its depletion leads to accumulation of mitochondrial 7S and intermediates of stalled replication [55]. Here, using a knockdown approach, the depletion of these enzymes did not change the kinetics of mtDNA loss, showing that these proteins are unlikely to be involved in the removal of linear mtDNA fragments created after mtDSBs.

Conclusion

The redundancy of the mitochondrial genome can explain why cells are quite tolerant to mtDNA depletion and can lose a substantial proportion of their mtDNA without impeding mitochondrial function. We observed that the cells used in this study can survive a major deficiency in mtDNA, even when we cultivate them in low glucose or in galactose media (not shown). Our work argues against the existence of a DSB repair pathway in mitochondria and instead supports the existence of a pathway for the targeted degradation of damaged mtDNA in a mitophagy/autophagy-independent manner. Future studies will reveal the identity of the proteins involved.

Supporting information

S1 Fig. Western blot of the silenced proteins. Cell pellets were collected for Western blot 72h post-transfection with siRNA against **A**. EndoG, ExoG, **B**. MGME1 and **C**. FEN1. (TIF)

S2 Fig. Effect of the simultaneous silencing of five mitochondrial nucleases on the rapid mtDNA loss. Southern blot analysis of the control HEK293 cells (WT) and stably transfected cells (PstI cells) after digestion by BamHI or BamHI + PstI for the control. The cells were grown in presence or absence of a mix of siRNAs targeting ExoG, EndoG, FEN1, DNA2 and MGME1. Three days after siRNA transfection, doxycycline was added to the cells for 2h to induce PstI expression, and the cell's DNA was examined before induction and during the recovery period, at 0h, 5h and 1 day after induction. (TIF)

Acknowledgments

The authors would like to thank Carlos Moraes (University of Miami Miller School of Medicine, Dept. of Neurology and Cell Biology) for the kind gift of the PstI construct.

Author Contributions

Conceptualization: FM PL PV MF GF. Data curation: GF. Formal analysis: AM. Funding acquisition: GF PV. Investigation: AM FM BM LI ML IGB GF. Methodology: AM GF. Project administration: GF. Resources: PV MF.

Supervision: GF.

Validation: GF FM.

Visualization: AM GF.

Writing - original draft: AM GF.

Writing - review & editing: FM PV MF PL BM.

References

- Liang C, Ahmad K, Sue CM. The broadening spectrum of mitochondrial disease: Shifts in the diagnostic paradigm. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)—General Subjects. 2014; 1840(4):1360–1367. <u>https:// doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.10.040</u>
- McCrow JP, Petersen DC, Louw M, Chan EKF, Harmeyer K, Vecchiarelli S, et al. Spectrum of mitochondrial genomic variation and associated clinical presentation of prostate cancer in South African men. The Prostate. 2015; 76(4):349–358. <u>https://doi.org/10.1002/pros.23126</u> PMID: <u>26660354</u>
- Cha MY, Kim DK, Mook-Jung I. The role of mitochondrial DNA mutation on neurodegenerative diseases. Experimental & molecular medicine. 2015; 47(3):e150. <u>https://doi.org/10.1038/emm.2014.122</u>
- Herbst A, Wanagat J, Cheema N, Widjaja K, McKenzie D, Aiken JM. Latent mitochondrial DNA deletion mutations drive muscle fiber loss at old age. Aging Cell. 2016; <u>https://doi.org/10.1111/acel.12520</u> PMID: <u>27561813</u>
- Milani L, Ghiselli F. Mitochondrial activity in gametes and transmission of viable mtDNA. Biology Direct. 2015; 10(1). <u>https://doi.org/10.1186/s13062-015-0057-6</u> PMID: <u>25981894</u>
- Alexeyev M, Shokolenko I, Wilson G, LeDoux S. The Maintenance of Mitochondrial DNA Integrity– Critical Analysis and Update. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. 2013; 5(5):a012641– a012641. <u>https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012641</u> PMID: <u>23637283</u>
- Muftuoglu M, Mori MP, de Souza-Pinto NC. Formation and repair of oxidative damage in the mitochondrial DNA. Mitochondrion. 2014; 17:164–181. <u>https://doi.org/10.1016/j.mito.2014.03.007</u> PMID: 24704805
- Stein A, Kalifa L, Sia EA. Members of the RAD52 Epistasis Group Contribute to Mitochondrial Homologous Recombination and Double-Strand Break Repair in Saccharomyces cerevisiae. PLoS Genet. 2015; 11(11):e1005664. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005664 PMID: 26540255
- Morel F, Renoux M, Lachaume P, Alziari S. Bleomycin-induced double-strand breaks in mitochondrial DNA of Drosophila cells are repaired. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. 2008; 637(1-2):111–117. <u>https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2007.07.007</u> PMID: 17825327
- Wisnovsky S, Jean SR, Kelley SO. Mitochondrial DNA repair and replication proteins revealed by targeted chemical probes. Nature Chemical Biology. 2016; 12(7):567–573. <u>https://doi.org/10.1038/</u> nchembio.2102 PMID: 27239789
- Coffey G, Campbell C. An alternate form of Ku80 is required for DNA end-binding activity in mammalian mitochondria. Nucleic Acids Research. 2000; 28(19):3793–3800. <u>https://doi.org/10.1093/nar/28.19.</u> 3793 PMID: <u>11000272</u>
- Kazak L, Reyes A, Holt IJ. Minimizing the damage: repair pathways keep mitochondrial DNA intact. Nature Reviews Molecular Cell Biology. 2012; 13(10):659–671. <u>https://doi.org/10.1038/nrm3439</u> PMID: 22992591
- Bacman SR, Williams SL, Moraes CT. Intra- and inter-molecular recombination of mitochondrial DNA after in vivo induction of multiple double-strand breaks. Nucleic Acids Research. 2009; 37(13): 4218–4226. https://doi.org/10.1093/nar/gkp348 PMID: 19435881
- Tadi SK, Sebastian R, Dahal S, Babu RK, Choudhary B, Raghavan SC. Microhomology-mediated end joining is the principal mediator of double-strand break repair during mitochondrial DNA lesions. Molecular Biology of the Cell. 2015; 27(2):223–235. <u>https://doi.org/10.1091/mbc.E15-05-0260</u> PMID: <u>26609070</u>
- Krishnan KJ, Reeve AK, Samuels DC, Chinnery PF, Blackwood JK, Taylor RW, et al. What causes mitochondrial DNA deletions in human cells? Nature Genetics. 2008; 40(3):275–279. <u>https://doi.org/10. 1038/ng.f.94</u> PMID: <u>18305478</u>
- Furda AM, Marrangoni AM, Lokshin A, Houten BV. Oxidants and not alkylating agents induce rapid mtDNA loss and mitochondrial dysfunction. DNA Repair. 2012; 11(8):684–692. <u>https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2012.06.002</u> PMID: <u>22766155</u>

- Shokolenko IN, Wilson GL, Alexeyev MF. Persistent damage induces mitochondrial DNA degradation. DNA Repair. 2013; 12(7):488–499. <u>https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2013.04.023</u> PMID: 23721969
- Shokolenko IN, Wilson GL, Alexeyev MF. The "fast" and the "slow" modes of mitochondrial DNA degradation. Mitochondrial DNA. 2014; 27(1):490–498. <u>https://doi.org/10.3109/19401736.2014.905829</u>
 PMID: <u>24724936</u>
- Bruni F, Lightowlers RN, Chrzanowska-Lightowlers ZM. Human mitochondrial nucleases. The FEBS Journal. 2016; PMID: <u>27926991</u>
- Tann AW, Boldogh I, Meiss G, Qian W, Houten BV, Mitra S, et al. Apoptosis Induced by Persistent Single-strand Breaks in Mitochondrial Genome: CRITICAL ROLE OF EXOG (5'-EXO/ENDONUCLEASE) IN THEIR REPAIR. Journal of Biological Chemistry. 2011; 286(37):31975–31983. <u>https://doi.org/10.1074/jbc.M110.215715 PMID: 21768646</u>
- Zhdanov DD, Fahmi T, Wang X, Apostolov EO, Sokolov NN, Javadov S, et al. Regulation of Apoptotic Endonucleases by EndoG. DNA and Cell Biology. 2015; 34(5):316–326. <u>https://doi.org/10.1089/dna.</u> 2014.2772 PMID: 25849439
- Robertson AB, Robertson J, Fusser M, Klungland A. Endonuclease G preferentially cleaves 5-hydroxymethylcytosine-modified DNA creating a substrate for recombination. Nucleic Acids Research. 2014; 42(21):13280–13293. <u>https://doi.org/10.1093/nar/gku1032</u> PMID: <u>25355512</u>
- Uhler JP, Falkenberg M. Primer removal during mammalian mitochondrial DNA replication. DNA Repair. 2015; 34:28–38. <u>https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2015.07.003</u> PMID: <u>26303841</u>
- Nicholls TJ, Zsurka G, Peeva V, Scholer S, Szczesny RJ, Cysewski D, et al. Linear mtDNA fragments and unusual mtDNA rearrangements associated with pathological deficiency of MGME1 exonuclease. Human Molecular Genetics. 2014; 23(23):6147–6162. <u>https://doi.org/10.1093/hmg/ddu336</u> PMID: 24986917
- Szczesny RJ, Hejnowicz MS, Steczkiewicz K, Muszewska A, Borowski LS, Ginalski K, et al. Identification of a novel human mitochondrial endo-/exonuclease Ddk1/c20orf72 necessary for maintenance of proper 7S DNA levels. Nucleic Acids Research. 2013; 41(5):3144–3161. <u>https://doi.org/10.1093/nar/ gkt029</u> PMID: 23358826
- Zheng L, Zhou M, Guo Z, Lu H, Qian L, Dai H, et al. Human DNA2 Is a Mitochondrial Nuclease/Helicase for Efficient Processing of DNA Replication and Repair Intermediates. Molecular Cell. 2008; 32(3):325– 336. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.09.024 PMID: 18995831
- Liu P, Qian L, Sung JS, de Souza-Pinto NC, Zheng L, Bogenhagen DF, et al. Removal of Oxidative DNA Damage via FEN1-Dependent Long-Patch Base Excision Repair in Human Cell Mitochondria. Molecular and Cellular Biology. 2008; 28(16):4975–4987. <u>https://doi.org/10.1128/MCB.00457-08</u> PMID: <u>18541666</u>
- Chen Y, Sparks M, Bhandari P, Matkovich SJ, Dorn GW. Mitochondrial Genome Linearization Is a Causative Factor for Cardiomyopathy in Mice and Drosophila. Antioxidants & Redox Signaling. 2014; 21(14):1949–1959. <u>https://doi.org/10.1089/ars.2013.5432</u> PMID: <u>23909626</u>
- Houten BV, Hunter SE, Meyer JN. Mitochondrial DNA damage induced autophagy cell death and disease. Frontiers in Bioscience. 2016; 21(1):42–54. https://doi.org/10.2741/4375
- Bacman SR, Williams SL, Pinto M, Moraes CT. The Use of Mitochondria-Targeted Endonucleases to Manipulate mtDNA. In: Methods in Enzymology. Elsevier BV; 2014. p. 373–397.
- Srivastava S, Moraes CT. Manipulating mitochondrial DNA heteroplasmy by a mitochondrially targeted restriction endonuclease. Human Molecular Genetics. 2001; 10(26):3093–3099. <u>https://doi.org/10. 1093/hmg/10.26.3093</u> PMID: 11751691
- Kukat A, Kukat C, Brocher J, Schafer I, Krohne G, Trounce IA, et al. Generation of rho0 cells utilizing a mitochondrially targeted restriction endonuclease and comparative analyses. Nucleic Acids Research. 2008; 36(7):e44–e44. <u>https://doi.org/10.1093/nar/gkn124</u> PMID: <u>18353857</u>
- Schon EA, DiMauro S, Hirano M. Human mitochondrial DNA: roles of inherited and somatic mutations. Nat Rev Genet. 2012; 13(12):878–890. https://doi.org/10.1038/nrg3275 PMID: 23154810
- Nightingale H, Pfeffer G, Bargiela D, Horvath R, Chinnery PF. Emerging therapies for mitochondrial disorders. Brain. 2016; 139(6):1633–1648. <u>https://doi.org/10.1093/brain/aww081</u> PMID: 27190030
- **35.** Gammage PA, Gaude E, Haute LV, Rebelo-Guiomar P, Jackson CB, Rorbach J, et al. Near-complete elimination of mutant mtDNA by iterative or dynamic dose-controlled treatment with mtZFNs. Nucleic Acids Res. 2016; p. gkw676.
- Srivastava S. Double-strand breaks of mouse muscle mtDNA promote large deletions similar to multiple mtDNA deletions in humans. Human Molecular Genetics. 2005; 14(7):893–902. <u>https://doi.org/10. 1093/hmg/ddi082</u> PMID: <u>15703189</u>
- Kanki T, Ohgaki K, Gaspari M, Gustafsson CM, Fukuoh A, Sasaki N, et al. Architectural Role of Mitochondrial Transcription Factor A in Maintenance of Human Mitochondrial DNA. Molecular and Cellular

Biology. 2004; 24(22):9823–9834. <u>https://doi.org/10.1128/MCB.24.22.9823-9834.2004</u> PMID: <u>15509786</u>

- Ekstrand MI. Mitochondrial transcription factor A regulates mtDNA copy number in mammals. Human Molecular Genetics. 2004; 13(9):935–944. <u>https://doi.org/10.1093/hmg/ddh109</u> PMID: <u>15016765</u>
- Busch KB, Kowald A, Spelbrink JN. Quality matters: how does mitochondrial network dynamics and quality control impact on mtDNA integrity? Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. 2014; 369(1646):20130442–20130442. https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0442
- Diot A, Morten K, Poulton J. Mitophagy plays a central role in mitochondrial ageing. Mammalian Genome. 2016; 27(7-8):381–395. <u>https://doi.org/10.1007/s00335-016-9651-x</u> PMID: <u>27352213</u>
- Chen TJ, Gao F, Yang T, Thakur A, Ren H, Li Y, et al. CDK-associated Cullin 1 promotes cell proliferation with activation of ERK1/2 in human lung cancer A549 cells. Biochemical and biophysical research communications. 2013; 437(1):108–113. <u>https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.06.048</u> PMID: <u>23806693</u>
- Narendra D, Tanaka A, Suen DF, Youle RJ. Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. The Journal of cell biology. 2008; 183(5):795–803. <u>https://doi.org/10.1083/jcb.200809125</u> PMID: <u>19029340</u>
- 43. Meyer-Ficca ML, Meyer RG, Kaiser H, Brack AR, Kandolf R, Küpper JH. Comparative analysis of inducible expression systems in transient transfection studies. Analytical biochemistry. 2004; 334(1):9–19. <u>https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.07.011</u> PMID: <u>15464949</u>
- Phillips AF, Millet AR, Tigano M, Dubois SM, Crimmins H, Babin L, et al. Single-Molecule Analysis of mtDNA Replication Uncovers the Basis of the Common Deletion. Molecular Cell. 2017; 65(3):527–538. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.12.014 PMID: 28111015
- Alexeyev M, Venediktova N, Pastukh V, Shokolenko I, Bonilla G, Wilson G. Selective elimination of mutant mitochondrial genomes as therapeutic strategy for the treatment of NARP and MILS syndromes. Gene therapy. 2008; 15(7):516–523. <u>https://doi.org/10.1038/gt.2008.11</u> PMID: <u>18256697</u>
- 46. Tanaka M, Borgeld HJ, Zhang J, Muramatsu Si, Gong JS, Yoneda M, et al. Gene therapy for mitochondrial disease by delivering restriction endonucleaseSmal into mitochondria. Journal of biomedical science. 2002; 9(6):534–541. https://doi.org/10.1159/000064726 PMID: 12372991
- Bess AS, Crocker TL, Ryde IT, Meyer JN. Mitochondrial dynamics and autophagy aid in removal of persistent mitochondrial DNA damage in Caenorhabditis elegans. Nucleic acids research. 2012; 40(16): 7916–7931. <u>https://doi.org/10.1093/nar/gks532</u> PMID: 22718972
- Suen DF, Narendra DP, Tanaka A, Manfredi G, Youle RJ. Parkin overexpression selects against a deleterious mtDNA mutation in heteroplasmic cybrid cells. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2010; 107(26):11835–11840. https://doi.org/10.1073/pnas.0914569107
- 49. Malena A, Pantic B, Borgia D, Sgarbi G, Solaini G, Holt IJ, et al. Mitochondrial quality control: Cell-typedependent responses to pathological mutant mitochondrial DNA. Autophagy. 2016; 12(11):2098–2112. <u>https://doi.org/10.1080/15548627.2016.1226734</u> PMID: <u>27627835</u>
- 50. Jazayeri M, Andreyev A, Will Y, Ward M, Anderson CM, Clevenger W. Inducible Expression of a Dominant Negative DNA Polymerase-γ Depletes Mitochondrial DNA and Produces a ρ0 Phenotype. Journal of Biological Chemistry. 2003; 278(11):9823–9830. <u>https://doi.org/10.1074/jbc.M211730200</u> PMID: 12645575
- Kalinowska M, Garncarz W, Pietrowska M, Garrard W, Widlak P. Regulation of the human apoptotic DNase/RNase endonuclease G: involvement of Hsp70 and ATP. Apoptosis. 2005; 10(4):821–830. https://doi.org/10.1007/s10495-005-0410-9 PMID: 16133872
- Huang KJ, Ku CC, Lehman IR. Endonuclease G: a role for the enzyme in recombination and cellular proliferation. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2006; 103(24):8995–9000. <u>https://doi.org/10.1073/pnas.0603445103</u>
- Lin JL, Wu CC, Yang WZ, Yuan HS. Crystal structure of endonuclease G in complex with DNA reveals how it nonspecifically degrades DNA as a homodimer. Nucleic Acids Research. 2016; p. gkw931. <u>https://doi.org/10.1093/nar/gkw931</u>
- Duguay BA, Smiley JR. Mitochondrial nucleases ENDOG and EXOG participate in mitochondrial DNA depletion initiated by herpes simplex virus 1 UL12.5. Journal of virology. 2013; 87(21):11787–11797. <u>https://doi.org/10.1128/JVI.02306-13</u> PMID: <u>23986585</u>
- Kornblum C, Nicholls TJ, Haack TB, Schöler S, Peeva V, Danhauser K, et al. Loss-of-function mutations in MGME1 impair mtDNA replication and cause multisystemic mitochondrial disease. Nature genetics. 2013; 45(2):214–219. <u>https://doi.org/10.1038/ng.2501</u> PMID: 23313956

Article 2

DNA maintenance following bleomycin-induced strand breaks doesnot require poly(ADP-ribosyl)ation activation in *Drosophila* S2 cells

DNA Repair 48 (2016) 8-16

Contents lists available at ScienceDirect

DNA Repair

journal homepage: www.elsevier.com/locate/dnarepair

DNA maintenance following bleomycin-induced strand breaks does not require poly(ADP-ribosyl)ation activation in *Drosophila* S2 cells

Layal Ishak, Amandine Moretton, Isabelle Garreau-Balandier, Mathilde Lefebvre, Serge Alziari, Philippe Lachaume, Frédéric Morel, Géraldine Farge, Patrick Vernet*, Pascal Dubessay¹

Université Clermont Auvergne, Université Blaise Pascal, EA 4645, Réparation du Génome Mitochondrial Normal et Pathologique, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France

ARTICLE INFO

Article history: Received 15 December 2015 Received in revised form 5 September 2016 Accepted 9 October 2016 Available online 21 October 2016

Keywords: DNA repair DNA breaks PARP Poly(ADP-ribosyl)ation PARG

ABSTRACT

Background: Poly-ADP ribosylation (PARylation) is a post translational modification, catalyzed by Poly(ADP-ribose)polymerase (PARP) family. In *Drosophila*, PARP-I (human PARP-1 ortholog) is considered to be the only enzymatically active isoform. PARylation is involved in various cellular processes such as DNA repair in case of base excision and strand-breaks.

Observations: Strand-breaks (SSB and DSB) are detrimental to cell viability and, in Drosophila, that has a unique PARP family organization, little is known on PARP involvement in the control of strand-breaks repair process. In our study, strands-breaks (SSB and DSB) are chemically induced in S2 Drosophila cells using bleomycin. These breaks are efficiently repaired in S2 cells. During the bleomycin treatment, changes in PARylation levels are only detectable in a few cells, and an increase in PARP-I and PARP-II mRNAs is only observed during the recovery period. These results differ strongly from those obtained with Human cells, where PARylation is strongly activating when DNA breaks are generated. Finally, in PARP knock-down cells, DNA stability is altered but no change in strand-breaks repair can be observed. *Conclusions:* PARP responses in DNA strands-breaks context are functional in *Drosophila* model as demonstrated by PARP-I and PARP-II mRNA increases. However, no modification of the global PARylation profile is observed during strand-breaks generation, only changes at cellular levels are detectable. Taking together, these results demonstrate that PARPIs on *Drosophila* is tightly regulated in the context of strands-breaks repair and that PARP is essential during the maintenance of DNA integrity but dispensable in the DNA repair process.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

DNA strand breaks, and especially double-strand breaks (DSBs), are highly detrimental to genome stability and by extension to cell life. These genomic alterations have various causes, ranging from intrinsic ones such as reactive oxygen species or defective replication machinery to extrinsic ones like chemotherapeutic agents or ionizing radiations (for review see [1]). Prokaryotic and eukaryotic

1568-7864/© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

cells have developed a large range of mechanisms to counteract this biological issue and to lead up to a complex DNA damage response (DDR). This fully-integrated response includes sensing, signalling and promotion of DNA repair in the cell cycle context in order to coordinate an efficient DNA repair [2].

Among all the biological responses leading to DNA repair, posttranslational modifications (PTM) constitute a tight regulator for activation or inactivation of DNA damage signalling and repair mechanisms [3]. The most characterized PTM in the context of DSBs repair are phosphorylations of several molecular actors including the well-known ATM signalling molecules (i.e. H2AX, 53BP1, Rad17, DNA-PKcs, Rad52 etc.). Beside phosphorylations, Poly (ADPribosyl)ation (PAR) plays also a unique role in DNA breaks repair. It consists of polymers of ADP-ribose moieties linked by 2',1"-Oglycosidic ribose-ribose bonds or even branched structures through 2",1"'-O-glycosidic ribose-ribose bonds. Beside this extended modification, a single ADP moiety can be added to the protein resulting





CrossMark

Abbreviations: PARP, poly(ADP-ribose)polymerase; PARG, poly(ADP-ribose)glycohydrolase; PAR, poly(ADP-ribosyl)ation; SSB, single-strand break; DSB, double-strands break.

^{*} Corresponding author.

E-mail address: patrick.vernet@univ-bpclermont.fr (P. Vernet).

¹ Present address: Université Clermont Auvergne, Université Blaise Pascal, Institut Pascal, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France; CNRS, UMR 6602, IP, F-63171, Aubière, France.

http://dx.doi.org/10.1016/j.dnarep.2016.10.002

into mono ADP ribosylation. ADP-ribose (either as a monomer or a polymer) is covalently bound to specific target proteins [4]. The extent of this modification on acceptor proteins, reaches few hundreds ADP-ribose moieties (for review, see [5]). This PTM is the result of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) hydrolysis by specific enzymes such as the Poly ADP-ribose polymerase (PARP) family. This large family (17 members in Human) is involved in various cellular processes such as gene transcription, chromatin remodelling or cell death pathways. Poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1), a major member of the PARP family, is the main isoform involved in the promotion of DNA repair. In response to genotoxic agents, PARP-1, mainly located in nucleus, is activated through recognition of damaged DNA. As a result, PARP auto-modification and ADP-ribose polymers incorporation to a number of nuclear proteins is stimulated. In response to low levels of DNA lesions, PARP-1 activity favours repair and survival. Knock-out of PARP-1 in mice and fibroblasts leads to genomic instability after gamma irradiation and alkylating agent treatment [6,7]. Several studies suggest a central role of PARP-1 in replication fork restart by homologous recombination. PARP-1, as a sensor of disrupted replication forks, promotes the recruitment of Mre11 and/or RAD51 for end processing that is required for subsequent recombination repair and restart of replication forks [8]. However, PARP-1 inactivation in embryonic stem cells or embryonic fibroblasts results in hypersensivity to the replication inhibitor hydroxyurea (HU) but does not impair normal recombination repair of genomic DSBs [9] suggesting the fact that PARP could be dispensable for homologous recombination but remains essential for DNA repair. Various studies support a role for PARP-1 in Non Homologous End Joining (NHEJ) process via its interaction with DNA-PKcs or its partner ku70/ku80 [10]. However, PARP-1 does not appear to constitute a core factor in the C-NHEJ pathway [11]. On the other hand, when C-NHEJ is impaired, cells shift to alternative end-joining pathway (A-NHEJ), a PARPdependant pathway. PARP-1 acts at the initiation step by binding to DNA ends and by ADP-ribosylating itself and other proteins [12]. This repair mode has also been shown to operate in some human cancers and during later stages of embryonic development.

In contrast, PARP-1 is well characterized in the resolution of strand breaks as an intermediate part of the BER/SSBR pathway. It has affinity to single strand that stimulate its catalytic activity. Also, PARP-1 plays a main role in BER actors recruitments as polymerase β [13] and APE1[14]. In *Drosophila*, PARP superfamily is limited to only one unique *parp* gene [15], encoding three different isoforms [16,17]. PARP enzymatically active isoform in fruit fly is encoded by PARP-1 transcript.

The main objectives of this study were to determine the link between PARylation and DNA damages during DNA breaks production and recovery in *Drosophila* model. We show that, in contrast to what is observed in human cells, PARylation levels are slightly affected after DNA breaks induction with bleomycin. Moreover, PARP-I, II and PARG mRNA levels remain unchanged upon DNA breaks. However, PARP-I and PARP-II mRNA accumulations are dramatically increased during the recovery period while the PARylation levels remain stable, suggesting a tight control of this PTM during breaks repair in *Drosophila*. This unique behavior was only observed with DNA breaks and was different during oxidative stress induction.

2. Materials and methods

2.1. S2 cell culture

Drosophila melanogaster S2 cells were grown in Schneider medium (Biological industries) supplemented with 10% fetal calf

serum and 1% penicillin/streptomycin solution (PAA) at 24 °C under normal atmosphere.

2.2. Bleomycin treatment

S2 cells were grown for 48 h in 75 cm² culture flasks. After two washes with PBS, the medium was discarded and replaced by fresh medium containing 75 μ g/mL bleomycin (Bellon) at 24 °C for 5, 15 and 30 min. After three washes with PBS to eliminate residual bleomycin, cells were incubated in fresh medium between 30 min and 1 h, at 24 °C. For all samples and kinetics experiment, DNA, RNA and proteins were extracted immediately.

2.3. Western blotting

Cells were lysed either by adding immediately to cell pellet Laemmli solution buffer containing 5% (v/v) β -mercaptoethanol and heated at 95 °C for 5 mins or by resuspending cells pellet in lysis buffer (50 mM Tris HCl pH7.8, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40 with protease inhibitors (Roche). Proteins concentrations were determined by Bradford assay (BioRad).

Proteins were separated on 8% (w/v) SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membrane (GeHealthcare) as previously described [18].

Membranes were blocked in TBST (50 mM Tris pH 7.4, 20 mM NaCl, 0.1% Tween 20) with 10% nonfat milk for 2 h or overnight. The membranes were incubated with the following antibodies: mouse anti-phosphorylated H2Av (1:100, UNC93-5.2.1, DSHB), rabbit-anti-PAR polyclonal (1:2000, TREVIGEN), mouse-anti-tubulin (1:20,000, Sigma). UNC93-5.2.1 was deposited to the DSHB by Hawley, R.S. (DSHB Hybridoma Product UNC93-5.2.1). The presence of different proteins was detected using LuminataTM forte western HRP Substrate (Millipore)

2.4. Southern blot

DNA extraction was carried out according to Genomic DNA purification from tissue protocol (MACHEREY-NAGEL). For each DNA extraction, 2×10^7 cells were used. Nucleic acid concentration and purity were spectrophotometrically measured (Nanodrop ND-1000, Thermo scientific).

For Southern blot, $2 \mu g$ DNA digested by EcoRV were loaded onto 0.8% agarose gel. DNA fragments were transferred onto nylon membrane. The membrane were hybridized with radiolabelled nuclear probe (18SrDNA, [19]). After autoradiography, the hybridization signals were analysed by phosphoimager (Biorad).

2.5. RT-qPCR analysis

For each RNA extraction, 2×10^6 cells were used. RNA extraction was carried out according to the manufacturer instructions using TRI REAGENT (Molecular Research Center, Inc.). RNA concentration and purity were measured by Nanodrop 1000 (Thermo Scientific). RNA (2 µg) from each sample was used to synthesize cDNA using M-MLV transcriptase Kit (Promega). After cDNA synthesis, samples were incubated with RNAse A (Sigma Aldrich) for 20 min at 37 °C.

Quantitative PCR analysis was performed using Mastercycler PCR apparatus (Eppendorf) with MESA GREEN qPCR Mastermix Plus for SYBR Assay (Eurogentec) according to the manufacturer's protocol. The relative abundance of mRNAs was calculated by the comparative cycle of threshold (Ct) method with Rp49 mRNA as the invariant control.

The primers used are as follows. *Rp49*: 5'-GCTAAGCTGTCGCACAAATG-3', 5'-TCTGCATGAGCAGGACCT-3'; *parg*: 5'-ACATCAACTTTAACAGGCTTTA-3', 5'-GCACTTTGGCTCCAGTCG-3'; *parp-II*:

5'-ACAATGATGTTTTGGTTAGATATTGG-3', 5'-CGATTGGGTACATTCGACCT-3'; **parp-I**: 5'-TGATGTTTTGGTTAGGCCAAC-3',5'-CAAACTTCATACGGGTGGATT-3'.

2.6. DNA kinetics repair by quantifying Long/Short PCR products

The quantification of Long PCR product/short PCR product allows measurement of DNA damage and kinetics repair [20,21]. For long PCR, a sequence of *Engrailed* gene (3.18 kb) was used amplified using the following primers: Fw: 5'CGCTCGGTCAGATAGCGAT-3' and Rev: 5'-CTACTTGTGGGATCTCGCC-3'. For short PCR, a sequence of *Actin* gene (197 pb) was amplified using the following primers:

Fw: 5'GTGCCCATCTACGAGGGTTA and Rev: 5'-GACTTTGAGCAGGAGATGGC-3'.

One hundred ng of DNA extracted from S2 and PARP-I knockdown cells was used for each experiment. The amplification was performed in a different tube for each target during 21 cycles to remain within the exponential phase. PCR ds-DNA products were quantified with Qubit fluorimeter according to the manufacturer's protocol (Qubit dsDNA HS Assay kit, Invitrogen). The calculation of the ratio of Long PCR product over short PCR product in every assay determines DNA integrity.

2.7. Gene silencing

The primers used to generate dsRNAs, using MEGAscript RNAi kit (Ambion), are as follows:

parp-I/II: forward:TAATACGACTCACTATAGGGATG ATGACCAAAAGTTGGT,

Reverse: TAATACGACTCACTATAGGGGGTTTTTTACGTACTGGC-TAAG

parp-I: forward:TAATACGACTCACTATAGGGGGACATTT AAAGTAAAAGATGG,

Reverse: TAATACGACTCACTATAGGGGATTTTGTATATATACT-GTTCGA

parg: forward: TAATACGACTCACTATAGGGGAGATCCTCGC-GATATTGA,

 $reverse: TAATACGACTCACTATAGGGTATTTTCGTCGCGTGTGTCC \\ \beta \textit{-Galactosidase} [22] as dsRNA control: Forward: TAATACGACTCACTATAGGGGGTTTCCGCGAGGT \\ \label{eq:gamma}$

Reverse: TAATACGACTCACTATAGGGGTCGCACAGCGTGTAC.

All primers were tested for specificity using SnapDragon (Drosophila RNAi Screening Center (DRSC) site [23]. S2 cells (9.10^6) were transfected with 10 µg specific or control dsRNA in serum-free Schneider's medium. Following 2 h treatment, 10% HI-FBS fresh medium was added, then cells were grown for 5 more days.

2.8. PARylation immunodetection

Cells were layered for 2 h on coverslips coated with concanavalin A (0.1 mg/mL) at 24 °C. Cells were exposed to 1.5 mM hydrogen peroxide for 10 min or 75 μ g/mL bleomycin to promote PAR activation, then fixed with methanol/acetone (v/v) for 10 min at 4 °C. After washes with PBS with 0.1% Tween 20 (PBS-Tween), cells were incubated with monoclonal anti-PAR antibody (10H, 1:200 gift from Dr Schreiber, Strasbourg) diluted in PBS-Tween for 2 h at room temperature. After washes with PBS-tween, cells were incubated for 1 h at room temperature with secondary antibody, anti-mouse IgG3 conjugated to Alexa FluorTM 488 (1:1000, Life Technologies). After washing, nuclei were counterstained with DAPI. Coverslides were mounted using 10 μ l PBS/glycerol (v/v) and observed using epifluorescence microscopy (Leica). PAR positive cells were quantified as a ratio of Alexa FluorTM 488 positive cells toward total cells (DAPI positive cells) using ImageJ software (NIH, USA). A minimum of 200 cells was counted for each condition. Results were expressed as mean \pm SD.

2.9. In silico analyses

Prediction of protein domains was investigated using Scan-Prosite website [24]

2.10. Statistical analysis

Student's and Fisher tests were used to detect differences between groups; *p < 0.05,

p* < 0.01 and *p* < 0.001 represent statistically significant differences from control.

3. Results

3.1. In silico structural analysis of PARP proteins in Drosophila

Drosophila melanogaster possess 3 PARP transcripts resulting from alternative transcription start site and differential splicing [17]. The 3 resulting proteins –PARP-I, PARP-II and PARP-e – have been analysed *in silico* using Prosite database [25]. As observed on Fig. 1, PARP-1 has 5 predicted functional domains: 2 Zinc finger domains, 1 BRCT domain, and 1 catalytic domain with a regulatory and a catalytic region. The known human Zn 3 domain was not identified with this *in silico* analysis. In Drosophila, only PARP-I showed a similar organization of the functional domains as its orthologous form PARP-1 in Human. PARP-II is a truncated form lacking the BRCT domain, and PARP-e lacks the whole catalytic domain.

3.2. DNA breaks induction and repair in S2 cells

In a first step, we used bleomycin treatment to generate DNA breaks in *Drosophila* S2 cells. Various bleomycin concentrations (from 30 to $125 \,\mu g/mL$) and incubation times (from 5 to 60 min) were tested (data not shown). Based on Southern blot analysis, we chose for the following experiments a 30 min treatment with 75 $\mu g/mL$ bleomycin, as it results in a strong DNA breakage. As observed on Fig. 2A, bleomycin treatment induced total DNA fragmentation with the loss of the 2 major EcoRV 10.5 and 6.5 kb fragments detected in control cells, resulting into a DNA smear between 10kb and 1kb. Interestingly, a 30min recovery time without bleomycin was sufficient to restore the full DNA fragments similar to those observed in control samples suggesting the existence of efficient repair mechanisms. In parallel, this DNA fragmentation was associated with an important increase of H2Av phosphorylated form, in protein extracts from S2 cells treated with bleomycin confirming the presence of DNA breaks (Fig. 2B). The experimental conditions were thus optimized to investigate breaks repair and PARylation processes in Drosophila S2 cells.

3.3. PARylation level in response to bleomycin-induced DNA breaks in Drosophila cells

To study whether PARylation was involved in DNA breaks repair in *Drosophila*, we used a pADPr antibody directed against PAR posttranslational modifications. A very low basal level of PARylation was observed in control S2 cells extracts with a weak smear of high molecular weight (>100 kDa). Surprisingly, the level of PARylation remains constant after bleomycin treatment and in cells collected after a 30 min recovery period (Fig. 3A). As a control, similar experiments were performed on human HeLa cells. They showed a basal PARylation level in untreated cells and followed by an increase of the PARylation level after bleomycin treatment. After a recovery period, the basal level was completely restored (Fig. 3B). H₂O₂,



Fig. 1. Modular domain architecture of PARP isoforms in Drosophila.

Predictive protein domains are detected using Scan Prosite web. Based on the multiple PARP transcripts in *Drosophila*, 3 proteins are predicted [17]. PARP-I, the long isoform, presents the same domains as PARP-1. In contrast, PARP-II and PARP-e, the 2 short isoforms lack the BRCT and the catalytic domains, respectively. ZnF: Zinc finger; PADR1: Poly (ADP-ribose)1 domain; BRCT: BRCA1 C-terminus-like; WGR domain; Reg: regulatory region of catalytic domain; CAT: catalytic domain



Fig. 2. DNA strands breaks and repair in S2 cells.

(A) Southern blot analysis of genomic DNA using 18SrDNA as a probe after bleomycin treatment (left) followed by 2 different recovery times (right). (B) Western blot analysis using antibody against H2Av phosphorylated form in S2 cells. (n = 4)

another potent PARylation inducer, was used to analyze the cell response in a context of bases oxidation. Similarly to what was observed with bleomycin, S2 cells did not show any increase of PARylation level upon H_2O_2 treatment, as it was observed on HeLa cells (Fig. 3B).

These results suggest that PARylation was either not activated in response to bleomycin or after H_2O_2 induced DNA damages in S2 cells or PAR were rapidly eliminated by PARG.

3.4. Functionality of PAR actors in Drosophila cells

The lack of PARylation in response to bleomycin or H_2O_2 treatment was rather unexpected and led us to address the issue of PARylation actors enzymatic activities in Drosophila cells. In order to test that, we used RNAi in *Drosophila* cells targeting specifically PARP-I, PARP-II or PARG. The 2 PARylation actors PARP-I and –II were also simultaneously knocked-down. Relative expression levels of PARP-I, –II and PARG were significantly reduced to 20, 10 and 10%, respectively, compared to unstransfected S2 cells (Fig. 4A).



Fig. 3. Bleomycin and H_2O_2 induce Poly(ADP-ribosyl)ation in HeLa cells but not in S2 cells.

Proteins extracted from S2 and HeLa cells following different treatment conditions were loaded onto 8% SDS-PAGE. After transfer, membranes were incubated with anti-PAR and anti-tubulin antibodies. S2 (A) and HeLa (B) cells were treated with 75 μ g/mL and 10 μ g/mL of bleomycin, respectively, for 30 min and allowed to recover in bleomycin-free medium for 30 min. Same experiments were performed using 1.5 mM H₂O₂ as an inducer on S2 or HeLa cells. Tubulin (bottom) was used as an internal control.

These different knock-down cells were assayed for the PARylation activity. In PARP-I and PARP-I/II knockdown cells, PARylation level almost disappeared compared to control. On the contrary, in PARG knock-down cells, PARylation level was strongly increased (Fig. 4B). These results show that PARylation is functional and controlled *via* PARP-I and PARG activities in S2 cells.

3.5. PARG role in PARylation regulation

A second set of experiments was performed using immunocytochemistry to precisely decipher any changes in PARylation levels at cellular level during genotoxic stresses but also to determine



Fig. 4. PARP and PARG are functional in S2 cells.

(A) Validation of various knock-down in S2 cells by RT-qPCR quantification. Values are expressed as ratio between target gene expression and RP49 as an internal standard. β-galactosidase mRNA was used as a control. (n = 3)

(B) Effective knock-down of Parp and Parg genes in S2 cells by RNAi treatment. PARylation (PAR) detection by western-blot analysis using anti-PAR antibodies. Tubulin was used as a control. (n=3)

whether cellular PARylation response was regulated by PARG in S2 cells (Fig. 5A, B and C). In control S2 cells (Fig. 5C), a very low PARylation level was detected confirming results obtained by Western-blot analysis (Fig. 3A). In response to bleomycin treatment, S2 cells showed a significant 2.7-fold increase of PARylation level or even a 3-fold increase in PARG knock-down cells (Fig. 5C). However, following H_2O_2 treatment, PARylation level was strongly increased in nuclear compartment in S2 control cells (5-fold) and in PARG knock-down cells (7.8-fold). These results clearly points out that PARylation is tightly controlled at a basal level by PARG activity in S2 cells. It also demonstrates that bleomycin-induced damages stimulate PARylation processes with 20% PAR positive cells in whole S2 cells population. Finally, bleomycin and H_2O_2 induce differential PARylation response in S2 cells.

3.6. mRNA expression levels of PARP isoforms and PARG during bleomycin treatment and recovery time

In order to investigate the PARP/PARG transcriptional responses in S2 cells following bleomycin incubation PARP-I, –II and PARG expression were tested by real time quantitative PCR using *rp49* mRNA as a standard (Fig. 6). *Parp-I* mRNA accumulation remained stable during bleomycin treatment but increased in recovery period. The same profile was detected in *parp-II* mRNA expression. Also, *parg* mRNA accumulation remained stable during bleomycin treatment and repair period. PARP transcripts accumulation appear to be a consequence of bleomycin treatment limited to the recovery period. Similar experiments performed on Human cells with H₂O₂ (Fig. 6B) confirmed that hPARP-1 was not activated at the transcription level in these conditions.

3.7. PARP role in DNA integrity maintenance and repair

Functional role of PARylation processes in S2 cell strand breaks repair was investigated using S2 cells silenced for *parp-1* expression and challenged by bleomycin treatment (Fig. 7). Bleomycin treatment resulted in a 32% reduction of DNA integrity. Interestingly, in *parp-I* knock-down cells (grey bar), DNA integrity was 50% reduced compared to control S2 cells in basal conditions. These results clearly show the role of PARP in DNA integrity maintenance in the lack of exogenous stresses. Moreover, they demonstrate that PARylation processes are not essential in DNA repair following strand-breaks induction since DNA recovery remain similar in control or *parp-I* knock-down cells.

4. Discussion

Poly(ADP-ribosyl)ation (PARylation) is a post-translational modification of specific proteins resulting in a change of their physical and chemical properties [26]. Many cellular processes are dependent on this PTM such as cell cycle regulation, transcription or DNA repair. PARP family is the main group of actors involved in this modification. In Eukaryotes, this family displays 6 different groups or clades based on phylogenetic analyses. In mammals such as mouse or human, three members of the PARP family, belonging to clade 1, are involved in DNA repair. This relative complexity is reduced to a single member in *Drosophila melanogaster* [27] making this an unique model to study the role of PARylation processes in DNA strand-breaks repair.

PARP-1 contains three main domains: a DNA binding-domain, an automodification domain and a catalytic domain. Changes in conformational structure of these various domains following interactions with damaged DNA result in PARP catalytic activation [28]. The genome of *Drosophila melanogaster* contains only a single PARP gene that encodes, through a combination of differential splicing and alternative transcription start, 3 isoforms of PARP [17]. PARP-I, the human PARP-1 ortholog, includes all the conserved domains characteristics of mammalian PARP-1. PARP-II isoform lacks the auto-modification domain and is devoid of PARylation activity [16]. The third isoform, PARP-e, despite the lack of catalytic domain, has

been shown to modulate *parp* transcription during development [17].

Our study aims to understand the importance of PARylation in the strand-breaks repair process in *Drosophila*, a simple model of *parp* genes organization. Bleomycin was used as a known inducer of SSB and DSB [29]. In our study, we show that basal levels of PARylation are relatively low in S2 cells under normal conditions. This result is consistent with the PARylation intensity usually described as low in *Drosophila*. Most PARylation signals in *Drosophila* have been identified through [32] P-NAD incubation followed by SDS-PAGE of poly(ADP-ribosyl)ated proteins to amplify the signal [17]. This low level of PARylation is also common in other models [30,31] under basal conditions, reflecting the absence of induction of PARylation processes. However, low changes of PARylation during bleomycin or H_2O_2 treatment, even if the latter is less dramatic, points to a more intriguing behavior.

This phenomenon is not a consequence of the lack or deficiency of PARP that was shown to be present and active in the S2 *Drosophila* cells. Expression of various PARP transcripts was validated in our study (data not shown) and was confirmed in *Drosophila* embryo [17]. In addition, we demonstrate that PARG exhibits a strong control on PARylation level. Main PARylation changes are observed in PARG knock-down cells and less in S2 control cells. The use of S2 cells, derived from 20 to 24 h *Drosophila* embryos, in the present study could explain this behavior and would reflect a consequence of the developmental stage of the donor organism [31] with tight PARylation controls. This control of PARylation level would be essential to counteract the detrimental effect of PAR accumulation as it was demonstrated by Illuzzi et al. [33].

 H_2O_2 , on one side, is a common inducer of PARylation processes [34,35] in various cell types. This is mainly due to H_2O_2 mediated DNA damage, leading to oxidation of DNA bases and their repair through Base Excision Repair (BER) processes. Bleomycin, on the other side, is a radiomimetic agent that causes DNA strand breaks in mammals and *Drosophila* cells [19]. In mammals, the histone variant H2AX is rapidly phosphorylated at the sites of DNA double-strand breaks [36] but in *Drosophila*, the phosphorylation occurs on the histone 2A variant (H2Av) [37]. Bleomycin DNA double-strand breaks induce H2Av phosphorylation as efficiently as did γ -irradiation contributing to repair of DSBs [37]. A recent study by Alexander et al. [38] demonstrated in *Drosophila* that H2Av phosphorylation is the result of all kinds of DNA breaks (SSBs and



Fig. 5. H₂O₂ but not bleomycin treatment induces PARylation in PARG knock-down cells.

Control and PARG knock-down S2 cells were treated with bleomycin and H_2O_2 . PARylation was observed following anti-PAR monoclonal antibody (10H) and anti-mouse IgG3 conjugated to AlexaFluorTM488 as secondary antibody incubation. Nuclei were counterstained with DAPI.

(A) PAR accumulation in control S2 cells (top), bleomycin treated (middle) and H₂O₂ treated- cells (bottom).

(B) Impact of PARG knock-down on PARylation level in control S2 (top), bleomycin treated (middle) and H₂O₂ treated cells (bottom)

Scale bar:20 µm

(C) Quantification of PAR positive cells in control S2 cells, bleomycin treated and H_2O_2 treated. Values are expressed as percentage of PAR positive cells vs total cells (mean \pm S.D).



DSBs) generated by active replication forks. The rapid H2Av phosphorylation observed in our study following bleomycin treatment confirmed strand-breaks generation in our model.

However, two recent studies published simultaneously [39,40] raised new perspectives on PARP role in DSB repair processes. Using laser-induced DNA damage on human cells, these groups demonstrated that PARP-1 was necessary to promote DNA repair following DSB induction. However, this repair was independent from PARP activity and more precisely independent from PARylation processes. In this model, the DSB repair through homologous recombination depends from the specific recruitment of TIMELESS protein. This essential step for homologous recombination repair is related to TIMELESS ability to form a complex with PARP-1. This interaction is mediated through the presence of key amino-acids residues Pro851, Phe852, Lys940, Lys943 and Asp993. Lys or positively charged residues involved in electrostatic interactions with PARP are important in the 940–945 domain of PARP-1. In our study in *Drosophila* model, TIMELESS orthologs are present such as

Tim-1 and more precisely Tim-2 [41]. Interestingly, PARP protein (long isoform, Uniprot accession number: P35875) displays identical residues in these functional domains for potential interaction with Tim-1 or 2. In the mean time, bleomycin treatment strongly increased *parp-1* and *II* expressions during the recovery period. In the lack of functional anti-PARP antibodies, PARP protein levels were not investigated, however this increase was in accordance with a hypothetical PARP role involvement in DSB repair independently from PARylation processes as observed with TIMELESS [39,40].

Beside PARP role in the process of strand-breaks repair in *Drosophila*, our study shows that PARP is essential in DNA maintenance in S2 cells without genotoxic stress. The 2-fold decrease in PCR amplification in S2 cells devoid of PARP illustrates the fact that nuclear DNA in the context of PARP RNAi cells accumulates damages that lead to a decrease in amplification efficiency. The amplification technique used in our study is sensitive to any types of DNA damages ranging from DNA adducts to DNA breaks (SSB or



Fig. 6. PARP-I,-II and PARG expression during strand-breaks generation and repair. mRNA accumulation values are expressed as relative mRNA amount of target genes compared to *rp49*.

S2 cells were treated with bleomycin for 30 min, and allowed to recover for 60 min in bleomycin-free medium. RNA was extracted immediately after treatment and recovery time.

(n=3-6, * p<0.05; ** p<0.01)



Fig. 7. Role of PARP in DNA stability during strand-breaks generation and repair. DNA integrity determined as a ratio of amount of long target (*Engrailed* gene) over amount short target (*actin* gene) after 21 PCR cycles in 3 conditions: control cells (bleomycin), DNA damage induction (+ bleomycin) and recovery (n = 3, ** p < 0.01; *** p < 0.001)

DSB) [42,43]. To our knowledge, this loss of nuclear DNA integrity in PARP deficient cells, in the lack of genotoxic stress, is unique. PARP deficient cells are known to be sensitive to various stresses with altered repair abilities [6,44]. Here, we demonstrate that in Drosophila cells, the loss of PARP induces changes in nuclear DNA.

This relatively simple model of PARP organization based on the presence of only 3 transcripts resulting from alternative splicing, may constitute an interesting way to understand PARylation processes and the precise mechanisms leading to DNA repair and beyond, i.e. DNA maintenance. This study underlined the peculiar feature observed for PARylation in *Drosophila* in the context of strand-breaks induction and repair.

Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest

Acknowledgements

The RGM EA 4645 is financially supported by the University Blaise Pascal. L. I. is funded by Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. The monoclonal antibody directed against histone 2A variant (gamma-H2AV) phosphorylated developed by Dr R.S. Hawley (Stowers Institute for Medical Research, Kansas City, MI) was obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank, created by the NICHD of the NIH and maintained at The University of Iowa, Department of Biology, Iowa City, IA 52242.

The authors would like to thank Valérie Schreiber (Strasbourg) for the kind gift of the anti-PAR antibody (10H) and Stéphanie Ducros for technical assistance.

References

- A. Mehta, J.E. Haber, Sources of DNA double-Strand Breaks and models of recombinational DNA repair, Cold Spring Harbor Perspect. Biol. 6 (9) (2014).
- [2] S.P. Jackson, J. Bartek, The DNA-damage response in human biology and disease, Nature 461 (7267) (2009) 1071–1078.
- [3] U. Déry, J.-Y. Masson, Twists and turns in the function of DNA damage signaling and repair proteins by post-translational modifications, DNA Repair 6 (5) (2007) 561–577.
- [4] T. Kalisch, et al., New readers and interpretations of poly(ADP-ribosyl)ation, Trends Biochem. Sci. 37 (9) (2012) 381–390.
- [5] E. Barkauskaite, et al., The recognition and removal of cellular
- poly(ADP-ribose) signals, FEBS J. 280 (15) (2013) 3491-3507.
- [6] C. Trucco, et al., DNA repair defect in poly(ADP-ribose) polymerase-deficient cell lines, Nucleic Acids Res. 26 (11) (1998) 2644–2649.
- [7] M. Fernet, et al., Poly(ADP-ribose) polymerase: a major determinant of early cell response to ionizing radiation, Int. J. Radiat. Biol. 76 (12) (2000) 1621–1629.
- [8] H.E. Bryant, et al., PARP is activated at stalled forks to mediate Mre11-dependent replication restart and recombination, EMBO J. 28 (17) (2009) 2601–2615.
- [9] Y.-C. Yang, et al., Ablation of PARP-1 does not interfere with the repair of DNA double-strand breaks: but compromises the reactivation of stalled replication forks, Oncogene 23 (21) (2004) 3872–3882.
- [10] C.A.-M. Couto, et al., PARP regulates nonhomologous end joining through retention of Ku at double-strand breaks, J. Cell Biol. 194 (3) (2011) 367–375.
- [11] C. Beck, et al., Poly(ADP-ribose) polymerases in double-strand break repair: focus on PARP1, PARP2 and PARP3, Exp. Cell Res. 329 (1) (2014) 18–25.
 [12] M. Wang, et al., PARP-1 and Ku compete for repair of DNA double strand
- [12] M. Wang, et al., PARP-1 and Ku compete for repair of DNA double strand breaks by distinct NHEJ pathways, Nucleic Acids Res. 34 (21) (2006) 6170–6182.
- [13] M. Sukhanova, S. Khodyreva, O. Lavrik, Poly(ADP-ribose) polymerase 1 regulates activity of DNA polymerase beta in long patch base excision repair, Mutat. Res. 685 (1–2) (2010) 80–89.
- [14] R.et al. Prasad, Mammalian base excision repair: functional partnership between PARP-1 and APE1 in AP-Site repair, PLoS One 10(5)(2015) e0124269.
 [15] S. Hanai, et al., Genomic organization of drosophila poly(ADP-ribose)
- [13] S. naha, et al., Genome organization of drosophila poly(ADP-holse) polymerase and distribution of its mRNA during development, J. Biol. Chem. 273 (19) (1998) 11881–11886.
- [16] T. Kawamura, et al., An alternative form of poly(ADP-Ribose) polymerase inDrosophila melanogasterand its ectopic expression in rat-1cells, Biochem. Biophys. Res. Commun. 251 (1) (1998) 35–40.
- [17] A. Tulin, D. Stewart, A.C. Spradling, The Drosophila heterochromatic gene encoding poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) is required to modulate chromatin structure during development, Genes Dev. 16 (16) (2002) 2108–2119.
- [18] I. Garreau-Balandier, et al., A comprehensive approach to determining BER capacities and their change with aging in Drosophila melanogaster mitochondria by oligonucleotide microarray, FEBS Lett. 588 (9) (2014) 1673–1679.
- [19] F. Morel, et al., Bleomycin-induced double-strand breaks in mitochondrial DNA of Drosophila cells are repaired, Mutat. Res. 637 (1-2) (2008) 111–117.
- [20] S.E. Hunter, et al., The QPCR assay for analysis of mitochondrial DNA damage: repair, and relative copy number, Methods 51 (4) (2010) 444–451.
 [21] C.P. Gonzalez-Hunt, et al., PCR-based analysis of mitochondrial DNA copy
- [21] C.P. Gonzalez-Hunt, et al., PCR-based analysis of mitochondrial DNA copy number, mitochondrial DNA damage, and nuclear DNA damage, Curr. Protoc. Toxicol. 67 (2016) (p. 20 11 1-20 11 25).

- [22] C.-T. Ong, et al., Poly(ADP-ribosyl)ation regulates insulator function and intra-chromosomal interactions in Drosophila, Cell 155 (1) (2013), http://dx. doi.org/10.1016/j.cell.2013.08.052.
- doi.org/10.1016/j.cell.2013.08.052.
 [23] I.T. Flockhart, et al., FlyRNAi. org—the database of the Drosophila RNAi screening center: 2012 update, Nucleic Acids Res. 40 (2012) D715–D719 (Database issue).
- [24] C.J.A. Sigrist, et al., New and continuing developments at PROSITE, Nucleic Acids Res. 41 (D1) (2013) D344–D347.
- [25] C.J.A. Sigrist, et al., New and continuing developments at PROSITE, Nucleic Acids Res. 41 (2013) D344–D347 (Database issue).
- [26] B.A. Gibson, W.L. Kraus, New insights into the molecular and cellular functions of poly(ADP-ribose) and PARPs, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 13 (7) (2012) 411–424.
- [27] D. Perina, et al., Distribution of protein poly(ADP-ribosyl)ation systems across all domains of life, DNA Repair 23 (2014) 4–16.
- [28] M.F. Langelier, et al., Structural basis for DNA damage-dependent poly(ADP-ribosyl)ation by human PARP-1, Science 336 (6082) (2012) 728–732.
- [29] J. Chen, et al., Mechanistic studies on bleomycin-mediated DNA damage: multiple binding modes can result in double-stranded DNA cleavage, Nucleic Acids Res. 36 (11) (2008) 3781–3790.
- [30] S.L. Oei, M. Ziegler, ATP for the DNA ligation step in base excision repair is generated from poly(ADP-ribose), J. Biol. Chem. 275 (30) (2000) 23234–23239.
- [31] M. Banaszewska, G. Konat, Nucleotides induce higher order chromatin degradation, Mol. Cell. Biochem. 282 (1–2) (2006) 39–43.
- [32] I. Schneider, Cell lines derived from late embryonic stages of Drosophila melanogaster, Development 27 (2) (1972) 353–365.
- [33] G. Illuzzi, et al., PARG is dispensable for recovery from transient replicative stress but required to prevent detrimental accumulation of poly(ADP-ribose) upon prolonged replicative stress, Nucleic Acids Res. 42 (12) (2014) 7776–7792.
- [34] K. Erdélyi, et al., Role of poly(ADP-ribosyl)ation in a 'two-hit' model of hypoxia and oxidative stress in human A549 epithelial cells in vitro, Int. J. Mol. Med. 32 (2) (2013) 339–346.
- [35] S.F. El-Khamisy, et al., A requirement for PARP-1 for the assembly or stability of XRCC1 nuclear foci at sites of oxidative DNA damage, Nucleic Acids Res. 31 (19) (2003) 5526–5533.
- [36] E.P. Rogakou, et al., DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139, J. Biol. Chem. 273 (10) (1998) 5858–5868.
- [37] J.P. Madigan, H.L. Chotkowski, R.L. Glaser, DNA double-strand break-induced phosphorylation of Drosophila histone variant H2Av helps prevent radiation-induced apoptosis, Nucleic Acids Res. 30 (17) (2002) 3698–3705.
- [38] J.L. Alexander, M.I. Barrasa, T.L. Orr-Weaver, Replication fork progression during re-replication requires the DNA damage checkpoint and double-strand break repair, Curr. Biol. 25 (12) (2015) 1654–1660.
- [39] S. Xie, et al., Timeless interacts with PARP-1 to promote homologous recombination repair, Mol. Cell 60 (1) (2015) 163–176.
 [40] L.M. Young, et al., TIMELESS forms a complex with PARP1 distinct from its
- [40] L.M. Young, et al., TIMELESS forms a complex with PARP1 distinct from its complex with TIPIN and plays a role in the DNA damage response, Cell Rep. 13 (3) (2015) 451–459.
- [41] C. Benna, et al., A second timeless gene in Drosophila shares greater sequence similarity with mammalian tim, Curr. Biol. 10 (14) (2000) R512–R513.
- [42] O. Erol, N. Arda, G. Erdem, Phenols of virgin olive oil protects nuclear DNA against oxidative damage in HeLa cells, Food Chem. Toxicol. 50 (10) (2012) 3475–3479.
- [43] O.A. Kovalenko, J.H. Santos, Analysis of oxidative damage by gene-specific quantitative PCR, Curr. Protoc. Hum. Genet. (2009) (Chapter 19: p. Unit 19 1.).
- [44] T. Hirai, et al., Radiosensitization effect of poly(ADP-ribose) polymerase inhibition in cells exposed to low and high liner energy transfer radiation, Cancer Sci. 103 (6) (2012) 1045–1050.

16

Article 3

The mitochondrial outer-membrane location of the EXD2 exonuclease contradicts its direct role in nuclear DNA repair

Manuscrit soumis, non révisé

The mitochondrial outer-membrane location of the EXD2 exonuclease contradicts its direct role in nuclear DNA repair

Fenna Hensen¹, Amandine Moretton², Selma van Esveld³, Géraldine Farge² & Johannes N. Spelbrink^{1*}

¹ Radboud Center for Mitochondrial Medicine, Department of Paediatrics, Radboudumc, Nijmegen, The Netherlands

² Université Clermont Auvergne, CNRS/IN2P3, Laboratoire de Physique de Clermont, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France

³ Radboud Center for Mitochondrial Medicine & Center for Molecular and Biomolecular Informatics, Radboud Institute for Molecular Life Sciences, Radboudumc, Nijmegen, The Netherlands

*Correspondence to: hans.spelbrink@radboudumc.nl

Abstract

EXD2 is a recently identified exonuclease that has been implicated in nuclear doublestrand break repair. Given our long standing interest in mitochondrial DNA maintenance and indications that EXD2 could also be a mitochondrial protein we sought to determine its cellular localization and possible mitochondrial associated functions. Our results show that EXD2 indeed shows mitochondrial localization, but surprisingly is found predominantly associated with the mitochondrial outer-membrane. Gradient purified nuclei show only the faintest hint of EXD2 presence while overexpression of the predicted full-length protein shows an exclusive mitochondrial localization. Importantly, induction of double-strand DNA breaks via X-irradiation does not support the notion that EXD2 re-locates to the nucleus following this treatment and thus is unlikely to have a direct role in nuclear DNA repair. Knockdown or overexpression of EXD2 affects the cellular distribution of mitochondria. These results suggest that the purported defects in nuclear DNA repair following EXD2 depletion are likely an indirect consequence of altered mitochondrial dynamics and/or function.

Introduction

Protein function can often be predicted on the basis of signature amino-acid motifs. Exonucleases are no exception to this rule. However, although a bioinformatics prediction for function in some cases can be unquestionable and *in vitro* activity measurements verify predicted enzymatic activity, if the protein in question is not located in the compartment where it is supposed to act, one has to reconsider its function. EXD2 is a newly identified exonuclease that has recently been implicated in nuclear double-strand break repair¹⁻³. We have a long standing interest in mtDNA maintenance enzymes including nucleases^{4,5}, and as more and more nuclear DNA maintenance proteins have in recent years been assigned a mitochondrial function, we have a keen interest in newly discovered nuclear enzymes. A closer inspection of various available online databases and tools showed that despite its recent purported role in nuclear DNA repair, EXD2 location is predicted to be mitochondrial/cytoplasmic. Cellular and mitochondrial localization prediction programs vary in their estimation. For example MitoProt II⁶ gives a reasonably high mitochondrial probability score of 69%,
PSORT II⁷ gives a poor mitochondrial prediction and TargetP⁸ suggests the protein is secreted. Several published papers have suggested a mitochondrial function for EXD2 (Mason and Cox⁹ and references herein). Most striking however is that the antibody used both by Broderick et al. and Biehs et al.^{1, 2} is reported at

<u>http://www.proteinatlas.org</u>¹⁰ as showing a distinct mitochondrial and possibly intermediate filament localization using immunofluorescence(IF). For this reason we here have re-examined the subcellular localization and function of EXD2.

Results and Discussion

The main cellular localization of EXD2 is the mitochondrial outer membrane We used biochemical fractionation experiments and IF in combination with EXD2 knockdown or overexpression to establish its subcellular localization. Crude mitochondrial fractions of control and EXD2 siRNA treated U2OS cells clearly identified distinct EXD2 bands, the most prominent one corresponding to the predicted full length protein of approximately 70 kDa, a second weaker species of approximately 30 kDa (Fig 1 panel a1 and a2) and several even fainter bands between 70 and 30 kDa. Knockdown with three individual siRNAs, in stead of a mix of all three that we more routinely use (see M&M), showed similar knockdown of all detected bands with each siRNA (Fig 1, panel a2). Since the three siRNA's cover almost 1000 bp of the 1866 bp open reading frame, it seems likely that the smaller forms are either processed forms or breakdown products.

The nuclear pellets of the crude mitochondrial fractions were further purified using iodixanol gradient purification to remove excess mitochondria from the nuclear fractions^{11, 12}, and ran alongside the mitochondrial fractions (Fig 1a1). Probing with the EXD2 antibody clearly shows that the vast majority of EXD2 is found in the mitochondrial fraction and not in the nuclear fraction. Control antibodies exclude major nuclear or mitochondrial contamination of the mitochondrial and nuclear fraction, respectively. Nonetheless, a faint band for full-length EXD2 is observed in the nuclear fraction, but likewise mtSSB shows a faint nuclear signal, suggesting a minor mitochondrial contamination of this fraction. This is further corroborated by the observation that neither IF nor IF following overexpression of the full-length protein shows evidence for nuclear EXD2 (see below, Fig 2).

The predicted function of EXD2 combined with a mitochondrial localization suggested it might be involved in mtDNA metabolism. Examination of EXD2 mitochondrial localization using proteinase K (protK) protection showed that the protein was sensitive to digestion using intact mitochondria and outer-membrane-lysed mitochondria (here referred to as mitoplasts, see⁵), without the addition of Triton-X100 (TX100) to fully lyse mitochondria (Fig 1b). In contrast, transcription factor A of mitochondria (TFAM), a well-known mtDNA binding protein that is essential for mtDNA maintenance¹³, was insensitive to externally added proteinase K (protK) and required the addition of TX100 for its proteolysis. These data point to an outer-membrane localization of EXD2 and seem to exclude an mtDNA maintenance function. Online membrane-spanning amino-acid (AA) sequence prediction tools, suggest a single transmembrane region at the N-terminus of the full-length 621 AA protein. A tight membrane association is supported by Na₂CO₃ extraction of crude mitochondria (Fig 1c), in which case EXD2 fractioned to the pellet together with for example the integral membrane protein COXI, whereas the majority of HSP60, a matrix protein, was found in the supernatant.

To further examine EXD2 localization, we reverted to immunofluorescence (IF). Human ProteinAtlas shows a clear mitochondrial and a possible intermediate filament EXD2 localization with their commercially available antibody. However, since this antibody has not been validated for IF, we re-examined these findings, using siRNA mediated knockdown. In addition we used transient overexpression of the predicted full-length protein to examine EXD2 localization using a validated cDNA clone. IF with the EXD2 antibody and the mitochondrial outer membrane marker TOMM20, showed a clear mitochondrial EXD2 signal in non-transfected U2OS cells (Fig 2a) or primary fibroblasts (not shown) and in addition a signal reminiscent of intermediate filaments. This was confirmed by a co-incidental signal with a vimentin antibody. SiRNA mediated knockdown of EXD2 depleted the mitochondrial signal, however the intermediate filament signal remained, suggesting either a non-specific antibody cross reactivity with intermediate filaments or an EXD2 protein isoform that is not or poorly targeted by our siRNA pool, or much more stable and therefore less prone to siRNA mediated depletion. Using IF, again no evidence supported the presence of EXD2 in the nucleus.

EXD2 overexpression or knockdown suggest an involvement in mitochondrial morphology and/or dynamics

Overexpression of either a non-tagged or C-terminally tagged predicted full-length version of the protein showed an exclusive mitochondrial localization (Fig 2b). High level overexpression (based on IF signal) of both the non-tagged and tagged variant resulted in an abnormal mitochondrial network morphology with extreme perinuclear clustering. In contrast, siRNA mediated knockdown suggested a more distributed mitochondrial network, with fewer cells compared to control siRNA-treated cells showing perinuclear mitochondrial abundance. These data might suggested a mitochondrial dynamics/morphology function of EXD2.

Mitochondrial dynamics and morphology is in part cell cycle dependent¹⁴, resulting in mosaic patterns of mitochondrial-cellular distribution and morphology in cultured cells. For this reason and to more clearly assess the EXD2 knockdown phenotypes in relation to the EXD2 antibody intermediate filament co-staining, we repeated knockdown experiments. In addition, we also used the three siRNAs separately while highlighting cells in S-phase using EdU incorporation. In control siRNA cells, a considerable proportion showed very localized perinuclear clustering of the mitochondrial network, in particular in those cells that are also positive for EdU nuclear DNA incorporation, showing that cells are in S-phase (Fig 3). In contrast, with the combined siRNA pool (EXD2si3x) and in particular with siRNAs 124153 and 182946 we observed a more distributed mitochondrial network, while siRNA 124155 was more reminiscent of control siRNA treated cells. In particular siRNA 124153 showed more frequent mitochondrial hyperfusion as can also be observed in Figure 3. With the EXD2 3x siRNA pool and with siRNAs 124153 and 182946, the intermediate filament costaining by EXD2 also appeared less. This appeared however to be a consequence of reduced perinuclear clustering of mitochondria and a concomitant spreading of the intermediate filament network rather than a reduced level of intermediate filaments. This was confirmed by vimentin antibody co-staining in a repeat experiment (not shown). In addition, vimentin antibody staining of Western blots following knockdown, did not show reduced vimentin levels (see Figure 1, panel a2). Although at this point we cannot completely exclude a direct EXD2-intermediate filament interaction, our data suggest the effect of EXD2 knockdown on vimentin is indirect and a consequence of altered mitochondrial distribution. In addition, overexpression of the full-length protein

showed no evidence for intermediate filament co-localization (Fig 2b). To summarize, EXD2 is mainly embedded in the mitochondrial outer membrane and its overexpression or knockdown both appear to affect mitochondrial network morphology/dynamics.

Induction of nuclear DNA damage does not result in nuclear translocation of EXD2

Broderick et al.², have stated that 'EXD2 is recruited to chromatin in a damage dependent manner', yet they have not shown this directly in their paper. Since the main localization of EXD2 is the mitochondrial outer membrane we hypothesized that upon nuclear DNA damage, EXD2 might perhaps relocate to the nucleus. To address this possibility we treated cells with ionizing radiation (Fig 4). Even though the DNA-damage γ H2AX marker (e.g. Burma et al.¹⁵) showed a strong enhancement of its nuclear signal following this treatment, EXD2 showed no re-distribution upon ionizing radiation, thus showing no evidence for a direct damage-foci localized function in nuclear DNA repair.

To conclude, while it has been attractive based on available data to implicate EXD2 as a new player in nuclear double-strand break-repair³, we here show that EXD2 is a relatively abundant outer-mitochondrial-membrane protein. This is in agreement with cellular localization predictions, online antibody data from ProteinAtlas and also a recent paper using proximity biotinylation of mitochondrial outer membrane and ER membrane proteins¹⁶, results of which also support an outer mitochondrial membrane and possibly ER-mitochondrial contact-site localization of EXD2. Our data furthermore show no evidence for a major nuclear localization, either under normal conditions or following the induction of nuclear DNA damage. In contrast, EXD2 seems to play a role in mitochondrial dynamics, which in turn could explain the effects of its knockdown or knockout on nuclear DNA replication and/or repair (see e.g. Qin et al.¹⁷), yet again illustrating the importance of mitochondrial dynamics in diverse cellular processes. In the future, we hope to further clarify the exact molecular function of EXD2 by identification of its interaction partners using proximity labelling/mass spectrometry methods and clarify a possible ER interaction.

Acknowledgements:

GF was supported by the Clermont University, the Auvergne Region (Jeune Chercheur grant) and LABEX PRIMES (ANR-11-LABX-0063) of Université de Lyon, within the program "Investissements d'Avenir" (ANR-11-IDEX-0007) operated by the French National Research Agency (ANR). JNS was supported by the "Prinses Beatrix Spierfonds" and the "Stichting Spieren voor Spieren" (W.OR15-05).

Conflict of interest:

The authors declare that they have no competing financial interests.

Author contributions:

G.F. and J.N.S. conceived and designed the study. All authors contributed to the data collection and analysis. J.N.S. wrote the paper. All authors read and approved the final manuscript.

Materials and methods

Cell culture

HeLa, Hek293 (ATCC CRL-1573), U2OS cells (University of Helsinki, Finland) and inhouse primary human fibroblasts were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Lonza BE12-604F) supplemented with 10 % FCS (GE Healthcare), in a 37 °C incubator at 5 % CO_2 . All cell lines were routinely tested for mycoplasma contamination and found to be negative.

RNA-interference and overexpression: For EXD2 knockdown, cells were transfected in 6 well plates (for IF) or 10 cm cell culture dishes (for biochemical fractionation experiments) with a mixture of three Stealth[™] siRNA duplex oligonucleotides (EXD2 HSS124153, HSS124155 and HSS182946 Invitrogen), at a concentration of 10 nM each, using Lipofectamine[™]2000. Alternatively the individual siRNAs were used at a concentration of 30 nM. As controls we used Stealth[™] Universal negative controls at the same concentrations.

A commercial cDNA clone for the predicted full length cDNA for EXD2 and containing a Myc-DDK (FLAG) tag was acquired from Origene (Catalogue nr. RC231340) and recloned either with or without tag in a gateway customized pcDNA5/FRT/TO (Invitrogen) plasmid (kind gift of Dr. LGJ Nijtmans) using the Gateway recombination system. Inserts were fully sequenced to verify the wild-type sequence. Plasmids were used in transient transfections using TransIT-LT1 transfection reagent (Mirus), using manufacturer's instructions.

Mitochondrial isolation and iodixanol gradient purification of nuclei: Cells were collected and resuspended in hypotonic buffer (4 mM Tris-HCl, pH 7.8, 2.5 mM NaCl, 0.5 mM MgCl₂ including protease inhibitors (Roche Molecular Biochemicals)) allowed to swell for 10 min and disrupted with 20-25 strokes with a Dounce homogenizer on ice. The suspension was re-isotonised with 0,1 volume of 400 mM Tris-HCl, 250 mM NaCl and 50 mM MgCl₂. Nuclei and cell debris were first pelleted by centrifugation at 1 200*g* for 5 min at 4°C. The low speed centrifugation was repeated once and crude mitochondria were then pelleted from the cytosol by centrifugation at 13 000*g* for 10 min at 4°C. The low speed nuclear pellet was further subjected to iodixanol gradient purification as previously described¹¹ and pure nuclei were extracted in 20 mM Tris/HCl (pH 7.9), 25% glycerol, 0.42 M NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 0.1 mM PMSF and 0.5 mM DTT¹⁸. Na₂CO₃ extraction of crude mitochondria was done as previously described⁵.

Protein analyses were carried out by western blotting after separation by SDS-PAGE. Proteins were transferred from the gel onto a nitrocellulose membrane, which was probed with antibodies against proteins of interest and HRP-conjugated secondary antibodies followed by ECL detection. ECL reactions were visualized with a ChemiDoc instrument (Biorad). Antibodies used for Western blot detection were mtSSB (Sigma, HPA002866), EXD2 (Sigma, HPA005848), vimentin (Abcam Ab24525), nucleophosmin (Invitrogen, 32-5200), Porin (Invitrogen, A31855), TFAM (kind gift of Dr. R. Wiesner), COXI (Invitrogen), HSP60 (Abcam, Ab46798).

Immunofluorescence

For immunofluorescent detection cells were grown on coverslips in 6 well plates. Cells were fixed using 3.3% paraformaldehyde (PFA) in cell culture medium for 15-25 min,

washed 3x in PBS and permeabilized for 15 min with 0.5% Triton X100 in PBS/10% fetal calf serum (FCS). Primary and secondary antibodies were incubated at the following concentrations in PBS/10%FCS for 1 h: EXD2 rabbit polyclonal (Sigma, HPA005848), 1:200; TOMM20 mouse monoclonal (Santa Cruz, sc17764), 1:100; vimentin chicken polyclonal (Abcam Ab24525), 1:200. Secondary goat-anti-rabbit, goatanti-mouse and goat anti-chicken IgG were AlexaFluor 488, 568, and 647 (Invitrogen) labeled and used in various combinations at a 1:1000 dilution. 5-ethynyl-2'deoxyuridine (EdU) labeling and detection (Invitrogen), to identify nuclear DNA synthesis, was done as previously described⁵ with in this case a short 30' labeling period. Slides were mounted using ProLong® Gold antifade with DAPI (Invitrogen). Image acquisition used the Zeiss apotome system on an axio-observer Z.1 with Colibri led illumination and appropriate emission filters. In all cases in which controls are compared with experimental manipulation of cells (for example using siRNA), images have been acquisitioned with identical illumination and exposure settings and processed identically. Where needed, images were further processed using ImageJ or Photoshop to adjust brightness/contrast and size/resolution.

Nuclear DNA damage and repair induction by irradiation

HeLa cells were grown overnight on coverslips in 6 well plates and X-irradiated with doses of 0 or 13 Gy with an X-RAD 320 biological irradiator (Precision X-ray, Inc., PAVIRMA platform, Clermont-Ferrand, France). After a 30 min recovery at 37°C, cells were washed with PBS, fixed with 3.7% formaldehyde in PBS at 37°C for 15min, washed 3 times with PBS-0.1% Tween (PBST), permeabilized with PBS-0.5% Triton 100X at RT for 10 min, washed 3 times with PBST and incubated with a blocking solution (1% BSA, 22.52mg/mL glycine in PBST) at RT for 30min. For visualization of EXD2 and gamma-H2AX, coverslips were then incubated with anti-EXD2 antibody (1:200 in PBS, Sigma HPA005848) and anti-gamma-H2AX antibody (1:200 in PBS, Merck Millipore 05-636-I) at RT for 1h30. Unbound antibodies were removed with 3 washes with PBST. Coverslips were incubated at RT for 1h with secondary antibodies, anti-rabbit IgG conjugated to Alexa Fluor 555 (1:1000 in PBS) and anti-mouse IgG conjugated to Alexa Fluor 488 (1:1000 in PBS, Molecular Probes A21151). Cells were washed 3 times with PBST and DNA was counterstained with DAPI. A final wash was performed with PBS. Coverslips were mounted using 10ul PBS/Glycerol (50/50, v/v) and observed using a Leica MMAF Imaging NX microscope powered by Metamorph.

Data availability The data generated during and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Figure legends:

Fig 1: EXD2 is a mitochondrial outer membrane associated protein. U2OS cell crude mitochondria isolated by differential centrifugation and pure nuclei isolated on iodixanol gradients were tested for EXD2 abundance in control siRNA and EXD2 siRNA treated cells (panel a1). Results show that the vast majority of EXD2, similar to mitochondrial marker proteins mtSSB and porin are found in the mitochondrial fraction and not in the nuclear fraction, in which the nuclear marker nucleophosmin is identified. SiRNA treatment confirms the identity of the full length (fl) ~70 kDa EXD2 protein and several lower abundant species of 30 kDa and higher molecular weight. Knockdown with either the combined pool of three commercial siRNAs or each individual siRNA show similar knockdown efficiencies in total cell lysates on Western blots (panel a2). At the same time, several lower molecular weight EXD2 species are also identified and all appear to be equally sensitive to each individual siRNA suggesting they might be breakdown or processed EXD2 forms. Protease protection demonstrates mitochondrial EXD2 is mostly found in the mitochondrial outer membrane (panel b). Mitochondria and digitonin-derived mitoplasts from HEK293 cells were treated either with Proteinase K (ProtK) alone or with ProtK and Triton-X100 (TX100) to lyse the inner and outer membrane. Results show that whereas TFAM, an mtDNA associated protein, is protected from ProtK in the absence of TX100, EXD2 is not, suggesting and outer-membrane localization. * Indicates a remnant signal from the probing with an antibody against a different mitochondrial candidate protein not relevant for this paper. A Na₂CO₃ extract of crude mitochondria from HEK293 cells (panel c) shows that similar to cytochrome c oxidase subunit I (an integral membrane protein), full length EXD2 is found predominantly in the pellet (membrane) fraction, whereas the majority of HSP60 is found in the supernatant (non-membrane) fraction. For each panel (except panel b) cropped images show the results of incubations with subsequent antibodies on the same blots, indicated by dividing lines (see Supplementary info for full blot images).

Fig 2: Knockdown or overexpression in U2OS cells of full-length EXD2 confirms the mitochondrial localization of EXD2. ProteinAtlas describes their EXD2 antibody, which we have used throughout this study, as having a mitochondrial and possible intermediate filament localization. To test the localization and the validity of their antibody we tested the EXD2 antibody, together with an antibody against the outermembrane protein TOMM20 and an antibody against the intermediate filament protein vimentin (Vim) using immunofluorescence following transfection with either a pool of non-targeting control siRNAs or a pool of three EXD2 Stealth siRNAs (panel a). Costaining in control siRNA cells with Tomm20 and vimentin shows co-localization of the EXD2 signal both with mitochondrial and intermediate filament signals. EXD2 siRNA treatment shows that while the EXD2 mitochondrial signal is no longer observed, the intermediate filament signal remains suggesting that this signal is either non-specific or that the siRNA pool used does not affect intermediate filament associated EXD2. Transient overexpression of the predicted full length protein, either w/o a tag or with a C-terminal combined Myc/FLAG tag shows an exclusive mitochondrial localization of the protein as illustrated by TOMM20 co-staining, while higher level overexpression results in mitochondrial perinuclear clustering (panel b). With very high overexpression, the whole mitochondrial network collapsed in one large perinuclear cluster that had lost any typical mitochondrial network-like structure (not shown).

Overexpressed full length EXD2 showed no evidence of either nuclear or intermediate filament localization.

Fig 3: SiRNA mediated knockdown of EXD2 results in a more widely spread mitochondrial network. In order to understand possible effects of EXD2 knockdown on mitochondrial network behaviour we labelled cells with EdU to identify cells in S-phase, in order to get a handle on mosaicism resulting from cell-cycle mediated effects on mitochondrial network dynamics (see main text). For this, cells were incubated for 30' with EdU following transfection and 48-60 hrs incubation with either a pool of nontargeting control siRNAs (Csi), a pool of three EXD2 stealth siRNAs (EXD2si3x) or individual EXD2 siRNAs (EXD2si+nr). Following labelling for EdU incorporation (green, gr), cells were further labelled with antibodies for Tomm20 (red, r) and EXD2 (white). Control siRNA treated cells show frequent and strong perinuclear clustering of the mitochondrial network in particular in EdU positive cells. In contrast, the EXD2si3x as well as EXD2si 124153 and EXD2si 182946 typically show a more distributed and sometimes more hyperfused network, especially with EXD2si 124153. EXD2si 124155 was somewhat more reminiscent of Csi treated cells, although, based on Western blot analysis (Fig 1, panel A2), all three individual siRNAs show similar knockdown efficiency, at least for the protein forms that we could detect by Western blot.

Fig 4: Nuclear DNA-damage does not relocate EXD2 to the nucleus. HeLa cells were treated with 13Gy X-irradiation to induce nuclear DNA damage and allowed to recover for 30 minutes. Results show that H2AX phosphorylation is considerably increased in the nucleus following this damage whereas EXD2 retains its predominant mitochondrial localization similar to its location in control cells.

References

- 1. Biehs, R. *et al.* DNA Double-Strand Break Resection Occurs during Nonhomologous End Joining in G1 but Is Distinct from Resection during Homologous Recombination. *Mol Cell* **65**, 671-684 e675 (2017).
- 2. Broderick, R. *et al.* EXD2 promotes homologous recombination by facilitating DNA end resection. *Nat Cell Biol* **18**, 271-280 (2016).
- 3. Nieminuszczy, J., Broderick, R. & Niedzwiedz, W. EXD2 a new player joins the DSB resection team. *Cell Cycle* **15**, 1519-1520 (2016).
- 4. Moretton, A. *et al.* Selective mitochondrial DNA degradation following doublestrand breaks. *PLoS One* **12**, e0176795 (2017).
- 5. Rajala, N., Gerhold, J.M., Martinsson, P., Klymov, A. & Spelbrink, J.N. Replication factors transiently associate with mtDNA at the mitochondrial inner membrane to facilitate replication. *Nucl Acids Res* **42**, 952-967 (2014).
- 6. Claros, M.G. & Vincens, P. Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *Eur J Biochem* **241**, 779-786 (1996).
- 7. Nakai, K. & Horton, P. PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. *Trends Biochem Sci* **24**, 34-35 (1999).
- 8. Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S. & von Heijne, G. Predicting Subcellular Localization of Proteins Based on their N-terminal Amino Acid Sequence. *J Mol Biol* **300**, 1005-1016 (2000).

- 9. Mason, P.A. & Cox, L.S. The role of DNA exonucleases in protecting genome stability and their impact on ageing. *Age (Dordr)* **34**, 1317-1340 (2012).
- 10. Thul, P.J. *et al.* A subcellular map of the human proteome. *Science* **356** (2017).
- 11. Cooper, H.M. & Spelbrink, J.N. The human SIRT3 protein deacetylase is exclusively mitochondrial. *Biochem J* **411**, 279-285 (2008).
- 12. Duxin, J.P. *et al.* Human Dna2 Is a Nuclear and Mitochondrial DNA Maintenance Protein *Mol Cell Biol.* **29**, 4274-4282 (2009).
- 13. Larsson, N.G. *et al.* Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice. *Nat Genet.* **18**, 231-236 (1998).
- 14. Mitra, K., Wunder, C., Roysam, B., Lin, G. & Lippincott-Schwartz, J. A hyperfused mitochondrial state achieved at G1–S regulates cyclin E buildup and entry into S phase. *Proc Natl Acad Sci* **106**, 11960-11965 (2009).
- 15. Burma, S., Chen, B.P., Murphy, M., Kurimasa, A. & Chen, D.J. ATM Phosphorylates Histone H2AX in Response to DNA Double-strand Breaks. *J Biol Chem* **276**, 42462-42467 (2001).
- 16. Hung, V. *et al.* Proteomic mapping of cytosol-facing outer mitochondrial and ER membranes in living human cells by proximity biotinylation. *eLife* **6**, e24463 (2017).
- 17. Qin, L. *et al.* CDK1 Enhances Mitochondrial Bioenergetics for Radiation-Induced DNA Repair. *Cell reports* **13**, 2056-2063 (2015).
- 18. Dingham, J.D., Lebovitz, R.M. & Roeder, R.G. Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei *Nucl Acids Res.* **11**, 1475-1489 (1983).





Fig 2, Hensen et al



Fig 3, Hensen et al



Fig 4, Hensen et al

Figures supplémentaires



Figure S 1 – Analyse du profil d'ADNmt de 5 clones de cellules HEK PstI, sans induction L'ADNmt de cinq populations clonales de cellules HEK PstI a été analysé par Southern Blot en l'absence de traitement avec la doxycycline, après linéarisation par BamHI. Le clone 4 a été choisi pour la suite des expériences. L'ADN de cellules HEK WT digéré *in vitro* par PstI sert de contrôle (piste 1).



Figure S 2 – Vérification de la reproductibilité de l'induction de PstI

Pour s'affranchir du problème de dérive du système au cours du temps un ancien lot de cellules PstI a été décongelé et amplifié, et plusieurs lots de cellules ont ensuite été congelées, en même temps. La comparaison du profil de l'ADNmt suite à l'induction de CDBmt pour deux lots de ces cellules nouvellement décongelées a été réalisée par Southern Blot. L'ADNmt est linéarisé par BamHI avant dépôt sur gel, l'ADN de cellules HEK WT digéré *in vitro* par PstI sert de contrôle.



Figure S 3 – Activité aspécifique de PstI in vitro

 $5\mu g$ de deux plasmides circulaires ont été incubés avec PstI *in vitro* à 37°C : le premier ne possède pas de site de restriction PstI (pistes 1 et 2) et le deuxième un site PstI (pistes 3 et 4). Les plasmides non digérés (pistes 1 et 3) et digérés PstI (pistes 2 et 4) ont été déposés sur gel d'agarose. Aucune activité STAR n'a été détectée, seule le plasmide possédant un site de restriction a été linéarisé (piste 4).



Figure S 4 – Impact des CDBmt sur l'expression de protéines mitochondriales jusqu'à 6 jours post-induction

Niveaux de protéines mitochondriales avant et après induction de l'expression de PstI par traitement de 2h avec la doxycycline, jusqu'à 6 jours post-induction. $30\mu g$ de protéines cellulaires totales ont été analysés par Western Blot avec des anticorps dirigés contre la protéine matricielle PDH, la protéine de la membrane externe mitochondriale TOMM20, l'hélicase TWINKLE, la polymérase POL γA et le facteur de transcription TFAM. H3 : témoin de charge.



Figure S 5 – Visualisation de la perte d'ADNmt par microscopie en épifluorescence Des cellules HEK PstI non induites ou 1j post-induction ont été marquées par le DAPI (bleu) et un anticorps anti-TFAM ou un anticorps anti-ADN (vert). Les cellules marquées avec l'anticorps anti-ADN ont été observées en utilisant une lumière structurée grâce au module OptiGrid du microscope LEICA.



Figure S 6 – Croissance des cellules après induction des CDBmt

L'inverse du temps de doublement (h-1) est représenté en fonction du nombre de jours post-induction, pour les cellules HEK WT (en bleu) et les cellules HEK PstI induites (en rouge), n=1. L'inverse du temps de doublement a été modélisé par une régression linéaire pour les cellules HEK WT et par un modèle « phenomenological logistics growth » ($y = A/(1+Be^{-}kx)$, avec A=0.05, B=2000 et k=0.5) pour les cellules HEK PstI induites, qui montre trois régimes : croissance lente au début, puis croissance rapide et croissance lente.

с	м	N	
•	-		EXOG
	-		MGME1
-			FEN1

Figure S 7 – Localisation des nucléases par Western Blot

Localisation par Western Blot avec des anticorps ciblant EXOG, MGME1 ou FEN1 après fractionnement subcellulaire (dépôts inégaux). C : fraction cytoplasmique; M : fraction mitochondriale; N : fraction nucléaire.



Figure S 8 – Structure de la didéoxycytidine (ddC) Le ddC est métabolisé en ddCTP, un analogue de la déoxycytidine (dCTP) et est incorporé dans l'ADNmt

par la POL γ lors de la réplication, ce qui bloque la polymérase.



Figure S 9 – Efficacité des siRNA ciblant les candidates de la dégradation de l'ADNmt suite à des CDB

L'efficacité des siRNA ciblant les protéines à activité nucléase potentiellement mitochondriales a été vérifiée par Western Blot avec des anticorps anti (A) SND1 (double transfection des siRNA), (B) DFFB (double transfection des siRNA) et (C) EXD2 (transfection simple des siRNA).



Figure S 10 - Fractions mitochondriales analysées en protéomique

Des fractions subcellulaires de cellules HEK WT et HEK PstI non induites ont été déposées sur gel SDS-PAGE et visualisées par coloration au bleu de Coomassie avant que les fractions mitochondriales soient analysées en protéomique (HPLC nano débit couplée à un spectromètre de masse ayant une source nanoelectrospray). C : fraction cytoplasmique; M : fraction mitochondriale; N : fraction nucléaire.



Figure S 11 – Impact de la composition du fond des plaques 96 puits sur les ratios d'intensités de fluorescence TFAM/ DAPI

Des cellules HEK WT ont été cultivées et transfectées ou non par des siRNA dans différentes plaques 96 puits : fond en verre, fond en verre recouvert de PLL ou fond en plastique, puis le rapport des intensités de fluorescence de TFAM, après marquage par immunofluorescence, et du DAPI a été mesuré par microscopie. Bleu clair : cellules non transfectées siRNA ; orange : cellules diluées dans l'OptiMEM et mises en présence de lipofectamine pendant 5h; gris : cellules transfectées par des siRNA ciblant TFAM et diluées dans l'OptiMEM; jaune : cellules diluées dans le DMEM et mises en présence de lipofectamine pendant 5h; gris dans le DMEM et mises en présence de lipofectamine (Expérience réalisée par Xie Xie)





Des cellules HEK WT et HEK PstI ont été ensemencées à différentes concentrations dans une plaque 96 puits et le rapport des intensités de fluorescence de TFAM, après marquage par immunofluorescence, et du DAPI a été mesuré à l'aide d'un microscope automatique (scanR). (Expérience réalisée par Xie Xie)





(A) Les transcrits NUDT6 ont été quantifiés par qPCR, après normalisation avec l'ARN de référence TBP, dans les cellules HAP1 WT et HAP1 KO NUDT6 (moyenne, n=2). (B) Analyse des amplicons des transcrits NUDT6 obtenus par qPCR sur gel d'agarose 2%.



Figure S 14 – Vérification de l'absence d'expression de NUDT19 dans les cellules HAP1 KO NUDT19

(A) $20\mu g$ de protéines cellulaires totales de cellules HAP1 WT et KO NUDT19 ont été analysés par Western Blot, avec un anticorps ciblant NUDT19. (B) Observation de cellules HAP1 WT et KO NUDT19 incubées avec un anticorps primaire ciblant NUDT19 marqué par un anticorps secondaire lié à l'Alexa Fluor 488 (vert). Barres d'échelle : $10\mu m$.

Bibliographie

- Abou-Ghali, M. et Stiban, J. : Regulation of ceramide channel formation and disassembly : Insights on the initiation of apoptosis. *Saudi journal of biological sciences*, 22:760–772, novembre 2015.
- Agaronyan, K., Morozov, Y. I., Anikin, M. et Temiakov, D. : Mitochondrial biology. Replication-transcription switch in human mitochondria. *Science (New York, N.Y.)*, 347:548–551, janvier 2015.
- Akbari, M., Visnes, T., Krokan, H. E. et Otterlei, M. : Mitochondrial base excision repair of uracil and AP sites takes place by single-nucleotide insertion and long-patch DNA synthesis. *DNA repair*, 7:605–616, avril 2008.
- Akhmedov, A. T. et Marín-García, J. : Mitochondrial DNA maintenance : an appraisal. *Molecular and cellular biochemistry*, 409:283–305, novembre 2015.
- Akram, M. : Citric acid cycle and role of its intermediates in metabolism. *Cell biochemistry and biophysics*, 68:475–478, avril 2014.
- Alberts, B., Johnson, A. et Lewis, J. : The Mitochondrion. *Molecular Biology of the Cell. 4th edition*, 2002.
- Allen, J. F. : Why chloroplasts and mitochondria contain genomes. *Comparative and functional genomics*, 4(1):31–36, 2003.
- Allen, J. F. : The CoRR hypothesis for genes in organelles. *Journal of Theoretical Biology*, 2017.
- Anderson, S., Bankier, A. T., Barrell, B. G., de Bruijn, M. H., Coulson, A. R., Drouin, J., Eperon, I. C., Nierlich, D. P., Roe, B. A., Sanger, F., Schreier, P. H., Smith, A. J., Staden, R. et Young, I. G. : Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 290:457–465, avril 1981.
- Antes, A., Tappin, I., Chung, S., Lim, R., Lu, B., Parrott, A. M., Hill, H. Z., Suzuki, C. K. et Lee, C.-G. : Differential regulation of full-length genome and a single-stranded 7S DNA along the cell cycle in human mitochondria. *Nucleic acids research*, 38:6466–6476, octobre 2010.
- Antonicka, H., Sasarman, F., Nishimura, T., Paupe, V. et Shoubridge, E. A. : The mitochondrial RNA-binding protein GRSF1 localizes to RNA granules and is required for posttranscriptional mitochondrial gene expression. *Cell metabolism*, 17:386–398, mars 2013.
- Aon, M. A., Bhatt, N. et Cortassa, S. C. : Mitochondrial and cellular mechanisms for managing lipid excess. *Frontiers in physiology*, 5:282, 2014.
- Auré, K., Jardel, C. et Lombès, A. : [Mitochondrial diseases : molecular mechanisms, clinical presentations and diagnosis investigations]. *Annales de pathologie*, 25:270–281, septembre 2005.
- Bacman, S. R., Williams, S. L. et Moraes, C. T. : Intra- and inter-molecular recombination of mitochondrial DNA after in vivo induction of multiple double-strand breaks. *Nucleic Acids Research*, 37(13):4218–4226, may 2009.
- Bacman, S. R., Williams, S. L., Pinto, M. et Moraes, C. T. : The Use of Mitochondria-Targeted Endonucleases to Manipulate mtDNA. *In Methods in Enzymology*, pages 373–397. Elsevier BV, 2014.
- Baguma-Nibasheka, M., Macfarlane, L. A. et Murphy, P. R. : Regulation of fibroblast growth factor-2 expression and cell cycle progression by an endogenous antisense RNA. *Genes*, 3:505–520, août 2012.
- Bai, R.-K. et Wong, L.-J. C. : Simultaneous detection and quantification of mitochondrial DNA deletion(s), depletion, and over-replication in patients with mitochondrial disease. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*, 7:613–622, novembre 2005.
- Bailey, L. J. et Doherty, A. J. : Mitochondrial DNA replication : a PrimPol perspective. *Biochemical Society Transactions*, 45(2):513–529, 2017.
- Baker, M. J., Lampe, P. A., Stojanovski, D., Korwitz, A., Anand, R., Tatsuta, T. et Langer,
 T. : Stress-induced OMA1 activation and autocatalytic turnover regulate OPA1-dependent
 mitochondrial dynamics. *The EMBO journal*, 33:578–593, mars 2014.
- Balakrishnan, L. et Bambara, R. A. : Flap endonuclease 1. *Annual review of biochemistry*, 82:119–138, 2013.
- Bandiera, S., Rüberg, S., Girard, M., Cagnard, N., Hanein, S., Chrétien, D., Munnich, A., Lyonnet, S. et Henrion-Caude, A. : Nuclear outsourcing of RNA interference components to human mitochondria. *PloS one*, 6:e20746, 2011.
- Bannwarth, S., Figueroa, A., Fragaki, K., Destroismaisons, L., Lacas-Gervais, S., Lespinasse, F., Vandenbos, F., Pradelli, L. A., Ricci, J.-E., Rötig, A. et others : The human MSH5 (MutS-Homolog 5) protein localizes to mitochondria and protects the mitochondrial genome from oxidative damage. *Mitochondrion*, 12(6):654–665, 2012.
- Bennardo, N., Cheng, A., Huang, N. et Stark, J. M. : Alternative-NHEJ is a mechanistically distinct pathway of mammalian chromosome break repair. *PLoS genetics*, 4:e1000110, juin 2008.
- Berglund, A.-K., Navarrete, C., Engqvist, M. K. M., Hoberg, E., Szilagyi, Z., Taylor, R. W., Gustafsson, C. M., Falkenberg, M. et Clausen, A. R. : Nucleotide pools dictate the identity and frequency of ribonucleotide incorporation in mitochondrial DNA. *PLoS genetics*, 13: e1006628, février 2017.
- Bess, A. S., Crocker, T. L., Ryde, I. T. et Meyer, J. N. : Mitochondrial dynamics and autophagy aid in removal of persistent mitochondrial DNA damage in Caenorhabditis elegans. *Nucleic acids research*, 40(16):7916–7931, 2012.

- Bess, A. S., Ryde, I. T., Hinton, D. E. et Meyer, J. N. : UVC-induced mitochondrial degradation via autophagy correlates with mtDNA damage removal in primary human fibroblasts. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 27:28–41, janvier 2013.
- Bestwick, M. L. et Shadel, G. S. : Accessorizing the human mitochondrial transcription machinery. *Trends in biochemical sciences*, 38:283–291, juin 2013.
- Bhargava, R., Onyango, D. O. et Stark, J. M. : Regulation of Single-Strand Annealing and its Role in Genome Maintenance. *Trends in genetics : TIG*, 32:566–575, septembre 2016.
- Bhola, P. D. et Letai, A. : Mitochondria-Judges and Executioners of Cell Death Sentences. *Molecular cell*, 61:695–704, mars 2016.
- Blokhin, A., Vyshkina, T., Komoly, S. et Kalman, B. : Variations in mitochondrial DNA copy numbers in MS brains. *Journal of molecular neuroscience : MN*, 35:283–287, juillet 2008.
- Boch, J.: TALEs of genome targeting. Nature biotechnology, 29:135–136, février 2011.
- Bockamp, E., Maringer, M., Spangenberg, C., Fees, S., Fraser, S., Eshkind, L., Oesch, F. et Zabel, B. : Of mice and models : improved animal models for biomedical research. *Physiological genomics*, 11:115–132, décembre 2002.
- Bourdon, A., Minai, L., Serre, V., Jais, J.-P., Sarzi, E., Aubert, S., Chrétien, D., de Lonlay, P., Paquis-Flucklinger, V., Arakawa, H., Nakamura, Y., Munnich, A. et Rötig, A. : Mutation of RRM2B, encoding p53-controlled ribonucleotide reductase (p53R2), causes severe mitochondrial DNA depletion. *Nature genetics*, 39:776–780, juin 2007.
- Broderick, R., Nieminuszczy, J., Baddock, H. T., Deshpande, R. A., Gileadi, O., Paull, T. T., McHugh, P. J. et Niedzwiedz, W. : EXD2 promotes homologous recombination by facilitating DNA end resection. *Nature Cell Biology*, 18(3):271–280, jan 2016.
- Brown, T. A., Cecconi, C., Tkachuk, A. N., Bustamante, C. et Clayton, D. A. : Replication of mitochondrial DNA occurs by strand displacement with alternative light-strand origins, not via a strand-coupled mechanism. *Genes & development*, 19:2466–2476, octobre 2005.
- Brown, T. A. et Clayton, D. A. : Release of replication termination controls mitochondrial DNA copy number after depletion with 2',3'-dideoxycytidine. *Nucleic acids research*, 30:2004–2010, mai 2002.
- Busch, K. B., Kowald, A. et Spelbrink, J. N. : Quality matters : how does mitochondrial network dynamics and quality control impact on mtDNA integrity ? *Philosophical Transactions of the Royal Society B : Biological Sciences*, 369(1646):20130442–20130442, may 2014.
- Cagin, U. et Enriquez, J. A. : The complex crosstalk between mitochondria and the nucleus : What goes in between? *The international journal of biochemistry & cell biology*, 63:10–15, juin 2015.
- Calvo, S. E., Clauser, K. R. et Mootha, V. K. : MitoCarta2.0 : an updated inventory of mammalian mitochondrial proteins. *Nucleic acids research*, 44:D1251–D1257, janvier 2016.
- Calvo, S. E., Compton, A. G., Hershman, S. G., Lim, S. C., Lieber, D. S., Tucker, E. J., Laskowski, A., Garone, C., Liu, S., Jaffe, D. B., Christodoulou, J., Fletcher, J. M., Bruno, D. L.,

Goldblatt, J., Dimauro, S., Thorburn, D. R. et Mootha, V. K. : Molecular diagnosis of infantile mitochondrial disease with targeted next-generation sequencing. *Science translational medicine*, 4:118ra10, janvier 2012.

- Candé, C., Cohen, I., Daugas, E., Ravagnan, L., Larochette, N., Zamzami, N. et Kroemer, G. : Apoptosis-inducing factor (AIF) : a novel caspase-independent death effector released from mitochondria. *Biochimie*, 84:215–222, 2002.
- Cantó, C., Houtkooper, R. H., Pirinen, E., Youn, D. Y., Oosterveer, M. H., Cen, Y., Fernandez-Marcos, P. J., Yamamoto, H., Andreux, P. A., Cettour-Rose, P., Gademann, K., Rinsch, C., Schoonjans, K., Sauve, A. A. et Auwerx, J. : The NAD(+) precursor nicotinamide riboside enhances oxidative metabolism and protects against high-fat diet-induced obesity. *Cell metabolism*, 15:838–847, juin 2012.
- Cantó, C., Jiang, L. Q., Deshmukh, A. S., Mataki, C., Coste, A., Lagouge, M., Zierath, J. R. et Auwerx, J. : Interdependence of AMPK and SIRT1 for metabolic adaptation to fasting and exercise in skeletal muscle. *Cell metabolism*, 11:213–219, mars 2010.
- Carling, P. J., Cree, L. M. et Chinnery, P. F. : The implications of mitochondrial DNA copy number regulation during embryogenesis. *Mitochondrion*, 11:686–692, septembre 2011.
- Carroll, C. J., Brilhante, V. et Suomalainen, A. : Next-generation sequencing for mitochondrial disorders. *British journal of pharmacology*, 171:1837–1853, avril 2014.
- Cerritelli, S. M., Frolova, E. G., Feng, C., Grinberg, A., Love, P. E. et Crouch, R. J. : Failure to produce mitochondrial DNA results in embryonic lethality in Rnaseh1 null mice. *Molecular cell*, 11:807–815, mars 2003.
- Chan, S. S. L. et Copeland, W. C. : DNA polymerase gamma and mitochondrial disease : understanding the consequence of POLG mutations. *Biochimica et biophysica acta*, 1787: 312–319, mai 2009.
- Chang, D. D. et Clayton, D. A. : A mammalian mitochondrial RNA processing activity contains nucleus-encoded RNA. *Science (New York, N.Y.)*, 235:1178–1184, mars 1987.
- Chang, J. H. et Tong, L. : Mitochondrial poly(A) polymerase and polyadenylation. *Biochimica et biophysica acta*, 1819:992–997, 2012.
- Chen, J., Ghorai, M. K., Kenney, G. et Stubbe, J. : Mechanistic studies on bleomycin-mediated DNA damage : multiple binding modes can result in double-stranded DNA cleavage. *Nucleic acids research*, 36:3781–3790, juin 2008.
- Chen, T., He, J., Huang, Y. et Zhao, W. : The generation of mitochondrial DNA large-scale deletions in human cells. *Journal of human genetics*, 56:689–694, octobre 2011.
- Chen, T. J., Gao, F., Yang, T., Thakur, A., Ren, H., Li, Y., Zhang, S., Wang, T. et Chen, M. W. : CDK-associated Cullin 1 promotes cell proliferation with activation of ERK1/2 in human lung cancer A549 cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 437(1):108– 113, 2013.
- Chinnery, P. F. et Hudson, G. : Mitochondrial genetics. *British medical bulletin*, 106:135–159, 2013.

- Clay Montier, L. L., Deng, J. J. et Bai, Y. : Number matters : control of mammalian mitochondrial DNA copy number. *Journal of genetics and genomics = Yi chuan xue bao*, 36:125–131, mars 2009.
- Clayton, D. A.: Replication of animal mitochondrial DNA. Cell, 28:693-705, avril 1982.
- Coffey, G. et Campbell, C. : An alternate form of Ku80 is required for DNA end-binding activity in mammalian mitochondria. *Nucleic Acids Research*, 28(19):3793–3800, oct 2000.
- Copeland, W. C. et Longley, M. J. : Mitochondrial genome maintenance in health and disease. *DNA repair*, 19:190–198, juillet 2014.
- Costantino, L., Sotiriou, S. K., Rantala, J. K., Magin, S., Mladenov, E., Helleday, T., Haber, J. E., Iliakis, G., Kallioniemi, O. P. et Halazonetis, T. D. : Break-induced replication repair of damaged forks induces genomic duplications in human cells. *Science (New York, N.Y.)*, 343:88–91, janvier 2014.
- Cotney, J., McKay, S. E. et Shadel, G. S. : Elucidation of separate, but collaborative functions of the rRNA methyltransferase-related human mitochondrial transcription factors B1 and B2 in mitochondrial biogenesis reveals new insight into maternally inherited deafness. *Human molecular genetics*, 18:2670–2682, juillet 2009.
- Cotney, J. et Shadel, G. S. : Evidence for an early gene duplication event in the evolution of the mitochondrial transcription factor B family and maintenance of rRNA methyltransferase activity in human mtTFB1 and mtTFB2. *Journal of molecular evolution*, 63:707–717, novembre 2006.
- Cymerman, I. A., Chung, I., Beckmann, B. M., Bujnicki, J. M. et Meiss, G. : EXOG, a novel paralog of Endonuclease G in higher eukaryotes. *Nucleic acids research*, 36:1369–1379, mars 2008.
- Das, B. B., Dexheimer, T. S., Maddali, K. et Pommier, Y. : Role of tyrosyl-DNA phosphodiesterase (TDP1) in mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107:19790–19795, novembre 2010.
- de Souza-Pinto, N. C., Mason, P. A., Hashiguchi, K., Weissman, L., Tian, J., Guay, D., Lebel, M., Stevnsner, T. V., Rasmussen, L. J. et Bohr, V. A. : Novel DNA mismatch-repair activity involving YB-1 in human mitochondria. *DNA repair*, 8:704–719, juin 2009.
- DeMott, M. S., Beyret, E., Wong, D., Bales, B. C., Hwang, J.-T., Greenberg, M. M. et Demple,
 B. : Covalent trapping of human DNA polymerase beta by the oxidative DNA lesion 2deoxyribonolactone. *The Journal of biological chemistry*, 277:7637–7640, mars 2002.
- Deriano, L. et Roth, D. B. : Modernizing the nonhomologous end-joining repertoire : alternative and classical NHEJ share the stage. *Annual review of genetics*, 47:433–455, 2013.
- Di Noia, M. A., Todisco, S., Cirigliano, A., Rinaldi, T., Agrimi, G., Iacobazzi, V. et Palmieri, F. : The human SLC25A33 and SLC25A36 genes of solute carrier family 25 encode two mitochondrial pyrimidine nucleotide transporters. *The Journal of biological chemistry*, 289: 33137–33148, novembre 2014.
- DiMauro, S. et Davidzon, G. : Mitochondrial DNA and disease. *Annals of Medicine*, 37(3):222–232, may 2005.

- Diot, A., Morten, K. et Poulton, J. : Mitophagy plays a central role in mitochondrial ageing. *Mammalian Genome*, 27(7-8):381–395, jun 2016.
- Dominissini, D. et He, C. : Cancer : Damage prevention targeted. *Nature*, 508:191–192, avril 2014.
- Duguay, B. A. et Smiley, J. R. : Mitochondrial Nucleases ENDOG and EXOG Participate in Mitochondrial DNA Depletion Initiated by Herpes Simplex Virus 1 UL12.5. *Journal of Virology*, 87(21):11787–11797, aug 2013.
- Duxin, J. P., Dao, B., Martinsson, P., Rajala, N., Guittat, L., Campbell, J. L., Spelbrink, J. N. et Stewart, S. A. : Human Dna2 is a nuclear and mitochondrial DNA maintenance protein. *Molecular and cellular biology*, 29:4274–4282, août 2009.
- Eichler, D. C., Wang, T. S., Clayton, D. A. et Korn, D. : In vitro replication of mitochondrial DNA. Elongation of the endogenous primer sequence in D loop mitochondrial DNA by human DNA polymerase beta. *The Journal of biological chemistry*, 252:7888–7893, novembre 1977.
- Ekstrand, M. I. : Mitochondrial transcription factor A regulates mtDNA copy number in mammals. *Human Molecular Genetics*, 13(9):935–944, mar 2004.
- Eriksson, S., Munch-Petersen, B., Johansson, K. et Eklund, H. : Structure and function of cellular deoxyribonucleoside kinases. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 59:1327–1346, août 2002.
- Falkenberg, M., Larsson, N.-G. et Gustafsson, C. M. : DNA replication and transcription in mammalian mitochondria. *Annual review of biochemistry*, 76:679–699, 2007.
- Fan, W. et Wu, X. : DNA polymerase lambda can elongate on DNA substrates mimicking non-homologous end joining and interact with XRCC4-ligase IV complex. *Biochemical and biophysical research communications*, 323:1328–1333, octobre 2004.
- Farge, G., Holmlund, T., Khvorostova, J., Rofougaran, R., Hofer, A. et Falkenberg, M. : The N-terminal domain of TWINKLE contributes to single-stranded DNA binding and DNA helicase activities. *Nucleic acids research*, 36:393–403, février 2008.
- Farge, G., Laurens, N., Broekmans, O. D., van den Wildenberg, S. M. J. L., Dekker, L. C. M., Gaspari, M., Gustafsson, C. M., Peterman, E. J. G., Falkenberg, M. et Wuite, G. J. L. : Protein sliding and DNA denaturation are essential for DNA organization by human mitochondrial transcription factor A. *Nature communications*, 3:1013, 2012.
- Farge, G., Pham, X. H., Holmlund, T., Khorostov, I. et Falkenberg, M. : The accessory subunit B of DNA polymerase gamma is required for mitochondrial replisome function. *Nucleic acids research*, 35:902–911, 2007.
- Ferreira, M., Evangelista, T., Almeida, L. S., Martins, J., Macario, M. C., Martins, E., Moleirinho, A., Azevedo, L., Vilarinho, L. et Santorelli, F. M. : Relative frequency of known causes of multiple mtDNA deletions : two novel POLG mutations. *Neuromuscular Disorders*, 21 (7):483–488, 2011.

- Fonteriz, R., Matesanz-Isabel, J., Arias-Del-Val, J., Alvarez-Illera, P., Montero, M. et Alvarez, J. : Modulation of Calcium Entry by Mitochondria. *Advances in experimental medicine and biology*, 898:405–421, 2016.
- Fortini, B. K., Pokharel, S., Polaczek, P., Balakrishnan, L., Bambara, R. A. et Campbell, J. L. : Characterization of the endonuclease and ATP-dependent flap endo/exonuclease of Dna2. *The Journal of biological chemistry*, 286:23763–23770, juillet 2011.
- Fox, T. D. : Mitochondrial protein synthesis, import, and assembly. *Genetics*, 192:1203–1234, décembre 2012.
- Franzolin, E., Salata, C., Bianchi, V. et Rampazzo, C. : The Deoxynucleoside Triphosphate Triphosphohydrolase Activity of SAMHD1 Protein Contributes to the Mitochondrial DNA Depletion Associated with Genetic Deficiency of Deoxyguanosine Kinase. *The Journal of biological chemistry*, 290:25986–25996, octobre 2015.
- Fukui, H. et Moraes, C. T. : Mechanisms of formation and accumulation of mitochondrial DNA deletions in aging neurons. *Human molecular genetics*, 18:1028–1036, mars 2009.
- Fusté, J. M., Wanrooij, S., Jemt, E., Granycome, C. E., Cluett, T. J., Shi, Y., Atanassova, N., Holt, I. J., Gustafsson, C. M. et Falkenberg, M. : Mitochondrial RNA polymerase is needed for activation of the origin of light-strand DNA replication. *Molecular cell*, 37:67–78, janvier 2010.
- Gammage, P. A., Rorbach, J., Vincent, A. I., Rebar, E. J. et Minczuk, M. : Mitochondrially targeted ZFNs for selective degradation of pathogenic mitochondrial genomes bearing large-scale deletions or point mutations. *EMBO Molecular Medicine*, 6(4):458–466, feb 2014.
- Gaspari, M., Falkenberg, M., Larsson, N.-G. et Gustafsson, C. M. : The mitochondrial RNA polymerase contributes critically to promoter specificity in mammalian cells. *The EMBO journal*, 23:4606–4614, novembre 2004.
- Gibson, C. J. et Davids, M. S. : BCL-2 Antagonism to Target the Intrinsic Mitochondrial Pathway of Apoptosis. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 21:5021–5029, novembre 2015.
- Gilkerson, R. W., Schon, E. A., Hernandez, E. et Davidson, M. M. : Mitochondrial nucleoids maintain genetic autonomy but allow for functional complementation. *The Journal of cell biology*, 181:1117–1128, juin 2008.
- Goldar, S., Khaniani, M. S., Derakhshan, S. M. et Baradaran, B. : Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*, 16:2129–2144, 2015.
- Gossen, M. et Bujard, H. : Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracyclineresponsive promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89:5547–5551, juin 1992.
- Graziewicz, M. A., Longley, M. J., Bienstock, R. J., Zeviani, M. et Copeland, W. C. : Structurefunction defects of human mitochondrial DNA polymerase in autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia. *Nature structural & molecular biology*, 11(8):770, 2004.

- Green, D. R., Galluzzi, L. et Kroemer, G. : Mitochondria and the autophagy-inflammation-cell death axis in organismal aging. *Science (New York, N.Y.)*, 333:1109–1112, août 2011.
- Greene, A. W., Grenier, K., Aguileta, M. A., Muise, S., Farazifard, R., Haque, M. E., McBride, H. M., Park, D. S. et Fon, E. A. : Mitochondrial processing peptidase regulates PINK1 processing, import and Parkin recruitment. *EMBO reports*, 13:378–385, avril 2012.
- Grossman, L. I., Watson, R. et Vinograd, J. : The presence of ribonucleotides in mature closedcircular mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70:3339–3343, décembre 1973.
- Gu, J., Lu, H., Tsai, A. G., Schwarz, K. et Lieber, M. R. : Single-stranded DNA ligation and XLF-stimulated incompatible DNA end ligation by the XRCC4-DNA ligase IV complex : influence of terminal DNA sequence. *Nucleic acids research*, 35:5755–5762, 2007.
- Guliaeva, N. A., Kuznetsova, E. A. et Gaziev, A. I. : [Proteins associated with mitochondrial DNA protect it against the action of X-rays and hydrogen peroxide]. *Biofizika*, 51:692–697, 2006.
- Guo, J., Zheng, L., Liu, W., Wang, X., Wang, Z., Wang, Z., French, A. J., Kang, D., Chen, L., Thibodeau, S. N. et others : Frequent truncating mutation of TFAM induces mitochondrial DNA depletion and apoptotic resistance in microsatellite-unstable colorectal cancer. *Cancer research*, 71(8):2978–2987, 2011.
- Gyllensten, U., Wharton, D., Josefsson, A. et Wilson, A. C. : Paternal inheritance of mitochondrial DNA in mice. *Nature*, 352:255–257, juillet 1991.
- Hashiguchi, K., Stuart, J. A., de Souza-Pinto, N. C. et Bohr, V. A. : The C-terminal alphaO helix of human Ogg1 is essential for 8-oxoguanine DNA glycosylase activity : the mitochondrial beta-Ogg1 lacks this domain and does not have glycosylase activity. *Nucleic acids research*, 32:5596–5608, 2004.
- Hashiguchi, K. et Zhang-Akiyama, Q.-M. : Establishment of human cell lines lacking mitochondrial DNA. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 554:383–391, 2009.
- Hensen, F., Cansiz, S., Gerhold, J. M. et Spelbrink, J. N. : To be or not to be a nucleoid protein : a comparison of mass-spectrometry based approaches in the identification of potential mtDNA-nucleoid associated proteins. *Biochimie*, 100:219–226, mai 2014.
- Herrmann, J. M. et Neupert, W. : Protein transport into mitochondria. *Current opinion in microbiology*, 3:210–214, avril 2000.
- Holmes, J. B., Akman, G., Wood, S. R., Sakhuja, K., Cerritelli, S. M., Moss, C., Bowmaker, M. R., Jacobs, H. T., Crouch, R. J. et Holt, I. J. : Primer retention owing to the absence of RNase H1 is catastrophic for mitochondrial DNA replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112:9334–9339, juillet 2015.
- Holt, I. J., Harding, A. E. et Morgan-Hughes, J. A. : Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature*, 331:717–719, février 1988.
- Holt, I. J., Lorimer, H. E. et Jacobs, H. T. : Coupled leading- and lagging-strand synthesis of mammalian mitochondrial DNA. *Cell*, 100:515–524, mars 2000.

- Hosokawa, N., Hara, T., Kaizuka, T., Kishi, C., Takamura, A., Miura, Y., Iemura, S.-i., Natsume, T., Takehana, K., Yamada, N., Guan, J.-L., Oshiro, N. et Mizushima, N. : Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Molecular biology of the cell*, 20:1981–1991, avril 2009.
- Houten, B. V., Hunter, S. E. et Meyer, J. N. : Mitochondrial DNA damage induced autophagy cell death and disease. *Frontiers in Bioscience*, 21(1):42–54, 2016.
- Huang, K.-J., Ku, C.-C. et Lehman, I. R. : Endonuclease G : a role for the enzyme in recombination and cellular proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103 (24):8995–9000, 2006.
- Huot, J. L., Enkler, L., Megel, C., Karim, L., Laporte, D., Becker, H. D., Duchêne, A.-M., Sissler, M. et Maréchal-Drouard, L. : Idiosyncrasies in decoding mitochondrial genomes. *Biochimie*, 100:95–106, mai 2014.
- Iborra, F. J., Kimura, H. et Cook, P. R. : The functional organization of mitochondrial genomes in human cells. *BMC biology*, 2:9, mai 2004.
- Inbar, O., Liefshitz, B., Bitan, G. et Kupiec, M. : The relationship between homology length and crossing over during the repair of a broken chromosome. *The Journal of biological chemistry*, 275:30833–30838, octobre 2000.
- Ishak, L., Moretton, A., Garreau-Balandier, I., Lefebvre, M., Alziari, S., Lachaume, P., Morel, F., Farge, G., Vernet, P. et Dubessay, P. : DNA maintenance following bleomycin-induced strand breaks does not require poly (ADP-ribosyl) ation activation in Drosophila S2 cells. *DNA repair*, 48:8–16, 2016.
- Ishihara, T., Ban-Ishihara, R., Maeda, M., Matsunaga, Y., Ichimura, A., Kyogoku, S., Aoki, H., Katada, S., Nakada, K., Nomura, M. et others : Dynamics of mitochondrial DNA nucleoids regulated by mitochondrial fission is essential for maintenance of homogeneously active mitochondria during neonatal heart development. *Molecular and cellular biology*, 35 (1):211–223, 2015.
- Iyama, T. et Wilson, D. M. : DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. *DNA repair*, 12:620–636, août 2013.
- Jalade, P. : *Mesures et modelisation des effets radiobiologiques des ions legers sur des cellules tumorales humaines : application a l'hadrontherapie.* Thèse de doctorat, Physique Nucléaire Théorique, Université Claude Bernard Lyon I, 2005.
- Jariwala, N., Rajasekaran, D., Srivastava, J., Gredler, R., Akiel, M. A., Robertson, C. L., Emdad, L., Fisher, P. B. et Sarkar, D. : Role of the staphylococcal nuclease and tudor domain containing 1 in oncogenesis (review). *International journal of oncology*, 46:465–473, février 2015.
- Jasin, M. et Rothstein, R. : Repair of strand breaks by homologous recombination. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5:a012740, novembre 2013.
- Jazayeri, M., Andreyev, A., Will, Y., Ward, M., Anderson, C. M. et Clevenger, W. : Inducible Expression of a Dominant Negative DNA Polymerase- γ Depletes Mitochondrial DNA and Produces a ρ OPhenotype. *Journal of Biological Chemistry*, 278(11):9823–9830, 2003.

- Jemt, E., Farge, G., Bäckström, S., Holmlund, T., Gustafsson, C. M. et Falkenberg, M. : The mitochondrial DNA helicase TWINKLE can assemble on a closed circular template and support initiation of DNA synthesis. *Nucleic acids research*, 39:9238–9249, novembre 2011.
- Jonas, E. A., Porter, G. A., Beutner, G., Mnatsakanyan, N. et Alavian, K. N. : Cell death disguised : The mitochondrial permeability transition pore as the c-subunit of the F(1)F(O) ATP synthese. *Pharmacological research*, 99:382–392, septembre 2015.
- Jourdain, A. A., Boehm, E., Maundrell, K. et Martinou, J.-C. : Mitochondrial RNA granules : Compartmentalizing mitochondrial gene expression. *The Journal of cell biology*, 212:611–614, mars 2016.
- Kaguni, L. S. : DNA polymerase gamma, the mitochondrial replicase. *Annual review of bio-chemistry*, 73:293–320, 2004.
- Kakarougkas, A. et Jeggo, P. A. : DNA DSB repair pathway choice : an orchestrated handover mechanism. *The British journal of radiology*, 87:20130685, mars 2014.
- Kalinowska, M., Garncarz, W., Pietrowska, M., Garrard, W. et Widlak, P. : Regulation of the human apoptotic DNase/RNase endonuclease G : involvement of Hsp70 and ATP. *Apoptosis*, 10(4):821–830, 2005.
- Kang, D., Miyako, K., Kai, Y., Irie, T. et Takeshige, K. : In vivo determination of replication origins of human mitochondrial DNA by ligation-mediated polymerase chain reaction. *The Journal of biological chemistry*, 272:15275–15279, juin 1997.
- Kanki, T., Ohgaki, K., Gaspari, M., Gustafsson, C. M., Fukuoh, A., Sasaki, N., Hamasaki, N. et Kang, D. : Architectural Role of Mitochondrial Transcription Factor A in Maintenance of Human Mitochondrial DNA. *Molecular and Cellular Biology*, 24(22):9823–9834, oct 2004.
- Kazak, L., Reyes, A. et Holt, I. J. : Minimizing the damage : repair pathways keep mitochondrial DNA intact. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(10):659–671, sep 2012.
- Kim, I. et Lemasters, J. J. : Mitochondrial degradation by autophagy (mitophagy) in GFP-LC3 transgenic hepatocytes during nutrient deprivation. *AJP : Cell Physiology*, 300(2):C308–C317, nov 2010.
- Kim, Y. G., Cha, J. et Chandrasegaran, S. : Hybrid restriction enzymes : zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93:1156–1160, février 1996.
- Kong, Y., Trabucco, S. E. et Zhang, H. : Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and the mitochondria theory of aging. *Interdisciplinary topics in gerontology*, 39:86–107, 2014.
- Korhonen, J. A., Gaspari, M. et Falkenberg, M. : TWINKLE Has 5' -> 3' DNA helicase activity and is specifically stimulated by mitochondrial single-stranded DNA-binding protein. *The Journal of biological chemistry*, 278:48627–48632, décembre 2003.
- Korhonen, J. A., Pham, X. H., Pellegrini, M. et Falkenberg, M. : Reconstitution of a minimal mtDNA replisome in vitro. *The EMBO journal*, 23:2423–2429, juin 2004.

- Kornblum, C., Nicholls, T. J., Haack, T. B., Schöler, S., Peeva, V., Danhauser, K., Hallmann, K., Zsurka, G., Rorbach, J., Iuso, A. et others : Loss-of-function mutations in MGME1 impair mtDNA replication and cause multisystemic mitochondrial disease. *Nature genetics*, 45(2):214–219, 2013.
- Kowald, A. et Kirkwood, T. B. L. : Evolution of the mitochondrial fusion-fission cycle and its role in aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108:10237–10242, juin 2011.
- Krishnan, K. J., Reeve, A. K., Samuels, D. C., Chinnery, P. F., Blackwood, J. K., Taylor, R. W., Wanrooij, S., Spelbrink, J. N., Lightowlers, R. N. et Turnbull, D. M. : What causes mitochondrial DNA deletions in human cells ? *Nature Genetics*, 40(3):275–279, mar 2008.
- Krokan, H. E. et Bjørås, M. : Base excision repair. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5:a012583, avril 2013.
- Kukat, A., Kukat, C., Brocher, J., Schafer, I., Krohne, G., Trounce, I. A., Villani, G. et Seibel,
 P. : Generation of rho0 cells utilizing a mitochondrially targeted restriction endonuclease and comparative analyses. *Nucleic Acids Research*, 36(7):e44–e44, feb 2008.
- Kukat, C., Davies, K. M., Wurm, C. A., Spåhr, H., Bonekamp, N. A., Kühl, I., Joos, F., Polosa, P. L., Park, C. B., Posse, V., Falkenberg, M., Jakobs, S., Kühlbrandt, W. et Larsson, N.-G. : Cross-strand binding of TFAM to a single mtDNA molecule forms the mitochondrial nucleoid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112:11288–11293, septembre 2015.
- Kukat, C., Wurm, C. A., Spåhr, H., Falkenberg, M., Larsson, N.-G. et Jakobs, S. : Superresolution microscopy reveals that mammalian mitochondrial nucleoids have a uniform size and frequently contain a single copy of mtDNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108:13534–13539, août 2011.
- Kuo, L. J. et Yang, L.-X. : Gamma-H2AX a novel biomarker for DNA double-strand breaks. *In vivo (Athens, Greece)*, 22:305–309, 2008.
- Lai, Y., Chen, Y., Watkins, S. C., Nathaniel, P. D., Guo, F., Kochanek, P. M., Jenkins, L. W., Szabó, C. et Clark, R. S. B. : Identification of poly-ADP-ribosylated mitochondrial proteins after traumatic brain injury. *Journal of neurochemistry*, 104:1700–1711, mars 2008.
- Lakshmipathy, U. et Campbell, C. : The human DNA ligase III gene encodes nuclear and mitochondrial proteins. *Molecular and cellular biology*, 19:3869–3876, mai 1999.
- Lamarche, B. J., Orazio, N. I. et Weitzman, M. D. : The MRN complex in double-strand break repair and telomere maintenance. *FEBS letters*, 584:3682–3695, septembre 2010.
- Lane, A. N. et Fan, T. W.-M. : Regulation of mammalian nucleotide metabolism and biosynthesis. *Nucleic acids research*, 43:2466–2485, février 2015.
- Lapucci, A., Pittelli, M., Rapizzi, E., Felici, R., Moroni, F. et Chiarugi, A. : Poly(ADP-ribose) polymerase-1 is a nuclear epigenetic regulator of mitochondrial DNA repair and transcription. *Molecular pharmacology*, 79:932–940, juin 2011.
- Lee, S. R. et Han, J. : Mitochondrial Nucleoid : Shield and Switch of the Mitochondrial Genome. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2017:8060949, 2017.

- Lee, W., Johnson, J., Gough, D. J., Donoghue, J., Cagnone, G. L. M., Vaghjiani, V., Brown, K. A., Johns, T. G. et St John, J. C. : Mitochondrial DNA copy number is regulated by DNA methylation and demethylation of POLGA in stem and cancer cells and their differentiated progeny. *Cell death & disease*, 6:e1664, février 2015.
- Lentz, S. I., Edwards, J. L., Backus, C., McLean, L. L., Haines, K. M. et Feldman, E. L. : Mitochondrial DNA (mtDNA) biogenesis : visualization and duel incorporation of BrdU and EdU into newly synthesized mtDNA in vitro. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*, 58:207–218, février 2010.
- Liang, C., Ahmad, K. et Sue, C. M. : The broadening spectrum of mitochondrial disease : Shifts in the diagnostic paradigm. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) General Subjects*, 1840 (4):1360–1367, apr 2014.
- Lightowlers, R. N. et Chrzanowska-Lightowlers, Z. M. A. : PPR (pentatricopeptide repeat) proteins in mammals : important aids to mitochondrial gene expression. *The Biochemical journal*, 416:e5–e6, novembre 2008.
- Lightowlers, R. N., Taylor, R. W. et Turnbull, D. M. : Mutations causing mitochondrial disease : What is new and what challenges remain ? *Science (New York, N.Y.)*, 349:1494–1499, septembre 2015.
- Lin, J. L., Wu, C.-C., Yang, W.-Z. et Yuan, H. S. : Crystal structure of endonuclease G in complex with DNA reveals how it nonspecifically degrades DNA as a homodimer. *Nucleic Acids Research*, page gkw931, 2016.
- Liu, P., Qian, L., Sung, J.-S., de Souza-Pinto, N. C., Zheng, L., Bogenhagen, D. F., Bohr, V. A., Wilson, D. M., Shen, B. et Demple, B. : Removal of Oxidative DNA Damage via FEN1-Dependent Long-Patch Base Excision Repair in Human Cell Mitochondria. *Molecular and Cellular Biology*, 28(16):4975–4987, jun 2008.
- Long, A., Klimova, N. et Kristian, T. : Mitochondrial NUDIX hydrolases : A metabolic link between NAD catabolism, GTP and mitochondrial dynamics. *Neurochemistry international*, mars 2017.
- Longley, M. J., Humble, M. M., Sharief, F. S. et Copeland, W. C. : Disease variants of the human mitochondrial DNA helicase encoded by C10orf2 differentially alter protein stability, nucleotide hydrolysis, and helicase activity. *The Journal of biological chemistry*, 285:29690– 29702, septembre 2010.
- Lu, W., Chen, Z., Zhang, H., Wang, Y., Luo, Y. et Huang, P. : ZNF143 transcription factor mediates cell survival through upregulation of the GPX1 activity in the mitochondrial respiratory dysfunction. *Cell death & disease*, 3:e422, novembre 2012.
- Ma, S., Hockings, C., Anwari, K., Kratina, T., Fennell, S., Lazarou, M., Ryan, M. T., Kluck, R. M. et Dewson, G. : Assembly of the Bak apoptotic pore : a critical role for the Bak protein alpha6 helix in the multimerization of homodimers during apoptosis. *The Journal of biological chemistry*, 288:26027–26038, septembre 2013.
- Maccecchini, M. L., Rudin, Y., Blobel, G. et Schatz, G. : Import of proteins into mitochondria : precursor forms of the extramitochondrially made F1-ATPase subunits in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76:343–347, janvier 1979.

- Mahajan, K. N., Nick McElhinny, S. A., Mitchell, B. S. et Ramsden, D. A. : Association of DNA polymerase mu (pol mu) with Ku and ligase IV : role for pol mu in end-joining double-strand break repair. *Molecular and cellular biology*, 22:5194–5202, juillet 2002.
- Malena, A., Pantic, B., Borgia, D., Sgarbi, G., Solaini, G., Holt, I. J., Spinazzola, A., Perissinotto, E., Sandri, M., Baracca, A. et others : Mitochondrial quality control : Cell-type-dependent responses to pathological mutant mitochondrial DNA. *Autophagy*, 12(11):2098–2112, 2016.
- Mallo, M., Kanzler, B. et Ohnemus, S. : Reversible gene inactivation in the mouse. *Genomics*, 81(4):356–360, 2003.
- Mandel, H., Szargel, R., Labay, V., Elpeleg, O., Saada, A., Shalata, A., Anbinder, Y., Berkowitz, D., Hartman, C., Barak, M., Eriksson, S. et Cohen, N. : The deoxyguanosine kinase gene is mutated in individuals with depleted hepatocerebral mitochondrial DNA. *Nature genetics*, 29:337–341, novembre 2001.
- Mannella, C. A. : Structure and dynamics of the mitochondrial inner membrane cristae. *Biochimica et biophysica acta*, 1763:542–548, 2006.
- Martínez-Lostao, L., Anel, A. et Pardo, J. : How Do Cytotoxic Lymphocytes Kill Cancer Cells? *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 21:5047–5056, novembre 2015.
- Mason, P. A., Matheson, E. C., Hall, A. G. et Lightowlers, R. N. : Mismatch repair activity in mammalian mitochondria. *Nucleic acids research*, 31:1052–1058, février 2003.
- McCormick, E., Place, E. et Falk, M. J. : Molecular genetic testing for mitochondrial disease : from one generation to the next. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 10:251–261, avril 2013.
- McEachern, L. A. et Murphy, P. R. : Chromatin-remodeling factors mediate the balance of sense-antisense transcription at the FGF2 locus. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 28:477–489, avril 2014.
- McKinney, E. A. et Oliveira, M. T. : Replicating animal mitochondrial DNA. *Genetics and molecular biology*, 36:308–315, septembre 2013.
- McVey, M., Khodaverdian, V. Y., Meyer, D., Cerqueira, P. G. et Heyer, W.-D. : Eukaryotic DNA Polymerases in Homologous Recombination. *Annual review of genetics*, 50:393–421, novembre 2016.
- Melis, J. P. M., van Steeg, H. et Luijten, M. : Oxidative DNA damage and nucleotide excision repair. *Antioxidants & redox signaling*, 18:2409–2419, juin 2013.
- Meyer-Ficca, M. L., Meyer, R. G., Kaiser, H., Brack, A. R., Kandolf, R. et Küpper, J.-H. : Comparative analysis of inducible expression systems in transient transfection studies. *Analytical biochemistry*, 334(1):9–19, 2004.
- Mildvan, A. S., Xia, Z., Azurmendi, H. F., Saraswat, V., Legler, P. M., Massiah, M. A., Gabelli, S. B., Bianchet, M. A., Kang, L.-W. et Amzel, L. M. : Structures and mechanisms of Nudix hydrolases. *Archives of biochemistry and biophysics*, 433:129–143, janvier 2005.

- Minczuk, M., He, J., Duch, A. M., Ettema, T. J., Chlebowski, A., Dzionek, K., Nijtmans, L. G. J., Huynen, M. A. et Holt, I. J. : TEFM (c17orf42) is necessary for transcription of human mtDNA. *Nucleic acids research*, 39:4284–4299, mai 2011.
- Mohamed Yusoff, A. A. : Role of mitochondrial DNA mutations in brain tumors : A minireview. *Journal of cancer research and therapeutics*, 11:535–544, 2015.
- Monastyrska, I., Rieter, E., Klionsky, D. J. et Reggiori, F. : Multiple roles of the cytoskeleton in autophagy. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 84:431–448, août 2009.
- Morel, F., Renoux, M., Lachaume, P. et Alziari, S. : Bleomycin-induced double-strand breaks in mitochondrial DNA of Drosophila cells are repaired. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 637(1-2):111–117, jan 2008.
- Morley, S. A. et Nielsen, B. L. : Plant mitochondrial DNA. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*, 22:1023–1032, janvier 2017.
- Muftuoglu, M., Mori, M. P. et de Souza-Pinto, N. C. : Formation and repair of oxidative damage in the mitochondrial DNA. *Mitochondrion*, 17:164–181, jul 2014.
- Myers, K. A., Saffhill, R. et O'Connor, P. J. : Repair of alkylated purines in the hepatic DNA of mitochondria and nuclei in the rat. *Carcinogenesis*, 9:285–292, février 1988.
- Nakabeppu, Y., Kajitani, K., Sakamoto, K., Yamaguchi, H. et Tsuchimoto, D. : MTH1, an oxidized purine nucleoside triphosphatase, prevents the cytotoxicity and neurotoxicity of oxidized purine nucleotides. *DNA repair*, 5:761–772, juillet 2006.
- Narendra, D., Tanaka, A., Suen, D.-F. et Youle, R. J. : Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *The Journal of cell biology*, 183(5):795–803, 2008.
- Ngo, H. B., Kaiser, J. T. et Chan, D. C. : The mitochondrial transcription and packaging factor Tfam imposes a U-turn on mitochondrial DNA. *Nature structural & molecular biology*, 18:1290–1296, octobre 2011.
- Nicholls, T. J., Zsurka, G., Peeva, V., Scholer, S., Szczesny, R. J., Cysewski, D., Reyes, A., Kornblum, C., Sciacco, M., Moggio, M., Dziembowski, A., Kunz, W. S. et Minczuk, M. : Linear mtDNA fragments and unusual mtDNA rearrangements associated with pathological deficiency of MGME1 exonuclease. *Human Molecular Genetics*, 23(23):6147–6162, jun 2014.
- Nicholls, T. J. et Minczuk, M. : In D-loop : 40years of mitochondrial 7S DNA. *Experimental Gerontology*, 56:175–181, aug 2014.
- Nishioka, K., Ohtsubo, T., Oda, H., Fujiwara, T., Kang, D., Sugimachi, K. et Nakabeppu, Y. : Expression and differential intracellular localization of two major forms of human 8oxoguanine DNA glycosylase encoded by alternatively spliced OGG1 mRNAs. *Molecular biology of the cell*, 10:1637–1652, mai 1999.
- Nordlund, P. et Reichard, P. : Ribonucleotide reductases. *Annual review of biochemistry*, 75: 681–706, 2006.

- Ofman, R., Speijer, D., Leen, R. et Wanders, R. J. A. : Proteomic analysis of mouse kidney peroxisomes : identification of RP2p as a peroxisomal nudix hydrolase with acyl-CoA diphosphatase activity. *The Biochemical journal*, 393:537–543, janvier 2006.
- Ojala, D., Montoya, J. et Attardi, G. : tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria. *Nature*, 290:470–474, avril 1981.
- Ostergaard, E., Christensen, E., Kristensen, E., Mogensen, B., Duno, M., Shoubridge, E. A. et Wibrand, F. : Deficiency of the alpha subunit of succinate-coenzyme A ligase causes fatal infantile lactic acidosis with mitochondrial DNA depletion. *American journal of human genetics*, 81:383–387, août 2007.
- Otera, H., Ishihara, N. et Mihara, K. : New insights into the function and regulation of mitochondrial fission. *Biochimica et biophysica acta*, 1833:1256–1268, mai 2013.
- Papa, S., Martino, P. L., Capitanio, G., Gaballo, A., De Rasmo, D., Signorile, A. et Petruzzella, V. : The oxidative phosphorylation system in mammalian mitochondria. *Advances in experimental medicine and biology*, 942:3–37, 2012.
- Parikh, S., Goldstein, A., Koenig, M. K., Scaglia, F., Enns, G. M., Saneto, R., Anselm, I., Cohen, B. H., Falk, M. J., Greene, C., Gropman, A. L., Haas, R., Hirano, M., Morgan, P., Sims, K., Tarnopolsky, M., Van Hove, J. L. K., Wolfe, L. et DiMauro, S. : Diagnosis and management of mitochondrial disease : a consensus statement from the Mitochondrial Medicine Society. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*, 17:689– 701, septembre 2015.
- Parzych, K. R. et Klionsky, D. J. : An overview of autophagy : morphology, mechanism, and regulation. *Antioxidants & redox signaling*, 20:460–473, janvier 2014.
- Pennanen, C., Parra, V., López-Crisosto, C., Morales, P. E., Del Campo, A., Gutierrez, T., Rivera-Mejías, P., Kuzmicic, J., Chiong, M., Zorzano, A., Rothermel, B. A. et Lavandero, S. : Mitochondrial fission is required for cardiomyocyte hypertrophy mediated by a Ca2+-calcineurin signaling pathway. *Journal of cell science*, 127:2659–2671, juin 2014.
- Pham, D. H., Moretti, P. A., Goodall, G. J. et Pitson, S. M. : Attenuation of leakiness in doxycycline-inducible expression via incorporation of 3'AU-rich mRNA destabilizing elements. *BioTechniques*, 45(2):155–164, 2008.
- Phillips, A. F., Millet, A. R., Tigano, M., Dubois, S. M., Crimmins, H., Babin, L., Charpentier, M., Piganeau, M., Brunet, E. et Sfeir, A. : Single-Molecule Analysis of mtDNA Replication Uncovers the Basis of the Common Deletion. *Molecular Cell*, 65(3):527–538, 2017.
- Posse, V. et Gustafsson, C. M. : Human mitochondrial transcription factor B2 is required for promoter melting during initiation of transcription. *Journal of Biological Chemistry*, 292 (7):2637–2645, 2017.
- Prakash, A. et Doublié, S. : Base Excision Repair in the Mitochondria. *Journal of cellular biochemistry*, 116:1490–1499, août 2015.
- Prakash, R., Zhang, Y., Feng, W. et Jasin, M. : Homologous recombination and human health : the roles of BRCA1, BRCA2, and associated proteins. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 7:a016600, avril 2015.

- Pursell, Z. F., McDonald, J. T., Mathews, C. K. et Kunkel, T. A. : Trace amounts of 8-oxo-dGTP in mitochondrial dNTP pools reduce DNA polymerase gamma replication fidelity. *Nucleic acids research*, 36:2174–2181, avril 2008.
- Quirós, P. M., Mottis, A. et Auwerx, J. : Mitonuclear communication in homeostasis and stress. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 17:213–226, avril 2016.
- Rahman, S., Poulton, J., Marchington, D. et Suomalainen, A. : Decrease of 3243 A->G mtDNA mutation from blood in MELAS syndrome : a longitudinal study. *American journal of human genetics*, 68:238–240, janvier 2001.
- Ramirez, C. L., Foley, J. E., Wright, D. A., Müller-Lerch, F., Rahman, S. H., Cornu, T. I., Winfrey, R. J., Sander, J. D., Fu, F., Townsend, J. A., Cathomen, T., Voytas, D. F. et Joung, J. K. : Unexpected failure rates for modular assembly of engineered zinc fingers. *Nature methods*, 5:374–375, mai 2008.
- Rasmussen, A. K. et Rasmussen, L. J. : Targeting of O6-MeG DNA methyltransferase (MGMT) to mitochondria protects against alkylation induced cell death. *Mitochondrion*, 5:411–417, décembre 2005.
- Reyes, A., Kazak, L., Wood, S. R., Yasukawa, T., Jacobs, H. T. et Holt, I. J. : Mitochondrial DNA replication proceeds via a 'bootlace' mechanism involving the incorporation of processed transcripts. *Nucleic acids research*, 41:5837–5850, juin 2013.
- Reyes, A., Melchionda, L., Nasca, A., Carrara, F., Lamantea, E., Zanolini, A., Lamperti, C., Fang, M., Zhang, J., Ronchi, D. et others : RNASEH1 mutations impair mtDNA replication and cause adult-onset mitochondrial encephalomyopathy. *The American Journal of Human Genetics*, 97(1):186–193, 2015.
- Rikka, S., Quinsay, M. N., Thomas, R. L., Kubli, D. A., Zhang, X., Murphy, A. N. et Gustafsson,
 B.: Bnip3 impairs mitochondrial bioenergetics and stimulates mitochondrial turnover. *Cell death and differentiation*, 18:721–731, avril 2011.
- Ronchi, D., Di Fonzo, A., Lin, W., Bordoni, A., Liu, C., Fassone, E., Pagliarani, S., Rizzuti, M., Zheng, L., Filosto, M. et others : Mutations in DNA2 link progressive myopathy to mitochondrial DNA instability. *The American Journal of Human Genetics*, 92(2):293–300, 2013.
- Rudd, S. G., Valerie, N. C. K. et Helleday, T. : Pathways controlling dNTP pools to maintain genome stability. *DNA repair*, 44:193–204, août 2016.
- Ruhanen, H., Borrie, S., Szabadkai, G., Tyynismaa, H., Jones, A. W. E., Kang, D., Taanman, J.-W. et Yasukawa, T. : Mitochondrial single-stranded DNA binding protein is required for maintenance of mitochondrial DNA and 7S DNA but is not required for mitochondrial nucleoid organisation. *Biochimica et biophysica acta*, 1803:931–939, août 2010.
- Russell, O. et Turnbull, D. : Mitochondrial DNA disease-molecular insights and potential routes to a cure. *Experimental cell research*, 325:38–43, juillet 2014.
- Saada, A., Shaag, A., Mandel, H., Nevo, Y., Eriksson, S. et Elpeleg, O. : Mutant mitochondrial thymidine kinase in mitochondrial DNA depletion myopathy. *Nature genetics*, 29:342–344, novembre 2001.

- Sagan-Margulis, L.: On the origin of mitosing cells. *Journal of Theoretical Biology*, 14(3):225–IN6, mar 1967.
- Sage, J. M., Gildemeister, O. S. et Knight, K. L. : Discovery of a novel function for human Rad51 : maintenance of the mitochondrial genome. *The Journal of biological chemistry*, 285:18984–18990, juin 2010.
- Sato, M. et Sato, K. : Maternal inheritance of mitochondrial DNA by diverse mechanisms to eliminate paternal mitochondrial DNA. *Biochimica et biophysica acta*, 1833:1979–1984, août 2013.
- Satoh, M. S., Huh, N., Rajewsky, M. F. et Kuroki, T. : Enzymatic removal of O6-ethylguanine from mitochondrial DNA in rat tissues exposed to N-ethyl-N-nitrosourea in vivo. *The Journal of biological chemistry*, 263:6854–6856, mai 1988.
- Scarpulla, R. C. : Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function. *Physiological reviews*, 88:611–638, avril 2008.
- Schapira, A. H. V. : Mitochondrial disease. Lancet (London, England), 368:70-82, juillet 2006.
- Schirris, T. J. J., Ritschel, T., Herma Renkema, G., Willems, P. H. G. M., Smeitink, J. A. M. et Russel, F. G. M. : Mitochondrial ADP/ATP exchange inhibition : a novel off-target mechanism underlying ibipinabant-induced myotoxicity. *Scientific reports*, 5:14533, septembre 2015.
- Schweers, R. L., Zhang, J., Randall, M. S., Loyd, M. R., Li, W., Dorsey, F. C., Kundu, M., Opferman, J. T., Cleveland, J. L., Miller, J. L. et Ney, P. A. : NIX is required for programmed mitochondrial clearance during reticulocyte maturation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104:19500–19505, décembre 2007.
- Sfeir, A. et Symington, L. S. : Microhomology-Mediated End Joining : A Back-up Survival Mechanism or Dedicated Pathway? *Trends in biochemical sciences*, 40:701–714, novembre 2015.
- Shi, Y., Dierckx, A., Wanrooij, P. H., Wanrooij, S., Larsson, N.-G., Wilhelmsson, L. M., Falkenberg, M. et Gustafsson, C. M. : Mammalian transcription factor A is a core component of the mitochondrial transcription machinery. *Proceedings of the National Academy of Sciences* of the United States of America, 109:16510–16515, octobre 2012.
- Shokolenko, I., Venediktova, N., Bochkareva, A., Wilson, G. L. et Alexeyev, M. F. : Oxidative stress induces degradation of mitochondrial DNA. *Nucleic acids research*, 37(8):2539–2548, 2009.
- Shokolenko, I. N., Wilson, G. L. et Alexeyev, M. F. : Persistent damage induces mitochondrial DNA degradation. *DNA Repair*, 12(7):488–499, jul 2013.
- Shokolenko, I. N., Wilson, G. L. et Alexeyev, M. F. : The "fast" and the "slow" modes of mitochondrial DNA degradation. *Mitochondrial DNA*, 27(1):490–498, apr 2014.
- Shutt, T. E. et Gray, M. W. : Twinkle, the mitochondrial replicative DNA helicase, is widespread in the eukaryotic radiation and may also be the mitochondrial DNA primase in most eukaryotes. *Journal of molecular evolution*, 62:588–599, mai 2006.

- Siemen, D. et Ziemer, M. : What is the nature of the mitochondrial permeability transition pore and what is it not? *IUBMB life*, 65:255–262, mars 2013.
- Siibak, T., Clemente, P., Bratic, A., Bruhn, H., Kauppila, T. E., Macao, B., Schober, F. A., Lesko, N., Wibom, R., Naess, K. et others : A multi-systemic mitochondrial disorder due to a dominant p. Y955H disease variant in DNA polymerase gamma. *Human Molecular Genetics*, 26(13):2515–2525, 2017.
- Sobek, S. et Boege, F. : DNA topoisomerases in mtDNA maintenance and ageing. *Experimental* gerontology, 56:135–141, août 2014.
- Song, M.-G., Bail, S. et Kiledjian, M. : Multiple Nudix family proteins possess mRNA decapping activity. *RNA (New York, N.Y.)*, 19:390–399, mars 2013.
- Spelbrink, J. N., Li, F. Y., Tiranti, V., Nikali, K., Yuan, Q. P., Tariq, M., Wanrooij, S., Garrido, N., Comi, G., Morandi, L., Santoro, L., Toscano, A., Fabrizi, G. M., Somer, H., Croxen, R., Beeson, D., Poulton, J., Suomalainen, A., Jacobs, H. T., Zeviani, M. et Larsson, C. : Human mitochondrial DNA deletions associated with mutations in the gene encoding Twinkle, a phage T7 gene 4-like protein localized in mitochondria. *Nature genetics*, 28:223–231, juillet 2001.
- Spelbrink, J. N., Toivonen, J. M., Hakkaart, G. A., Kurkela, J. M., Cooper, H. M., Lehtinen, S. K., Lecrenier, N., Back, J. W., Speijer, D., Foury, F. et Jacobs, H. T. : In vivo functional analysis of the human mitochondrial DNA polymerase POLG expressed in cultured human cells. *The Journal of biological chemistry*, 275:24818–24828, août 2000.
- Srivastava, S. : Double-strand breaks of mouse muscle mtDNA promote large deletions similar to multiple mtDNA deletions in humans. *Human Molecular Genetics*, 14(7):893–902, feb 2005.
- Srivastava, S. et Moraes, C. T. : Manipulating mitochondrial DNA heteroplasmy by a mitochondrially targeted restriction endonuclease. *Human Molecular Genetics*, 10(26):3093–3099, dec 2001.
- Stein, A., Kalifa, L. et Sia, E. A. : Members of the RAD52 Epistasis Group Contribute to Mitochondrial Homologous Recombination and Double-Strand Break Repair in Saccharomyces cerevisiae. *PLoS Genet*, 11(11):e1005664, nov 2015.
- Stewart, J. B. et Larsson, N.-G. : Keeping mtDNA in shape between generations. *PLoS genetics*, 10:e1004670, octobre 2014.
- Stiles, A. R., Simon, M. T., Stover, A., Eftekharian, S., Khanlou, N., Wang, H. L., Magaki, S., Lee, H., Partynski, K., Dorrani, N. et others : Mutations in TFAM, encoding mitochondrial transcription factor A, cause neonatal liver failure associated with mtDNA depletion. *Molecular genetics and metabolism*, 119(1):91–99, 2016.
- Stumpf, J. D., Saneto, R. P. et Copeland, W. C. : Clinical and molecular features of POLGrelated mitochondrial disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(4):a011395, 2013.
- Suen, D.-F., Narendra, D. P., Tanaka, A., Manfredi, G. et Youle, R. J. : Parkin overexpression selects against a deleterious mtDNA mutation in heteroplasmic cybrid cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(26):11835–11840, 2010.

- Sykora, P., Croteau, D. L., Bohr, V. A. et Wilson, D. M. : Aprataxin localizes to mitochondria and preserves mitochondrial function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108:7437–7442, mai 2011.
- Sykora, P., Wilson, D. M. et Bohr, V. A. : Repair of persistent strand breaks in the mitochondrial genome. *Mechanisms of ageing and development*, 133:169–175, avril 2012.
- Szczesny, B., Brunyanszki, A., Olah, G., Mitra, S. et Szabo, C. : Opposing roles of mitochondrial and nuclear PARP1 in the regulation of mitochondrial and nuclear DNA integrity : implications for the regulation of mitochondrial function. *Nucleic acids research*, 42:13161– 13173, décembre 2014.
- Szczesny, R. J., Hejnowicz, M. S., Steczkiewicz, K., Muszewska, A., Borowski, L. S., Ginalski, K. et Dziembowski, A. : Identification of a novel human mitochondrial endo-/exonuclease Ddk1/c20orf72 necessary for maintenance of proper 7S DNA levels. *Nucleic Acids Research*, 41(5):3144–3161, jan 2013.
- Szostak, J. W., Orr-Weaver, T. L., Rothstein, R. J. et Stahl, F. W. : The double-strand-break repair model for recombination. *Cell*, 33:25–35, mai 1983.
- Tadi, S. K., Sebastian, R., Dahal, S., Babu, R. K., Choudhary, B. et Raghavan, S. C. : Microhomology-mediated end joining is the principal mediator of double-strand break repair during mitochondrial DNA lesions. *Molecular Biology of the Cell*, 27(2):223–235, nov 2015.
- Takahashi, M., Teranishi, M., Ishida, H., Kawasaki, J., Takeuchi, A., Yamaya, T., Watanabe, M., Makino, A. et Hidema, J. : Cyclobutane pyrimidine dimer (CPD) photolyase repairs ultraviolet-B-induced CPDs in rice chloroplast and mitochondrial DNA. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 66:433–442, mai 2011.
- Tanaka, M., Borgeld, H.-J., Zhang, J., Muramatsu, S.-i., Gong, J.-S., Yoneda, M., Maruyama, W., Naoi, M., Ibi, T., Sahashi, K. et others : Gene therapy for mitochondrial disease by delivering restriction endonucleaseSmaI into mitochondria. *Journal of biomedical science*, 9 (6):534–541, 2002.
- Tanida, I., Ueno, T. et Kominami, E. : LC3 and Autophagy. *Methods in molecular biology* (*Clifton, N.J.*), 445:77–88, 2008.
- Tann, A. W., Boldogh, I., Meiss, G., Qian, W., Houten, B. V., Mitra, S. et Szczesny, B. : Apoptosis Induced by Persistent Single-strand Breaks in Mitochondrial Genome : Critical Role of EXOG (5'-exo/endonuclease) in their repair. *Journal of Biological Chemistry*, 286 (37):31975–31983, jul 2011.
- Tauber, J., Dlasková, A., Šantorová, J., Smolková, K., Alán, L., Špaček, T., Plecitá-Hlavatá, L., Jabůrek, M. et Ježek, P. : Distribution of mitochondrial nucleoids upon mitochondrial network fragmentation and network reintegration in HEPG2 cells. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 45:593–603, mars 2013.
- Thorslund, T., Sunesen, M., Bohr, V. A. et Stevnsner, T. : Repair of 8-oxoG is slower in endogenous nuclear genes than in mitochondrial DNA and is without strand bias. *DNA repair*, 1:261–273, avril 2002.
- Tonin, Y. et Entelis, N. : [Mitochondrial DNA diseases and therapeutic strategies]. *Medecine sciences* : *M/S*, 30:1101–1109, décembre 2014.
- Torroni, A., Huoponen, K., Francalacci, P., Petrozzi, M., Morelli, L., Scozzari, R., Obinu, D., Savontaus, M. L. et Wallace, D. C. : Classification of European mtDNAs from an analysis of three European populations. *Genetics*, 144:1835–1850, décembre 1996.
- Trifunovic, A., Wredenberg, A., Falkenberg, M., Spelbrink, J. N., Rovio, A. T., Bruder, C. E., Bohlooly-Y, M., Gidlöf, S., Oldfors, A., Wibom, R., Törnell, J., Jacobs, H. T. et Larsson, N.-G. : Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature*, 429:417–423, mai 2004.
- Twig, G., Elorza, A., Molina, A. J. A., Mohamed, H., Wikstrom, J. D., Walzer, G., Stiles, L., Haigh, S. E., Katz, S., Las, G., Alroy, J., Wu, M., Py, B. F., Yuan, J., Deeney, J. T., Corkey, B. E. et Shirihai, O. S. : Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *The EMBO journal*, 27:433–446, janvier 2008.
- Uhler, J. P. et Falkenberg, M. : Primer removal during mammalian mitochondrial DNA replication. *DNA Repair*, 34:28–38, oct 2015.
- van der Bliek, A. M., Shen, Q. et Kawajiri, S. : Mechanisms of mitochondrial fission and fusion. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(6):a011072, 2013.
- Van Goethem, G., Dermaut, B., Löfgren, A., Martin, J. J. et Van Broeckhoven, C. : Mutation of POLG is associated with progressive external ophthalmoplegia characterized by mtDNA deletions. *Nature genetics*, 28:211–212, juillet 2001.
- Vermulst, M., Wanagat, J., Kujoth, G. C., Bielas, J. H., Rabinovitch, P. S., Prolla, T. A. et Loeb, L. A. : DNA deletions and clonal mutations drive premature aging in mitochondrial mutator mice. *Nature genetics*, 40(4):392–394, 2008.
- von Heijne, G. : Why mitochondria need a genome. FEBS letters, 198:1-4, mars 1986.
- Walker, J. R., Corpina, R. A. et Goldberg, J. : Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature*, 412:607–614, août 2001.
- Walter, M. C., Czermin, B., Muller-Ziermann, S., Bulst, S., Stewart, J. D., Hudson, G., Schneiderat, P., Abicht, A., Holinski-Feder, E., Lochmüller, H., Chinnery, P. F., Klopstock, T. et Horvath, R. : Late-onset ptosis and myopathy in a patient with a heterozygous insertion in POLG2. *Journal of neurology*, 257:1517–1523, septembre 2010.
- Wang, H., Perrault, A. R., Takeda, Y., Qin, W., Wang, H. et Iliakis, G. : Biochemical evidence for Ku-independent backup pathways of NHEJ. *Nucleic acids research*, 31:5377–5388, septembre 2003.
- Wang, L. : Mitochondrial purine and pyrimidine metabolism and beyond. Nucleosides, nucleotides & nucleic acids, 35:578–594, décembre 2016.
- Wanrooij, P. H., Uhler, J. P., Shi, Y., Westerlund, F., Falkenberg, M. et Gustafsson, C. M. : A hybrid G-quadruplex structure formed between RNA and DNA explains the extraordinary stability of the mitochondrial R-loop. *Nucleic acids research*, 40:10334–10344, novembre 2012a.

- Wanrooij, S. et Falkenberg, M. : The human mitochondrial replication fork in health and disease. *Biochimica et biophysica acta*, 1797:1378–1388, août 2010.
- Wanrooij, S., Miralles Fusté, J., Stewart, J. B., Wanrooij, P. H., Samuelsson, T., Larsson, N.-G., Gustafsson, C. M. et Falkenberg, M. : In vivo mutagenesis reveals that OriL is essential for mitochondrial DNA replication. *EMBO reports*, 13:1130–1137, décembre 2012b.
- Wei, H., Liu, L. et Chen, Q. : Selective removal of mitochondria via mitophagy : distinct pathways for different mitochondrial stresses. *Biochimica et biophysica acta*, 1853:2784–2790, octobre 2015.
- Westermann, B. : Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nature reviews*. *Molecular cell biology*, 11:872–884, décembre 2010.
- Westphal, D., Kluck, R. M. et Dewson, G. : Building blocks of the apoptotic pore : how Bax and Bak are activated and oligomerize during apoptosis. *Cell death and differentiation*, 21:196–205, février 2014.
- Widłak, P. : The DFF40/CAD endonuclease and its role in apoptosis. *Acta biochimica Polonica*, 47:1037–1044, 2000.
- Williams, J. S., Lujan, S. A. et Kunkel, T. A. : Processing ribonucleotides incorporated during eukaryotic DNA replication. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 17:350–363, juin 2016.
- Wisnovsky, S., Jean, S. R. et Kelley, S. O. : Mitochondrial DNA repair and replication proteins revealed by targeted chemical probes. *Nature Chemical Biology*, 12(7):567–573, may 2016.
- Wong, Y. C. et Holzbaur, E. L. F. : Optineurin is an autophagy receptor for damaged mitochondria in parkin-mediated mitophagy that is disrupted by an ALS-linked mutation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111:E4439–E4448, octobre 2014.
- Wright, W. D. et Heyer, W.-D. : Rad54 functions as a heteroduplex DNA pump modulated by its DNA substrates and Rad51 during D loop formation. *Molecular cell*, 53:420–432, février 2014.
- Yakubovskaya, E., Chen, Z., Carrodeguas, J. A., Kisker, C. et Bogenhagen, D. F. : Functional human mitochondrial DNA polymerase gamma forms a heterotrimer. *The Journal of biological chemistry*, 281:374–382, janvier 2006.
- Yaneva, M., Kowalewski, T. et Lieber, M. R. : Interaction of DNA-dependent protein kinase with DNA and with Ku : biochemical and atomic-force microscopy studies. *The EMBO journal*, 16:5098–5112, août 1997.
- Yang, C., Curth, U., Urbanke, C. et Kang, C. : Crystal structure of human mitochondrial singlestranded DNA binding protein at 2.4 A resolution. *Nature structural biology*, 4:153–157, février 1997.
- Yang, F., Teves, S. S., Kemp, C. J. et Henikoff, S. : Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics. *Biochimica et biophysica acta*, 1845:84–89, janvier 2014.
- Yasui, A., Yajima, H., Kobayashi, T., Eker, A. P. et Oikawa, A. : Mitochondrial DNA repair by photolyase. *Mutation research*, 273:231–236, mars 1992.

- Yasukawa, T., Reyes, A., Cluett, T. J., Yang, M.-Y., Bowmaker, M., Jacobs, H. T. et Holt, I. J. : Replication of vertebrate mitochondrial DNA entails transient ribonucleotide incorporation throughout the lagging strand. *The EMBO journal*, 25:5358–5371, novembre 2006.
- Ye, F., Samuels, D. C., Clark, T. et Guo, Y. : High-throughput sequencing in mitochondrial DNA research. *Mitochondrion*, 17:157–163, juillet 2014.
- Yeung, M., Hurren, R., Nemr, C., Wang, X., Hershenfeld, S., Gronda, M., Liyanage, S., Wu, Y., Augustine, J., Lee, E. A., Spagnuolo, P. A., Southall, N., Chen, C., Zheng, W., Jeyaraju, D. V., Minden, M. D., Laposa, R. et Schimmer, A. D. : Mitochondrial DNA damage by bleomycin induces AML cell death. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*, 20:811–820, juin 2015.
- Ylikallio, E. et Suomalainen, A. : Mechanisms of mitochondrial diseases. *Annals of medicine*, 44:41–59, février 2012.
- Youle, R. J. et Van Der Bliek, A. M. : Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science*, 337 (6098):1062–1065, 2012.
- Zhang, F., Cong, L., Lodato, S., Kosuri, S., Church, G. M. et Arlotta, P. : Efficient construction of sequence-specific TAL effectors for modulating mammalian transcription. *Nature biotechnology*, 29:149–153, février 2011.
- Zhdanov, D. D., Fahmi, T., Wang, X., Apostolov, E. O., Sokolov, N. N., Javadov, S. et Basnakian, A. G. : Regulation of Apoptotic Endonucleases by EndoG. *DNA and Cell Biology*, 34 (5):316–326, may 2015.
- Zheng, L., Zhou, M., Guo, Z., Lu, H., Qian, L., Dai, H., Qiu, J., Yakubovskaya, E., Bogenhagen, D. F., Demple, B. et Shen, B. : Human DNA2 Is a Mitochondrial Nuclease/Helicase for Efficient Processing of DNA Replication and Repair Intermediates. *Molecular Cell*, 32(3): 325–336, nov 2008.
- Zhou, X., Li, N., Wang, Y., Wang, Y., Zhang, X. et Zhang, H. : Effects of X-irradiation on mitochondrial DNA damage and its supercoiling formation change. *Mitochondrion*, 11:886– 892, novembre 2011.
- Zhu, Z., Ma, B., Homer, R. J., Zheng, T. et Elias, J. A. : Use of the tetracycline-controlled transcriptional silencer (tTS) to eliminate transgene leak in inducible overexpression transgenic mice. *Journal of Biological Chemistry*, 276(27):25222–25229, 2001.
- Ziebarth, T. D., Gonzalez-Soltero, R., Makowska-Grzyska, M. M., Núñez-Ramírez, R., Carazo, J.-M. et Kaguni, L. S. : Dynamic effects of cofactors and DNA on the oligomeric state of human mitochondrial DNA helicase. *The Journal of biological chemistry*, 285:14639–14647, mai 2010.