



HAL
open science

Exploitation des voies d'adressage mitochondrial d'ARN à des fins thérapeutiques

Romuald Loutre

► **To cite this version:**

Romuald Loutre. Exploitation des voies d'adressage mitochondrial d'ARN à des fins thérapeutiques. Médecine humaine et pathologie. Université de Strasbourg, 2017. Français. NNT : 2017STRAJ107 . tel-03851768

HAL Id: tel-03851768

<https://theses.hal.science/tel-03851768>

Submitted on 14 Nov 2022

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.

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

UMR7156 Génétique Moléculaire Génomique Microbiologie

THÈSE

Présentée par :

Romuald LOUTRE

Soutenue le : **11 décembre 2017**

Pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**

Discipline / Spécialité : **Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie**

**Exploitation des voies d'adressage mitochondrial
d'ARN à des fins thérapeutiques**

THÈSE dirigée par :

Mme. ENTELIS Nina

Docteur, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Mme. LOMBES Anne

Docteur, Institut Cochin, Paris

M. MIREAU Hakim

Docteur, Institut Jean-Pierre Bourgin, Versailles

AUTRES MEMBRES DU JURY :

M. DIETRICH André

Docteur, Université de Strasbourg

Remerciements

Avant toute chose, je tiens à remercier ici les membres de mon jury, les docteurs Anne Lombes, Hakim Mireau et André Dietrich, qui ont très gentiment accepté d'évaluer mes travaux de thèse résumés dans ce manuscrit.

Je souhaite ensuite remercier toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à faire de ces quatre dernières années, plus qu'un simple travail de recherche. Ce doctorat a été une véritable leçon de vie pour moi et il a révélé des aspects de ma personnalité que je ne connaissais pas moi-même. Quoiqu'il arrive, ces années auront été cruciales pour faire de moi ce que je suis aujourd'hui et ce que je serai dans les années à venir. Pour tout cela, je vous dis : Merci.

Merci tout d'abord à l'ensemble de l'équipe « Trafic intracellulaire d'ARN et maladies mitochondriales ».

Merci à Vania d'avoir cru en moi et en mon potentiel, et de m'avoir accueilli au sein de son équipe avec tant de naturel. Nos premiers échanges auront été très importants pour rassurer l'étudiant très inquiet que j'étais. Bien évidemment, merci à ma directrice de thèse, Nina. Merci de m'avoir offert la possibilité de réaliser cette thèse, en particulier sur un sujet où tout était à construire depuis le début, sans savoir où cela nous mènerait. J'ai toujours pris cela pour une grande marque de confiance en mon potentiel et en mes capacités. Je vous remercie également énormément pour la grande liberté que vous m'avez offerte pour réaliser un grand nombre de choses à côté de mon travail de recherche. Je sais que je n'ai pas été simple à encadrer, mais sachez que de mon côté, j'ai beaucoup appris à votre contact.

Merci à Anna pour sa bonne humeur et sa gentillesse quotidienne ainsi que pour toutes les expériences de microscopie qu'elle a eu la grande générosité de réaliser pour moi. Merci à Sacha pour toutes les discussions que nous avons eu et ses nombreux conseils scientifiques. Je pense sincèrement avoir rencontré avec toi, l'un des chercheurs les plus talentueux de sa génération. Merci à Yann, avec qui j'ai appris énormément dans mes premiers mois au laboratoire. Tu as dans beaucoup d'aspects de ce travail, été un exemple

pour moi et ta thèse m'aura été très utile ! Merci à Ilya, Ivan et Masha d'avoir été toujours disponibles pour discuter sciences.

Merci Damien. Merci pour ta bonne humeur et pour ton rire. Merci pour toutes les discussions que l'on a pu avoir, scientifiques ou non. Merci d'avoir été toujours à l'écoute. Je suis sûr que tu feras un très bon chercheur, tu en as toutes les capacités. Merci surtout d'avoir supporté toutes mes blagues sans m'en tenir rigueur ! Bien sûr que non, tu ne casses pas tout ce que tu touches et tes tremblements ne sont pas si impressionnants que ça. Bien sûr qu'il t'arrive d'avoir des contrôles négatifs de tests mycoplasmes qui sont vraiment négatifs. Et bien sûr, tous les hôtels dans lesquels tu dors ne coulent pas ! Quoi que... ;-)

Anne-Marie. Merci n'est pas un mot assez grand pour décrire ce que je ressens là tout de suite te concernant. Tu as toujours été là pour moi, au laboratoire et en dehors de celui-ci. Tu m'as toujours encouragé dans tout ce que j'entreprenais. Grâce à toi j'ai gagné une tablette en 3 minutes ! :-D Ta gentillesse, ta bonne humeur, ton rire, tant de choses auront rendu mon séjour dans ce laboratoire inoubliable. Je vais donc résumer cela en quelques mots : Merci d'être bien plus qu'une collègue de travail pour moi, merci d'être mon amie.

J'aimerais remercier ici également tous les stagiaires que j'ai eu le bonheur d'encadrer ou pour lesquels j'ai participé à l'encadrement. Ces travaux de thèse sont une mosaïque de moments passés avec vous et si je devais mettre uniquement les expériences que j'ai faites moi-même, quelques pages suffiraient. J'espère donc vous avoir apporté autant que ce que vous m'avez apporté. Merci Charlotte, Lauriane, Orian, Mickaele, Akira, Damien (:-D), Jia, Mathilde, Laurine, Pierre.

Merci à tous les membres de l'unité GMGM et bien sûr en particulier, merci à tous les membres du bloc IPCB ! Je n'aurai pu rêver meilleur cadre de travail. Vous avez tous contribué à faire de cet endroit une seconde maison pour moi. Sachez garder cette ambiance si particulière qui fait de ce lieu, un endroit où l'on a envie de se rendre. J'aimerais bien sûr remercier mes compagnons de thèse : Matthieu, Myriam, Daphné, Sylvain...et surtout Gaétan. J'ai trouvé en toi mon double de thèse. Une personne avec laquelle j'ai partagé de nombreux moments de doute, mais surtout de rigolade. Cette thèse n'aurait pas été pareil sans toi. Ici je souhaite aussi remercier Johan. Je te remercie pour les nombreuses discussions et pour tous tes encouragements. Tu m'as énormément apporté tant scientifiquement, qu'humainement.

Merci à tous les Openlabistes ! Merci de m'avoir permis de sortir du laboratoire et de penser à autre chose pendant quelques heures en votre compagnie. OpenLAB a certainement été une des plus belles choses que j'ai faites pendant ces quatre années de thèse. Merci à Elea, Angélique, Daphné, Romain, Mahboubi, Tiphaine, Amélie, Sébastien. Merci à toute l'équipe dirigeante de cette magnifique opération et en particulier merci à Lucile et à Emma pour leur sourire, leur disponibilité et le travail qu'elles accomplissent. Enfin merci au véhicule de l'IMBP qui aura énormément souffert à cause de nous :-).

Merci à toute l'équipe d'enseignement qui m'a accueilli pour mon année d'ATER, et en particulier merci à Daniela Lener et Frédéric Fischer pour leurs conseils et les discussions nécessaires concernant l'enzymologie.

Je souhaite également remercier ici le directeur de mon école doctorale Serge Potier et « la perle » Mélanie Muser. Merci d'avoir été toujours à mon écoute et si prompt à répondre à mes questions. Merci de m'avoir fait confiance dans mon rôle de représentant des étudiants au conseil de l'école doctorale et en particulier merci d'avoir toujours tenu compte de mon avis et de celui des autres représentants au sein de ces conseils. Je pense que ce n'est pas souvent le cas dans les autres conseils.

Pour finir, je souhaite remercier mes amis et ma famille qui ont toujours été là pour moi au cours de cette thèse. Merci maman. Merci d'avoir été toujours d'un soutien sans faille et toujours à l'écoute dans mes très nombreux moments de doute. Tu as toujours cru en moi et j'espère te rendre fière par ce que j'ai accompli et par la personne que je suis devenu. Merci Julie, merci ma chérie de partager ma vie et d'avoir été toujours aimante et encourageante. Merci de m'avoir supporté ces dernières années et en particulier pendant les dernières semaines d'écriture où j'ai été des plus désagréable...Merci d'avoir tout assumé à la maison, je dis bien tout, dans ce moment si particulier pour nous et bien sûr merci pour les corrections du manuscrit. Je vous aime tous.

Table des Matières

Table des Matières	1
Liste des Figures	6
Liste des Tableaux	8
Abréviations	9
Introduction	11
I. Les mitochondries	13
1. Structure et organisation des mitochondries	13
2. Fonctions cellulaires de la mitochondrie	16
3. Génétique mitochondriale	20
3.1. L'ADN mitochondrial humain	20
3.2. Organisation de l'ADNmt en nucléoïde.....	22
4. La transcription de l'ADN mitochondrial	24
5. La synthèse protéique au sein de la mitochondrie	26
6. La réplication de l'ADNmt	28
6.1. Le réplisome mitochondrial.....	28
6.2. Mécanisme de réplication de l'ADN mitochondrial	30
6.3. Régulation de la réplication de l'ADN mitochondrial.....	35
7. Réparation de l'ADN mitochondrial	36
7.1. BER : Réparation par excision de base	37
7.2. SSBP : Réparation des cassures simple brin de l'ADN.....	39
7.3. DSBP : Réparation des cassures double brin de l'ADN.....	40
7.4. Elimination des ADN mitochondriaux endommagés	41
II. L'import mitochondrial de macromolécules	44
1. L'import mitochondrial de protéines	44
1.1. Les signaux d'adressage mitochondrial.....	44
1.2. Les différentes voies d'import mitochondrial de protéines.....	46
2. L'import mitochondrial d'ARN	50
2.1. L'import d'ARN chez les protozoaires	50
2.2. L'import d'ARN chez les plantes.....	52
2.3. L'import d'ARN chez la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	52
2.4. L'import d'ARN chez les mammifères	55
2.4.1. Import mitochondrial de l'ARNr 5S	56
2.4.2. Import mitochondrial des composants ARN de la RNase P et de la RNase MRP ..	59

2.4.3. Import mitochondrial de microARN	60
2.4.4. Import artificiel de tRK1	60
III. Les maladies mitochondriales	62
1. Maladies mitochondriales dues à une mutation dans l'ADN nucléaire.....	62
2. Maladies mitochondriales dues à une mutation dans l'ADNmt	63
2.1. L'hétéroplasmie mitochondriale	64
2.2. Le « genetic bottleneck »	65
3. Stratégies thérapeutiques des maladies mitochondriales	66
3.1. Un modèle d'étude : les cellules cybrides transmittochondriales.....	66
3.2. Prévention de la transmission de maladies mitochondriales	68
3.3. Traitements pharmacologiques et stratégies diététiques	70
3.4. Stratégies de thérapie génique	70
3.4.1. La stratégie allotopique.....	70
3.4.2. La stratégie anti-réplivative	72
3.4.3. La stratégie anti-génomique.....	75
IV. L'outil d'édition du génome CRISPR/Cas	80
1. Les systèmes d'immunité adaptative CRISPR-Cas	80
2. L'outil d'édition du génome CRISPR-Cas9	84
3. Les différentes applications de l'outil CRISPR-Cas9.....	87
Projet de Thèse	91
Résultats Expérimentaux	95
Partie I : Développement d'une stratégie anti-réplivative exploitant la voie d'adressage mitochondrial de l'ARNr 5S	97
I. Optimisation de la stratégie anti-réplivative ciblant un ADNmt affecté par une large délétion.....	99
1. Modèle d'étude.....	99
2. Modélisation et sélection des ARNr 5S recombinants anti-réplivatifs	100
2.1. Production d'une banque d'ARNr 5S recombinants anti-réplivatifs	100
2.2. Sélection des ARNr 5S recombinants anti-réplivatifs.....	101
3. Etude de la spécificité d'hybridation des ARNr 5S recombinants in vitro.....	105
4. Production d'une lignée cellulaire cybride KSS Flp-In™	106
5. Production et analyse des lignées cellulaires cybrides KSS pFRT-5Srec	110

II. Adaptation de la stratégie anti-réplivative à une mutation ponctuelle de l'ADNmt	115
1. Modélisation et sélection des ARNr 5S recombinants ciblant la mutation ponctuelle m.13514A>G.....	115
2. Production et sélection d'une lignée cellulaire cybride ND5 Flp-In™	118
3. Production et analyse des lignées cellulaires cybrides ND5 pFRT-5Srec	119
Partie II : Développement d'une stratégie anti-génomique basée sur l'utilisation du système CRISPR/Cas9	123
I. Développement d'un système CRISPR/Cas9 mitochondrial ciblant spécifiquement un ADNmt mutant affecté par une large délétion	125
1. Choix du modèle d'étude et identification de la séquence cible.....	125
2. Modification des ARNsg en vue de leur adressage mitochondrial.....	127
3. Modifications de l'endonucléase Cas9 en vue de son adressage mitochondrial	131
4. Application du système CRISPR/Cas9 mitochondrial sur les cellules cybrides KSS.....	135
II. Application du système CRISPR/Cas9 mitochondrial à une lignée cellulaire sauvage	137
1. Production et modification d'ARNsg ciblant l'ADNmt sauvage	137
2. Construction d'une lignée cellulaire sauvage d'expression inductible de l'endonucléase MTS ^{COX8A} -hCas9.....	141
3. Etude de l'activité mitochondriale de la nucléase MTS ^{COX8} -hCas9.....	145
4. Application du système CRISPR/Cas9 mitochondrial sur les cellules sauvages HEK293-T-Rex-MTS ^{COX8A} -hCas9.....	146
III. Introduction d'ARNsg ciblant deux régions distinctes de l'ADNmt	149
1. Production et modification d'ARNsg ciblant la région NCR.....	149
2. Activité du système CRISPR/Cas9 mitochondrial sur l'ADNmt et sur le nucléoïde.....	152
3. Application du système CRISPR/Cas9 mitochondrial avec deux ARNsg	153
Conclusions & Perspectives	157
Matériels & Méthodes	171
I. Matériels	173
1. Lignées cellulaires.....	173
2. Milieux de culture.....	174
3. Souches bactériennes	175
4. Anticorps	175

II. Méthodes	176
1. Méthodes relatives à la culture de cellules humaines	176
1.1. Décongélation des cellules	176
1.2. Culture et passage des cellules.....	176
1.3. Congélation des cellules	176
1.4. Transfection des cellules	177
2. Méthodes d'extraction de matériel biologique	177
2.1. Extraction d'ADN total de cellules humaines	177
2.2. Extraction d'ARN total de cellules humaines	178
2.3. Isolation des mitochondries de cellules humaines	178
2.4. Extraction des ADN de mitochondries purifiées	178
2.5. Extraction des ARN de mitochondries purifiées.....	179
2.6. Extraction des protéines de mitochondries purifiées	180
3. Méthodes de mesure du taux d'hétéroplasmie	180
3.1. Mesure de l'hétéroplasmie de cellules porteuses de la délétion m.8363_15438del .	180
3.2. Mesure de l'hétéroplasmie de cellules porteuses de la mutation ponctuelle m.13514A>G	181
4. Méthodes relatives à l'analyse des acides nucléiques	182
4.1. Transfert de type Southern	182
4.2. Transfert de type northern.....	183
5. Méthodes relatives au développement de la stratégie anti-réplivative	183
5.1. Modélisation et sélection des ARNr 5S recombinants	183
5.2. Production des matrices ADN pour la transcription in vitro des 5Srec.....	184
5.3. Synthèse des ARNr 5S recombinants par T7 transcription.....	186
5.4. Marquage radioactif des ARNr 5S recombinants en 5'	186
5.5. Tests d'hybridation in vitro à l'ADNmt des ARNr 5S recombinants	187
5.6. Production de lignées cellulaires cybrides transmitochondriales Flp-In™	188
5.7. Analyse du nombre de site FRT au sein des lignées cybrides pFRT.....	189
5.8. Production de lignées cellulaires cybrides transmitochondriales exprimant des ARNr 5S recombinants	190
5.9. Analyse de la quantité d'ARN par RT-PCR semi-quantitative.....	192
6. Méthodes relatives au développement du système CRISPR/Cas9 mitochondrial	194
6.1. Synthèse des ARNsg par T7 transcription	194
6.2. Expression et purification de la protéine Cas9 recombinante	195
6.3. Tests de clivage in vitro	196
6.4. Analyses des protéines par western-blot.....	197
6.5. Analyses par microscopie	198
6.6. Analyse de la localisation subcellulaire des ARNsg	199

6.7. Préparation de lysats de mitochondries	200
6.8. Analyse de la quantité d'ADNmt par cellules par qPCR en temps réel	200
Bibliographie.....	203
Annexes	222
Article	224

Liste des Figures

Figure 1 : Les structures de la mitochondrie.....	13
Figure 2 : L'ultrastructure de la mitochondrie.....	14
Figure 3 : Les complexes protéiques du processus de phosphorylation oxydative.....	17
Figure 4 : Glycolyse, β -oxydation et Cycle de Krebs.....	18
Figure 5 : L'ADN mitochondrial humain.....	21
Figure 6 : La région non-codante majeure de l'ADNmt.....	22
Figure 7 : Le nucléoïde mitochondrial.....	23
Figure 8 : La transcription de l'ADNmt humain.....	26
Figure 9 : Le réplisome mitochondrial minimal.....	29
Figure 10 : Le modèle de réplication asynchrone ou par déplacement de brin (SDM).....	32
Figure 11 : Le modèle de réplication RITOLS.....	32
Figure 12 : Le modèle de réplication synchrone bidirectionnel.....	34
Figure 13 : La transition Réplication/Transcription au niveau de la NCR.....	36
Figure 14 : Les étapes principales de la voie de réparation par excision de base (BER).....	38
Figure 15 : La voie de réparation par « Microhomology-mediated End Joining ».....	41
Figure 16 : La maintenance de la cellule suite à un altération de l'ADNmt.....	43
Figure 17 : Les différents signaux d'adressage mitochondrial.....	45
Figure 18 : Les différentes voies d'import mitochondrial de protéines.....	47
Figure 19 : L'import mitochondrial d'ARN chez les plantes et chez <i>Trypanosoma brucei</i>	51
Figure 20 : Structure secondaire de tRK1 et du petit ARN artificiel F1D1.....	54
Figure 21 : Trafic de l'ARNr 5S au sein des cellules humaines.....	57
Figure 22 : Structure secondaire de l'ARNr 5S humain.....	58
Figure 23 : L'hétéroplasmie mitochondriale.....	64
Figure 24 : Processus de création des cellules cybrides.....	67
Figure 25 : Les différentes options de reproduction pour les femmes porteuses de mutations de l'ADNmt.....	69
Figure 26 : La stratégie anti-répllicative.....	73
Figure 27 : La reconnaissance et le clivage de l'ADN par les mitoTALEN.....	79
Figure 28 : Les trois grandes étapes du système d'immunité adaptative CRISPR-Cas de type II.....	83
Figure 29 : L'outil d'édition du génome CRISPR-Cas9.....	85
Figure 30 : Mécanisme de reconnaissance et de clivage de l'ADN par CRISPR-Cas9.....	87
Figure 31 : Les différentes applications de la technologie CRISPR-Cas9.....	90
Figure 32 : Comparaison de l'ADNmt sauvage et de l'ADNmt affecté par la délétion KSS.....	99
Figure 33 : Stratégie de production <i>in silico</i> de la banque d'ARNr 5S recombinants.....	101
Figure 34 : Structures secondaires de l'ARNr 5S humain et des 5Srec ciblant l'ADNmt KSS.....	104
Figure 35 : Efficacité et spécificité d'hybridation <i>in vitro</i> des 5Srec ciblant l'ADNmt KSS.....	106
Figure 36 : Les principales étapes du système Flp-In TM T-Rex TM (Invitrogen).....	107
Figure 37 : Analyse des clones cellulaires KSS pFRT.....	108
Figure 38 : Quantification par RT-PCR semi-quantitative des molécules « 5S-KSS-14L ».....	111
Figure 39 : Taux d'hétéroplasmie des lignées cellulaires cybrides KSS pFRT-5Srec après plusieurs semaines de culture en présence (4,5g/L) ou en absence (0g/L) de glucose.....	113
Figure 40 : Carte de l'ADNmt m.13514A>G et principe de quantification de son hétéroplasmie.....	116
Figure 41 : Structures secondaires de l'ARNr 5S humain et des 5Srec ciblant l'ADNmt mutant m.13514A>G.....	117
Figure 42 : Spécificité d'hybridation <i>in vitro</i> des ARNr 5S recombinants ND5.....	118

Figure 43 : Taux d'hétéroplasmie des lignées cellulaires cybrides ND5 pFRT-5Srec après plusieurs semaines de culture en présence (4,5g/L) ou en absence (0g/L) de glucose.....	120
Figure 44 : Séquence ciblée par l'ARNsg KSS sur l'ADNmt mutant m.8363_15438del.....	126
Figure 45 : Les modifications de l'ARNsg KSS permettent leur adressage mitochondrial sans altérer le clivage spécifique des complexes Cas9-ARNsg.....	128
Figure 46 : Analyse de la localisation subcellulaire de l'endonucléase MTS ^{COX8A} -hCas9.....	133
Figure 47 : Localisation sub-mitochondriale de la protéine MTS ^{COX8} -hCas9.....	134
Figure 48 : Taux d'hétéroplasmie des cellules cybrides KSS après application de l'outil CRISPR/Cas9 mitochondrial.....	135
Figure 49 : Séquence ciblée par l'ARNsg WT sur l'ADNmt de référence.....	138
Figure 50 : Les modifications de l'ARNsg WT permettent leur adressage mitochondrial sans altérer le clivage spécifique des complexes Cas9-ARNsg.....	140
Figure 51 : Analyse de la localisation subcellulaire de la protéine MTS ^{COX8A} -hCas9 au sein des cellules HEK293-T-Rex-MTS ^{COX8A} -hCas9.....	142
Figure 52 : Expression et import de la protéine MTS ^{COX8A} -hCas9 en fonction de la concentration en tétracycline.....	143
Figure 53 : Expression et import de la protéine MTS ^{COX8A} -hCas9 en fonction du temps d'induction.....	144
Figure 54 : Activité de l'endonucléase MTS ^{COX8A} -hCas9 au sein des mitochondries.....	146
Figure 55 : Evolution de la quantité relative de gène MT-RNR1 en fonction du temps après application du système CRISPR/Cas9 mitochondrial.....	147
Figure 56 : Séquences ciblées par les ARNsg NCR ¹ et NCR ² sur l'ADNmt de référence.....	150
Figure 57 : Les ARNsg NCR modifiés sont importés dans les mitochondries et permettent un clivage de l'ADN.....	151
Figure 58 : Les complexes ARNsg/Cas9 peuvent cliver l'ADNmt au sein du nucléoïde.....	153
Figure 59 : Quantité absolue d'ADNmt au sein de cellules Hep G2 après application du système CRISPR/Cas9 mitochondrial.....	154
Figure 60 : Quantité absolue d'ADNmt au sein de cellules HEK293-T-Rex-MTS ^{COX8A} -hCas9 après application du système CRISPR/Cas9 mitochondrial.....	155

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Comparaison du ribosome bactérien et des mitoribosomes porcine et humaine.....	27
Tableau 2 : Différences entre le code génétique dit « universel » et le code génétique mitochondrial.....	28
Tableau 3 : Prédiction de T_m des inserts anti-réplicatifs vis-à-vis des ADNmt KSS et WT.....	102
Tableau 4 : Tableau comparatif des lignées cellulaires cybrides KSS pFRT.....	109
Tableau 5 : Quantités d'ARNr 5S recombinants au sein des lignées cellulaires cybrides.....	111
Tableau 6 : Prédiction de T_m des inserts anti-réplicatifs vis-à-vis des ADNmt m.13514A>G (ND5) et sauvage (WT).....	116
Tableau 7 : Tableau comparatif des lignées cellulaires cybrides ND5 pFRT.....	119
Tableau 8 : Amorces et conditions PCR pour la mesure du taux d'hétéroplasmie de la délétion KSS.....	181
Tableau 9 : Séquence des amorces utilisées pour la production des matrices de transcription T7 des ARNr 5S recombinants.....	184
Tableau 10 : Programmes de la PCR1 pour l'amplification des matrices de transcription T7 des ARNr 5S recombinants.....	185
Tableau 11 : Programme de la PCR2 pour l'amplification des matrices de transcription T7 des ARNr 5S recombinants.....	185
Tableau 12 : Amorces et programme PCR pour amplifier les fragments d'ADNmt WT et Mut KSS.....	187
Tableau 13 : Amorces et programme PCR pour amplifier les fragments d'ADNmt WT et Mut ND5.....	188
Tableau 14 : Amorces et programme PCR pour l'amplification d'un fragment du plasmide pFRT/lacZeo.....	190
Tableau 15 : Amorces permettant l'amplification des gènes d'ARNr 5S recombinants et leur clonage dans le plasmide pcDNA5/FRT/TO.....	191
Tableau 16 : Programmes PCR permettant l'amplification des gènes d'ARNr 5S recombinants..	192
Tableau 17 : Amorces et programme utilisés pour quantifier les ARNr 5S recombinants par RT-PCR semi-quantitative.....	193
Tableau 18 : Amorces utilisées pour produire les matrices ADN de transcription des ARNs.....	195
Tableau 19 : Amorces et programme PCR utilisés pour quantifier la quantité d'ADNmt par cellules.....	201

Abréviations

ADN	Acide D éoxyribo N ucléique
ADNmt	ADN mitochondrial
AIF	Apoptosis Inducing F actor
ANT	A dénine N ucléotide T ranslocase
ARN	Acide R ibo N ucléique
ARNcr	ARN CRISPR
ARNm	ARN messenger
ARNr	ARN ribosomique
ARNsg	ARN simple-guide
ARNt	ARN de transfert
ARNtracr	ARN transactivateur CRISPR
ADP	A dénosine D i P hosphate
ATP	A dénosine T ri P hosphate
Cas	CRISPR-associated (protein)
CRISPR	C lustered R egularly I nterspaced S hort P alindromic R epeat
CSB	C onserved S equene B lock
DAPI	4',6- d iamidino-2- p henylindole
dCas9	dead Cas9
GFP	Green Fluorescent Protein (Protéine de Fluorescence Verte)
HSP	Heavy Strand Promoter
IMS	Espace Intermembranaire (I nter M embrane S pace)
LSP	Light Strand Promoter
MIM	Membrane mitochondriale interne (M itochondrial I nter M embrane)
MMEJ	M icrohomology M ediated E nd J oining
MOM	Membrane mitochondriale externe (M itochondrial O uter M embrane)
Mt-LSU	M itochondrial- L arge S ub U nit (Grande sous-unité du mitoribosome)
Mt-SSU	M itochondrial- S mall S ub U nit
NCR	N on- C oding R egion
NHEJ	N on H omologous E nd J oining
ONPG	O rtho- N itro P hényl- β - G alactoside
PAM	P rospacer- A djacent M otif
PAP	P oly- A P olymerase
PCR	P olymerase C hain R eaction
POLRMT	ARN P olymérase M itochondriale
RITOLS	R NA I ncorporation T hrough O ut the L agging S trand
ROS	R eactive O xygen S pecies (Espèces réactives de l'oxygène)
SAM	S orting and A ssembly M achinery
TALEN	T ranscription- A ctivator L ike E ffector N uclease
TAS	T ermination A ssociated S equene
TIM	T ranslocase of the I nter M embrane
TOM	T ranslocase of the O uter M embrane
UTR	U n T ranslated R egion (Région non traduite)
VDAC	V oltage- D eependent A nion C hannel
ZFN	Z inc F inger N uclease

Introduction

I. Les mitochondries

1. Structure et organisation des mitochondries

Les mitochondries sont des organites que l'on retrouve dans le cytoplasme de presque toutes les cellules eucaryotes (Karnkowska *et al.*, 2016). Décrites pour la première fois au cours du XIX^e siècle (Ernster and Schatz, 1981), elles sont le plus souvent dépeintes comme des structures granulaires isolées de forme ovoïde et d'une taille de 1 à 10 μm de long pour un diamètre d'environ 1 μm , présentes en grand nombre au sein des cellules (**Figure 1A**). Cette description est cependant quelque peu réductrice tant le nombre, la forme ou encore la taille des mitochondries varient en fonction du type cellulaire ou de son stade de développement. De plus, il est désormais bien connu que les mitochondries s'assemblent la plupart du temps en un réseau très dynamique qui peut s'étendre dans toute la cellule et qui est régi par de nombreux événements de fusion et de fission (**Figure 1B**). Le nom « mitochondrie » reflète d'ailleurs cette extrême variabilité de structure, puisqu'introduit en 1898 par le microbiologiste allemand Carl Benda (Ernster and Schatz, 1981), il provient du grec ancien *mitos* pour « filament » et *chondros* pour « granule », d'après la tendance de ces organites à être retrouvées sous ces deux formes durant la spermatogenèse.

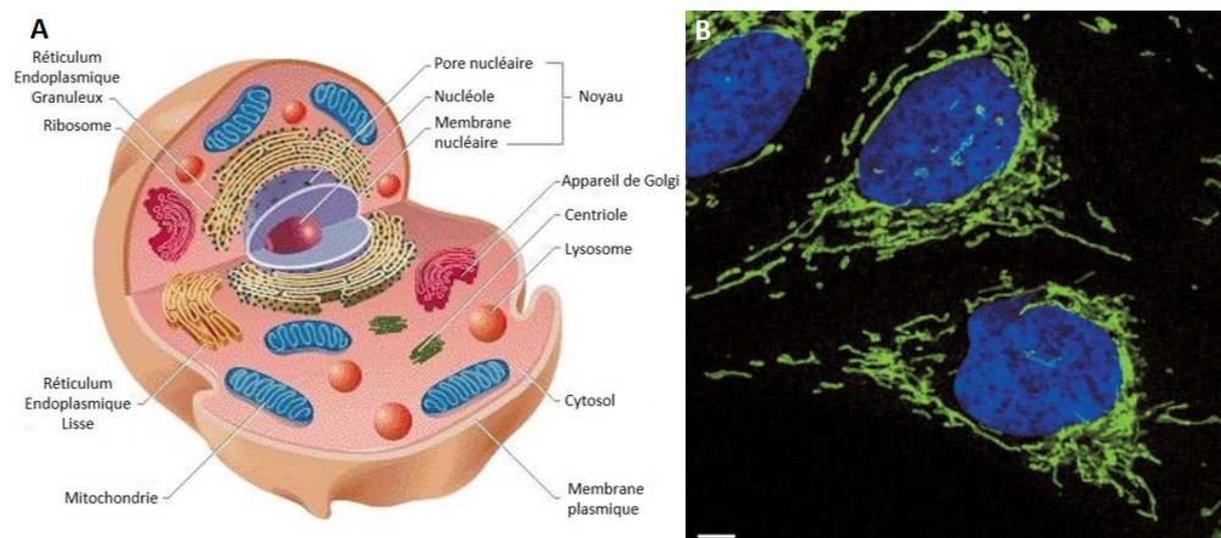


Figure 1. Les structures de la mitochondrie.

(A) Représentation schématique caractéristique d'une cellule animale. Les mitochondries y sont présentées en plusieurs exemplaires, sous forme de granules isolés (source : www.wikimedia.org). (B) Le réseau mitochondrial. Cellules humaines d'ostéosarcome (U2OS) observées par microscopie confocale. Les mitochondries (en vert) sont colorées par immunofluorescence en utilisant un anticorps dirigé contre la protéine de la membrane mitochondriale externe Tom20, les noyaux (en bleu) sont marqués au DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (Westermann, 2010).

L'ultrastructure caractéristique des mitochondries a quant à elle été décrite de façon précise au début des années 1950, par George Emil Palade et Fritiof Sjöstrand, grâce aux premiers clichés de haute résolution obtenus par microscopie électronique, (Palade, 1953 ; Sjostrand, 1953) (**Figure 2A**).

Ces organites présentent ainsi deux membranes qui sont toutes deux des bicouches lipidiques : la membrane mitochondriale externe (MOM, **Mitochondrial Outer Membrane**) et la membrane mitochondriale interne (MIM, **Mitochondrial Inner Membrane**). Elles se différencient par leurs structures et leurs propriétés physico-chimiques, reflétant leurs fonctions biochimiques distinctes. Ces deux membranes de perméabilités différentes délimitent deux compartiments : l'espace intermembranaire (IMS, **InterMembrane Space**) et la matrice mitochondriale (**Figure 2B**).

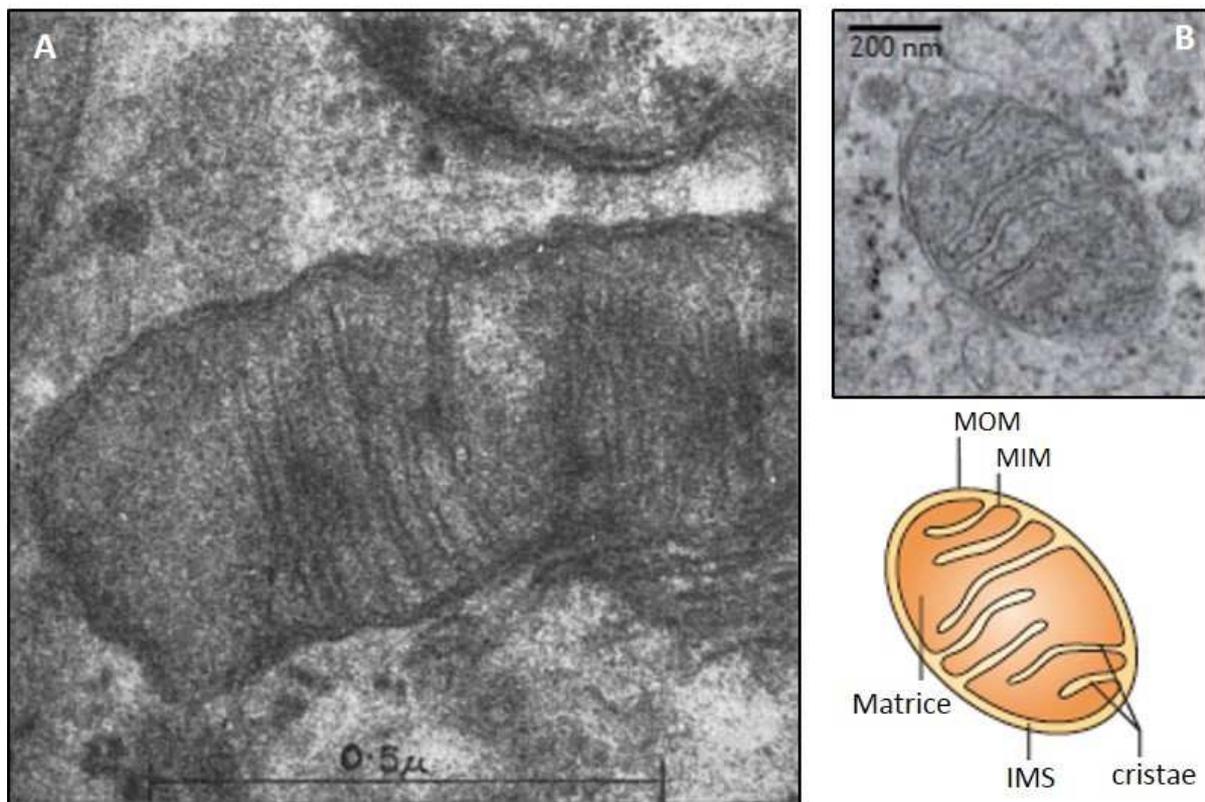


Figure 2. L'ultrastructure de la mitochondrie.

(A) Premier cliché de microscopie électronique d'une mitochondrie de l'épithélium du tubule proximal de rein chez la souris (Grossissement x 97000) (Sjöstrand, 1953). (B) En haut, mitochondrie isolée observée par microscopie électronique dans une coupe ultrafine de fibroblaste humain. En bas, schéma descriptif de l'ultrastructure de la mitochondrie isolée présentée au-dessus. Adaptée de (Westermann, 2010).

La membrane mitochondriale externe est l'enveloppe qui sépare la mitochondrie du cytosol. Composée à 50% de lipides et à 50% de protéines, elle est notamment caractérisée par sa richesse en cholestérol (jusqu'à 10%). Elle contient de très nombreux canaux transmembranaires appelés VDAC (**V**oltage-**D**ependent **A**nion **C**hannel), qui la rendent perméable aux ions et aux petites molécules de poids moléculaire inférieur à 5 kDa (comme le pyruvate, les acides gras ou encore les nucléotides).

La membrane mitochondriale interne forme quant à elle de nombreuses invaginations appelées crêtes mitochondriales (ou *cristae*) qui sont dirigées vers l'intérieur de la mitochondrie, augmentant ainsi significativement sa surface. Composée à 80% de protéines et à 20% de lipides, elle est caractérisée par sa richesse en cardiolipine, un phospholipide retrouvé presque exclusivement au sein de cette membrane. Contrairement à la membrane externe, la membrane mitochondriale interne est très peu perméable aux ions, mais elle est parcourue par de nombreux transporteurs permettant la pénétration de métabolites (Palmieri and Pierri, 2010). Parmi ces transporteurs, nous pouvons citer l'ANT (**A**dénine **N**ucléotide **T**ranslocase) qui échange l'ATP mitochondrial contre de l'ADP provenant du cytosol, la navette malate/aspartate permet quant à elle, par un mécanisme très sophistiqué, la translocation dans la matrice mitochondriale des électrons produits au cours de la glycolyse. D'autres transporteurs sont essentiels : le transporteur du citrate, la pyruvate translocase de type symport pyruvate/proton ou encore le co-transporteur phosphate inorganique/proton.

L'espace intermembranaire est le compartiment qui se trouve entre ces deux membranes mitochondriales. Du fait de la perméabilité de la membrane externe, sa composition est très proche de celle du cytosol mais il est particulièrement riche en molécules de taille inférieure à 5kDa et en particulier en protons H^+ , ce qui lui confère un pH d'environ 6,9 (Porcelli *et al.*, 2005). On y retrouve également un certain nombre de protéines, et en particulier le cytochrome c et d'autres facteurs pro-apoptotiques comme AIF (**A**poptosis-**I**nducing **F**actor).

Enfin, la matrice mitochondriale est l'espace intérieur de la mitochondrie délimité par la membrane mitochondriale interne. Relativement visqueuse par rapport au cytosol, avec un pH d'environ 7,8 (Porcelli *et al.*, 2005), la matrice abrite l'ADN mitochondrial (ADNmt) ainsi que tous les éléments permettant sa réplication, son expression ou encore sa réparation. Elle contient surtout un grand nombre d'enzymes impliquées dans les diverses voies métaboliques

ayant lieu dans les mitochondries, donnant à cet organite une place toute particulière au sein des cellules eucaryotes.

2. Fonctions cellulaires de la mitochondrie

Les mitochondries sont des organites essentiels des cellules eucaryotes de par leur participation à de nombreux processus cellulaires cruciaux allant de la biogénèse des centres Fer/Soufre à la régulation de l'homéostasie du calcium, en passant par la thermogénèse. Elles abritent également de nombreuses voies anaboliques comme les voies de synthèse de l'hème, des stéroïdes ou encore de certains acides aminés. De plus, comme nous avons pu l'évoquer précédemment, l'espace intermembranaire contient de nombreuses enzymes pro-apoptotiques, faisant de la mitochondrie un régulateur majeur du processus de mort cellulaire programmée.

Cependant, de toutes les fonctions que remplit la mitochondrie, la conversion de l'énergie détenue par les nutriments sous une forme assimilable par la cellule, l'ATP, est certainement celle qui occupe une place de première importance. En effet, chez les organismes eucaryotes aérobies, près de 90% de l'ATP cellulaire est produit dans la mitochondrie au cours d'un processus appelé phosphorylation oxydative (Rich, 2003). Celui-ci repose sur un ensemble de cinq complexes protéiques enchâssés dans la membrane mitochondriale interne (**Figure 3**) :

- Le complexe I ou NADH:ubiquinone oxydoréductase
- Le complexe II ou succinate déshydrogenase
- Le complexe III ou ubiquinol-cytochrome c réductase
- Le complexe IV ou cytochrome c oxydase
- Le complexe V ou ATP synthase

Les quatre premiers complexes sont regroupés sous le nom de chaîne respiratoire, ou chaîne de transport des électrons, car un transfert d'électrons va s'y établir grâce à un gradient de potentiels d'oxydoréduction depuis des molécules à faible potentiel (comme le NAD⁺ dont le potentiel est de -320mV) vers des molécules à fort potentiel (comme l'oxygène qui a un potentiel de +816mV). Ce transfert sera accompagné au niveau des complexes I, III et IV, par une translocation de protons de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire,

créant ainsi un gradient électrochimique, ou force protomotrice, qui sera finalement utilisé par le complexe V, ou ATP synthase, afin de phosphoryler l'ADP et ainsi produire de l'ATP.

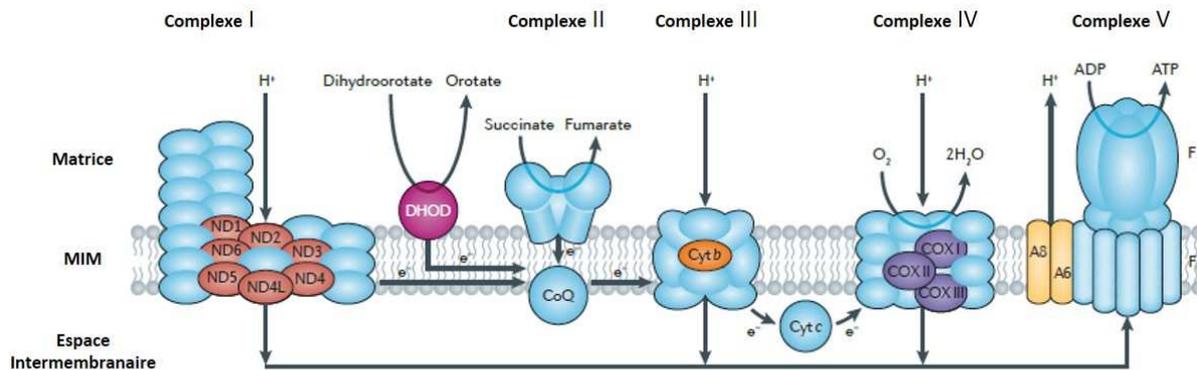


Figure 3. Les complexes protéiques du processus de phosphorylation oxydative.

Représentation schématique des quatre complexes protéiques de la chaîne respiratoire (Complexes I à IV) et de l'ATP synthase (Complexe V) enchâssés dans la membrane mitochondriale interne (MIM). Les sous-unités protéiques encodées par le génome nucléaire sont représentées en bleu ciel. Les 13 sous-unités encodées par le génome mitochondrial sont en rouge pour le complexe I (ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5 et ND6), en orange pour le complexe III (Cytb), en bleu foncé pour le complexe IV (COXI, COXII et COXIII) et en jaune pour le complexe V (A6 pour ATP6 et A8 pour ATP8). La dihydroorotate déshydrogénase (DHOD), impliquée chez l'Homme dans la biosynthèse *de novo* des pyrimidines, ne fait pas partie de la chaîne respiratoire, mais fournit également des électrons à l'ubiquinone (CoQ). Adapté de (Schon, DiMauro and Hirano, 2012).

L'ensemble de ce processus débute en dehors de la mitochondrie par l'oxydation du glucose lors de la glycolyse qui mène à la production de deux molécules de pyruvate (**Figure 4**). Grâce à la pyruvate translocase située dans la membrane interne, ces molécules vont pouvoir pénétrer dans la matrice où elles seront transformées en Acétyl-CoA par l'action de la pyruvate déshydrogénase. Les acides gras sont une seconde source de molécules d'acétyl-CoA. En effet, après avoir été activés sous forme d'acyl-CoA, ils sont dégradés au sein de la mitochondrie lors de la β -oxydation qui aboutit à la formation d'acétyl-CoA. Les fonctions acétyle de ces molécules d'acétyl-CoA vont ensuite être transférées sur l'oxaloacétate grâce à l'action de la citrate synthase, dans ce qui constitue une des entrées du Cycle de Krebs. Au cours de ce cycle, elles seront alors progressivement oxydées pour finalement former du dioxyde de carbone et de l'eau. Chaque tour de cycle sera accompagné par la génération de coenzymes réduits NADH et FADH₂, qui sont des substrats riches en électrons.

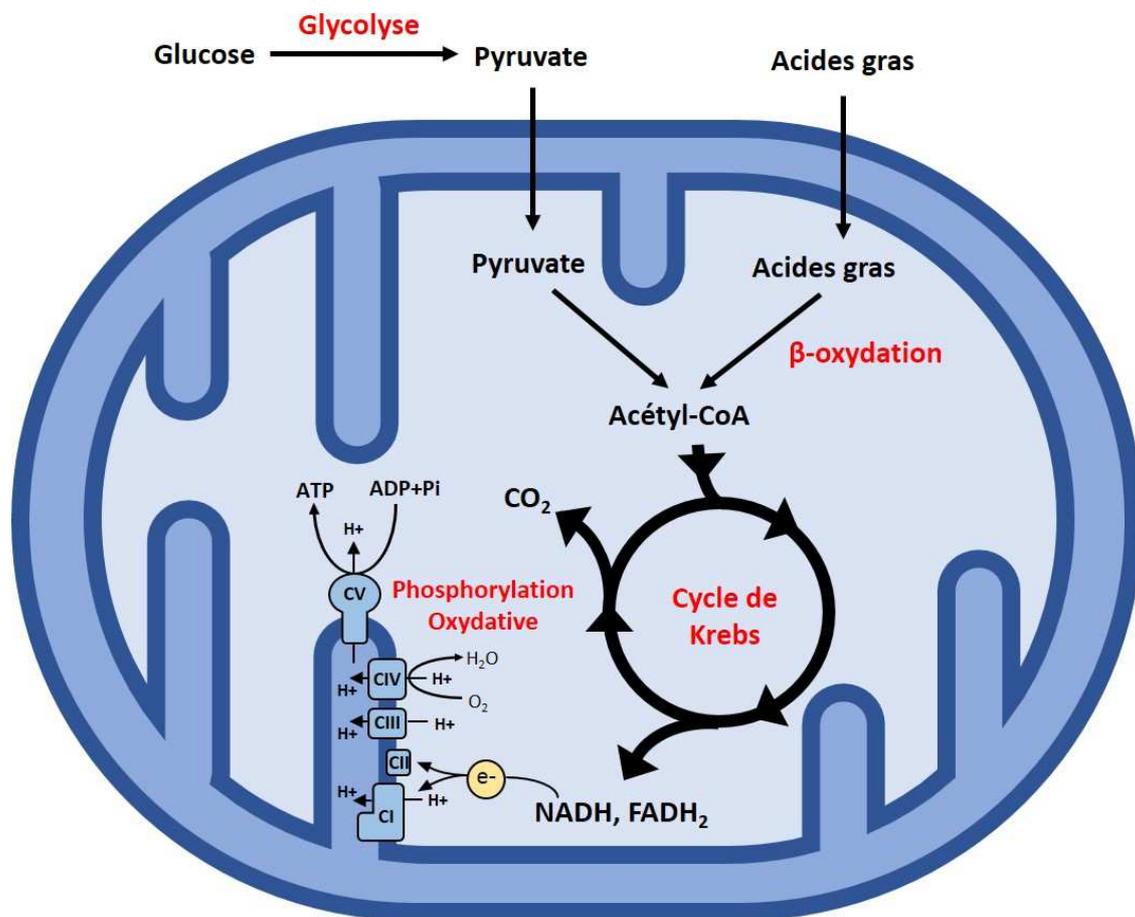


Figure 4. Glycolyse, β -oxydation et Cycle de Krebs.

La dégradation du glucose dans le cytosol lors de la glycolyse, et la dégradation des acides gras dans la mitochondrie lors de la β -oxydation aboutissent à la formation d'acétyl-CoA. Les oxydations successives de cet acétyl-CoA lors du cycle de Krebs entraînent la production des coenzymes réduits NADH et FADH₂, substrats riches en électrons. L'oxydation du NADH au niveau du complexe I et du FADH₂ au niveau du complexe II fournit les électrons (e⁻) qui circulent au sein de la chaîne respiratoire.

C'est l'oxydation de ces coenzymes réduits au niveau des complexes I et II qui fournira les électrons circulant au sein de la chaîne respiratoire en direction de l'accepteur final, le dioxygène O₂. Le complexe I va ainsi catalyser le transfert de deux électrons du NADH vers l'ubiquinone (également appelé coenzyme Q10), une petite molécule amphiphile qui va pouvoir diffuser librement à travers la membrane interne. Cette étape s'accompagne par la translocation de quatre protons vers l'espace intermembranaire (Sazanov, 2007). Le complexe II, second point d'entrée des électrons, présente quant à lui la particularité de participer à la fois au cycle de Krebs et à la chaîne respiratoire. Au cours du cycle de Krebs, il catalyse ainsi

l'oxydation du succinate en fumarate, étape qui permet la production de FADH_2 , qui fournit les électrons nécessaires à la réduction d'ubiquinone. Cependant, cette réaction libère moins d'énergie que l'oxydation du NADH, et le complexe II ne participe donc pas à la génération du gradient de protons (Rich and Maréchal, 2010). L'ubiquinone réduite (ou ubiquinol) diffuse alors vers le complexe III où il sera réoxydé par transfert de deux électrons sur une hémoprotéine, le cytochrome c. Cette étape est une nouvelle fois couplée à la libération de quatre protons dans l'espace intermembranaire. Enfin, Le cytochrome c qui est associé à la membrane interne, va faire le pont entre les complexes III et IV. Ce dernier catalysera alors le transfert des électrons sur l'accepteur final, l'oxygène, qui sera alors transformé en eau. Au cours de cette réaction, le complexe IV permet la translocation de quatre protons supplémentaires de la matrice vers l'espace intermembranaire.

L'ensemble de ces réactions permet ainsi le passage d'un grand nombre de protons H^+ dans l'espace intermembranaire. Or, à cause du gradient électrochimique, ceux-ci ont une tendance naturelle à retourner dans la matrice mitochondriale. Cependant, nous avons vu précédemment que la membrane mitochondriale interne est très peu perméable aux ions, empêchant en très grande partie ce retour. C'est ainsi la présence du complexe V, l'ATP synthase, ou F_1F_0 -ATPase, qui va permettre le retour des protons dans la matrice. En effet, ce complexe protéique comprend un domaine transmembranaire nommé F_0 , qui conduit les protons depuis l'espace intermembranaire vers la matrice. C'est le second domaine de ce complexe, situé dans la matrice, et nommé F_1 , qui utilise ce flux de proton pour produire de l'ATP à partir d'ADP.

Au cours de ce processus de phosphorylation oxydative, 90% du dioxygène que nous respirons est réduit progressivement en eau (Rich, 2003). Cependant, il arrive qu'une petite quantité d'électrons échappe à la chaîne respiratoire (en particulier au niveau des complexes I et III (Bleier and Dröse, 2013) et réagisse avec le dioxygène mitochondrial. Cette réaction prématurée et incomplète entraîne la formation d'une molécule très réactive, l'anion superoxyde $\text{O}_2^{\bullet-}$, qui pourra ensuite être convertie en peroxyde d'hydrogène H_2O_2 ou encore générer des radicaux hydroxyl OH^{\bullet} . Ces trois radicaux libres, qui ont un nombre impair d'électrons et possèdent un fort pouvoir oxydo-réducteur, sont regroupés sous le nom d'espèces réactives de l'oxygène (ROS, **R**eactive **O**xygen **S**pecies) et la chaîne respiratoire mitochondriale semble en être la principale source au sein de la cellule. Malgré la présence

d'enzymes qui permettent leur inactivation au sein des mitochondries, comme la manganèse superoxyde dismutase (SOD2) ou la glutathion peroxydase (GPX), ces ROS ont un intérêt biologique majeur. Ils peuvent en effet causer des dommages cellulaires irréversibles comme la peroxydation des lipides, l'oxydation d'acides aminés sur des protéines ou encore des dommages à l'ADN, et en particulier à une molécule qui se trouve à proximité de la chaîne respiratoire, l'ADN mitochondrial (Shokolenko *et al.*, 2009).

3. Génétique mitochondriale

Dès 1890, Richard Altmann émit l'hypothèse selon laquelle les bioplastes, des organismes élémentaires ubiquitaires retrouvés au sein des cellules et portant des fonctions vitales, possédaient une autonomie métabolique et génétique (Ernster and Schatz, 1981). Plus tard, l'existence d'un ADN dans ce que l'on appelle désormais les mitochondries, fut une nouvelle fois suspectée quand des études démontrèrent que certains caractères étaient transmis par le cytoplasme et non par le noyau (Caspari, 1955). Mais ce n'est finalement qu'au début des années 1960 que la présence de cet ADN mitochondrial fut confirmée au sein d'embryons de poulet (Nass and Nass, 1963).

3.1. L'ADN mitochondrial humain

Séquencé et décrit pour la première fois en 1981 (Anderson *et al.*, 1981), l'ADN mitochondrial (ADNmt) humain est une petite molécule circulaire de 16569 pb constituée de deux brins de densités différentes sur gradient de chlorure de césium : un brin lourd nommé H (pour Heavy) car riche en purines et un brin léger nommé L (pour Light) car riche en pyrimidines (**Figure 5**). Très compact, ne possédant pas d'introns, l'ADNmt contient 37 gènes qui se répartissent en 22 gènes d'ARNt, 2 gènes d'ARNr (ARNr 12S et ARNr 16S) et 13 gènes permettant la synthèse de protéines qui sont toutes des sous-unités essentielles des complexes de la chaîne respiratoire.

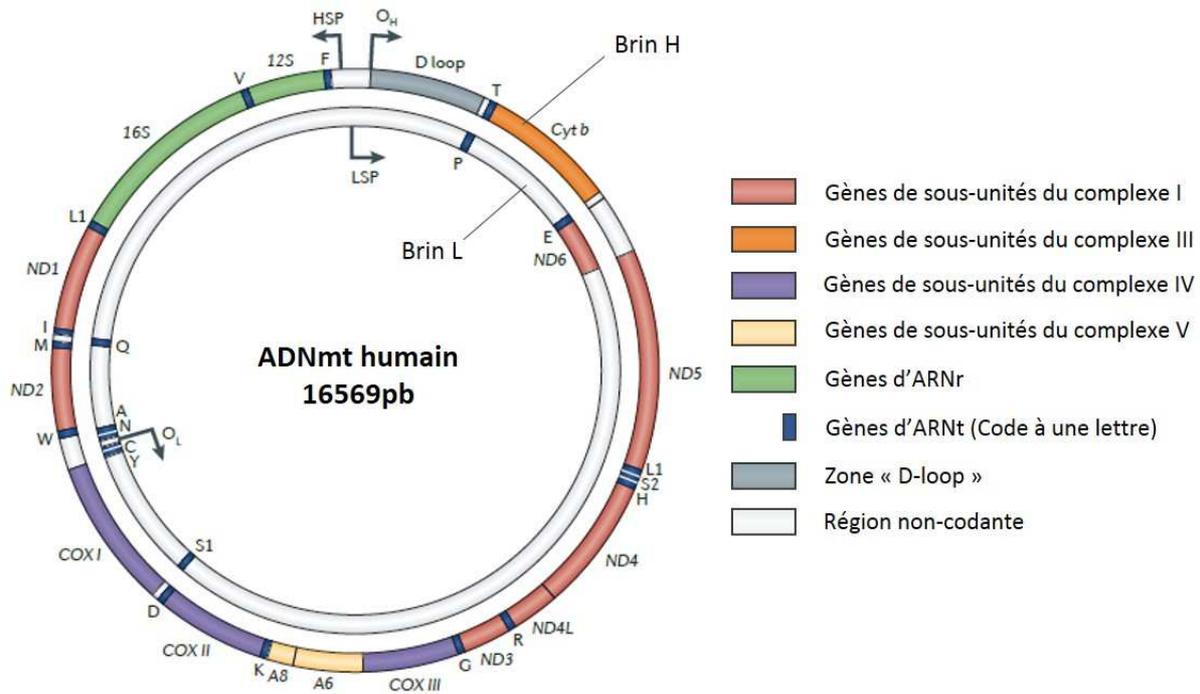


Figure 5. L'ADN mitochondrial humain.

Carte de l'ADNmt humain de référence. Le code couleur utilisé pour l'annotation de cette carte correspond à celui utilisé dans la Figure 4 présentant les complexes protéiques de la phosphorylation oxydative. L'annotation des ARNt utilise la nomenclature à une lettre. Les origines de réplication O_H et O_L ainsi que les promoteurs de transcription du brin H (HSP) et du brin L (LSP) sont indiqués par des flèches. Adaptée de (Schon, DiMauro and Hirano, 2012).

La quasi-totalité de l'ADN non-codant est quant à elle concentrée dans une région de près d'1,1kb, située entre les gènes de l'ARNt^{Pro} et de l'ARNt^{Phe} (**Figure 6**). Nommée région non-codante majeure (NCR, **N**on **C**oding **R**egion) ou région de contrôle, elle contient des éléments très importants pour la réplication et l'expression de l'ADNmt. Outre les promoteurs de transcription du brin H, (HSP, **H**eavy-**S**trand **P**romoter) et du brin L (LSP, **L**ight-**S**trand **P**romoter), elle contient aussi l'origine de réplication du brin H, O_H. Proche de l'extrémité 3' de la NCR, une série de petites séquences conservées d'environ 15 pb, nommées TAS (**T**ermination-**A**ssociated **S**equences), permettrait l'arrêt de la transcription du brin H (Freyer *et al.*, 2010) et semble impliquée dans la régulation de la réplication de l'ADNmt. Enfin, la comparaison des NCR humaines et murines (Walberg and Clayton, 1981) a révélé la présence de trois petits domaines conservés localisés entre les sites LSP et O_H nommés CSB1, CSB2 et CSB3 (**C**onserved **S**equences **B**lock).

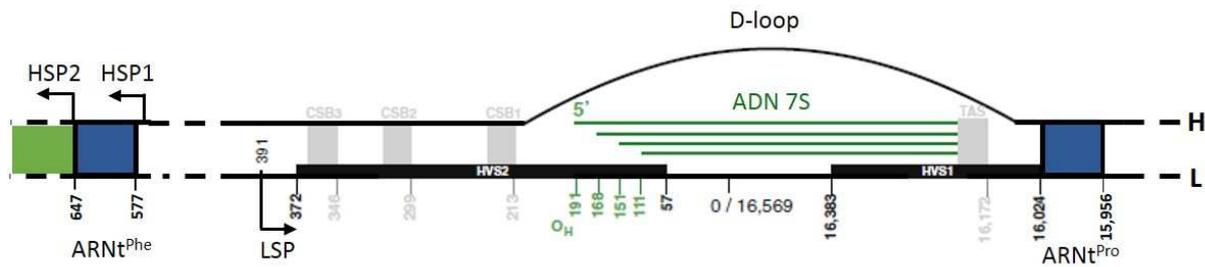


Figure 6. La région non-codante majeure de l'ADNmt.

Carte détaillée de la région non-codante majeure (NCR), ou région de contrôle de l'ADNmt, située entre les gènes de l'ARNt^{Phe} et de l'ARNt^{Pro} (en bleu foncé). On y retrouve les promoteurs de transcription LSP (Light-Strand Promoter) et HSP (Heavy-Strand Promoter), l'origine de réplication O_H, les trois domaines conservés CSB1, CSB2 et CSB3 (Conserved Sequence Block) et la séquence TAS (Termination-Associated Sequence). Les principales positions de l'extrémité 5' de l'ADN 7S sont indiqués en vert. HVS1 et HVS2 désignent des régions qui présentent de nombreux polymorphismes (Hyper Variable Segment). Adapté de (Nicholls and Minczuk, 2014).

Au sein des cellules humaines, l'ADNmt est généralement présent en plusieurs centaines de copies distribuées le long du réseau mitochondrial, mais ce nombre est très fortement dépendant du type cellulaire et du stade de développement. Ainsi, les cellules qui requièrent une grande quantité d'ATP, comme les cellules musculaires ou les neurones, maintiennent un haut nombre de copies d'ADNmt, alors que les cellules qui ont besoin de moins d'énergie contiennent un nombre plus réduit de copies d'ADNmt. Ce nombre de copies d'ADNmt semble très finement régulé puisque des déplétions d'ADNmt sont associées à l'apparition de syndromes neuromusculaires (El-Hattab and Scaglia, 2013). Plusieurs exemplaires de ce génome peuvent également être retrouvés au sein d'une même mitochondrie lorsque celles-ci sont sous forme isolées (Satoh and Kuroiwa, 1991).

3.2. Organisation de l'ADNmt en nucléoïde

Alors qu'il a longtemps été pensé que l'ADNmt était « nu » puisque les mitochondries sont dépourvues d'histones, nous savons désormais qu'il est organisé en structures appelées nucléoïdes, assurant sa compaction (**Figure 7A**). En effet, alors qu'un ADNmt relâché aurait un diamètre d'environ 2 µm au sein de la matrice, le nucléoïde mitochondrial a typiquement un diamètre d'environ 100 nm (Kukat *et al.*, 2011). Cette compaction de l'ADNmt est médiée par la fixation de protéines dont la plupart jouent un rôle clé dans la réplication et la transcription du génome mitochondrial. C'est notamment le cas du facteur de transcription TFAM

(Transcription Factor **A**, Mitochondrial) qui est certainement l'acteur majeur dans la compaction de l'ADNmt, puisqu'il a été montré que cette protéine peut recouvrir entièrement l'ADNmt en s'y fixant toutes les 15pb environ (**Figure 7B**) (Ekstrand *et al.*, 2004 ; Kukat *et al.*, 2015). Mais on peut également citer les protéines mtSSB (**m**itochondrial **S**ingle-**S**trand **B**inding protein), l'ADN polymérase γ (POLG), l'hélicase TWINKLE ou encore l'ARN polymérase mitochondriale (POLRMT).

Une autre protéine interagissant avec le nucléoïde, ATAD3 (**A**T**P**ase **A**AA **D**omain-containing protein **3**), pourrait également jouer un rôle intéressant pour le nucléoïde (He *et al.*, 2012). En effet, il a été montré que cette protéine peut se fixer à la fois au ribosome mitochondrial, à l'ADNmt, mais aussi à la membrane interne. Il a ainsi été proposé que ce facteur pourrait permettre le regroupement du nucléoïde et de l'appareil traductionnel à proximité de la membrane interne, afin de favoriser l'intégration des protéines nouvellement synthétisées dans les complexes de la chaîne respiratoire. L'ensemble de ces données suggèrent ainsi que davantage qu'une simple compaction de l'ADNmt, le nucléoïde pourrait avant tout permettre la coordination des processus de réplication, transcription et traduction de ce génome.

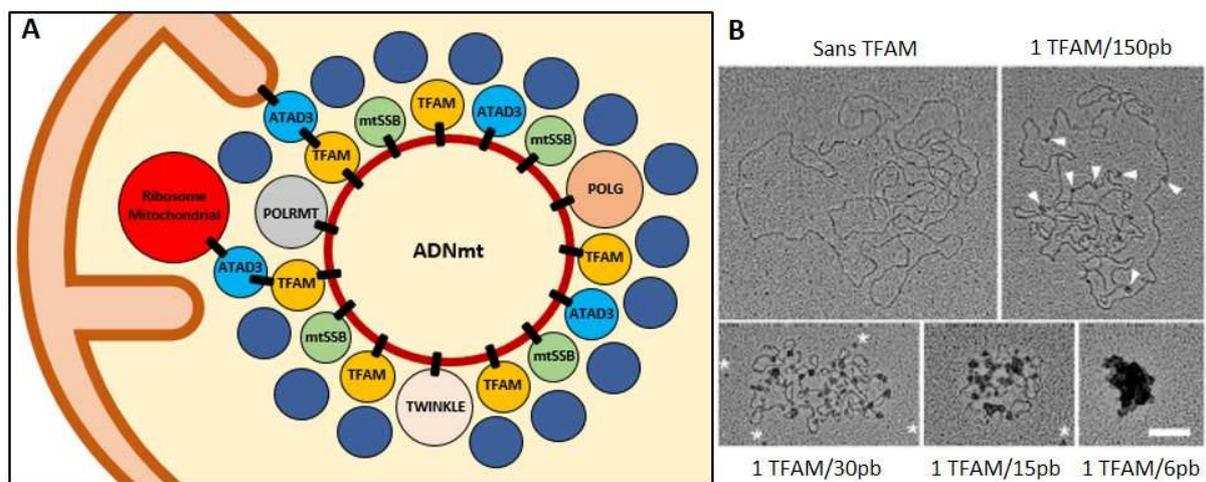


Figure 7. Le nucléoïde mitochondrial.

(A) Représentation schématique des interactions au sein du nucléoïde mitochondrial. Les facteurs de la réplication mtSSB (en vert), POLG (en brun), et de la transcription TFAM (en jaune) et POLRMT (en gris) sont liés de façon directe à l'ADNmt. Des facteurs périphériques (en bleu foncé) n'interagissent pas directement avec l'ADNmt mais se lient au nucléoïde grâce à des interactions protéine-protéine. La protéine ATAD3 (en bleu ciel) s'associe avec l'ADNmt, le mitoribosome et la membrane interne. Les interactions protéine-protéine et protéine-ADN sont représentées par des rectangles noirs. Adaptée de (Gilkerson *et al.*, 2013).

(B) Photographies de microscopie électronique d'ADNmt de souris observé en présence de concentrations croissantes de protéine TFAM. Les flèches blanches désignent des protéines TFAM associées à l'ADN. Les astérisques blancs désignent des protéines TFAM non liées à l'ADN. Adaptée de (Kukat *et al.*, 2015).

4. La transcription de l'ADN mitochondrial

La transcription de l'ADNmt qui débute au niveau des séquences promotrices situées dans la région de contrôle, mène à la production de trois ARN polycistroniques. Ainsi, La transcription du brin L, initiée au niveau du promoteur LSP (**L**ight **S**trand **P**romoter) permet l'obtention d'un ARN qui contient huit ARNt et l'ARNm ND6. La transcription du brin H peut quant à elle être initiée au niveau de deux promoteurs distincts nommés HSP1 et HSP2 (**H**eavy **S**trand **P**romoter) (Montoya *et al.*, 1982). HSP2, situé à proximité de l'extrémité 5' du gène de l'ARNr 12S permet la production d'un long ARN polycistronique qui correspond à la quasi-totalité du brin H. HSP1, un promoteur plus fort que HSP2, est lui situé en amont du gène de l'ARNt^{Phe}, c'est-à-dire environ 100pb en amont de HSP2, et produit un transcrit qui contient l'ARNt^{Phe}, l'ARNr 12S, l'ARNt^{Val} pour se terminer à l'extrémité de l'ARNr 16S (Montoya, Gaines and Attardi, 1983). L'existence de ce promoteur HSP1 a notamment été révélée par le fait que les ARNr 12S et 16S sont présents en quantité 50 fois plus élevée que les ARNm portés par le même brin.

Après transcription, ces ARN polycistroniques vont subir un processus de maturation qui mènera aux ARNt, ARNr et ARNm individualisés. La présence d'ARNt flanquant au moins une extrémité des ARNr et ARNm a permis la description d'un modèle nommé « tRNA punctuation model » (Ojala, Montoya and Attardi, 1981) où les ARNr et ARNm matures sont obtenus par excision des ARNt grâce à la RNase P (Rossmann *et al.*, 1995) en 5' et à l'isoforme mitochondriale de la RNase Z, ELAC2, en 3' (Brzezniak *et al.*, 2011). Tous les ARNm mitochondriaux, à l'exception de MT-ND6, sont ensuite maturés par une **Poly-A Polymerase (mt-PAP)** (Tomecki *et al.*, 2004). Ce processus introduit une extension poly-A qui permet de compléter le codon stop UAA dans 7 des transcrits. En revanche cette polyadénylation n'a pas toujours le même rôle sur la stabilité des ARNm mitochondriaux puisqu'elle entraîne soit une augmentation, soit une diminution de leur demi-vie.

La transcription de l'ADNmt est accomplie par l'ARN polymérase mitochondriale (POLRMT), enzyme monomérique d'une masse de 120 kDa qui présente une forte similarité avec la partie C-terminale des ARN polymérases retrouvées chez les bactériophages T3 et T7 (Tiranti *et al.*, 1997). Elle possède une extension N-terminale dont la fonction n'est pas encore bien élucidée, mais qui contient un motif PPR (**P**entatr**ic**o**P**eptide **R**epeat) que l'on peut

notamment retrouver chez les plantes dans des protéines impliquées dans la maturation des ARN et dans leur traduction.

Pour initier la transcription, POLRMT requiert la présence des facteurs de transcription TFAM et TFB2M (Falkenberg *et al.*, 2002). En effet, POLRMT en complexe avec TFB2M ne peut pas initier la transcription sans TFAM. Le rôle de TFAM pourrait ainsi être d'induire un changement de conformation de l'ADN au niveau de ses sites de fixation, en amont des promoteurs HSP et LSP, facilitant alors l'initiation de la transcription. La fixation spécifique de TFAM, qui induit un changement de conformation drastique de l'ADN, permet le recrutement de POLRMT. La formation de ce complexe de pré-initiation permet à son tour le recrutement de TFB2M permettant la fusion de l'ADN au niveau du promoteur et l'initiation de la synthèse d'ARN. Enfin, quand le complexe entre dans sa phase d'élongation, TFB2M se sépare du complexe.

Il y a 3 ARN polycistroniques, mais seul l'ARN transcrit depuis HSP1 possède un site de terminaison de la transcription que l'on pensait bien établi, localisé à l'extrémité du gène encodant l'ARNr 16S. L'arrêt de la transcription initiée au niveau de HSP1 serait ainsi médié par la protéine mTERF1 qui se lie à une séquence située dans le gène de l'ARNt^{Leu(UUR)}, comme cela a été montré *in vitro* (Kruse, Narasimhan and Attardi, 1989). Cependant, des études réalisées sur des souris où l'expression de mTERF1 a été supprimée, suggèrent plutôt que la fonction principale de cette protéine est d'arrêter la transcription du brin L pour qu'elle ne se poursuive pas plus loin et n'entraîne pas d'interférence au niveau du promoteur LSP (Terzioglu *et al.*, 2013). De façon similaire, le site de terminaison pour le transcrit HSP2 serait le petit domaine TAS qui empêcherait la poursuite de la transcription du brin H jusqu'au promoteurs HSP, pour ne pas interférer avec l'initiation de la transcription au niveau de ceux-ci (Freyer *et al.*, 2010).

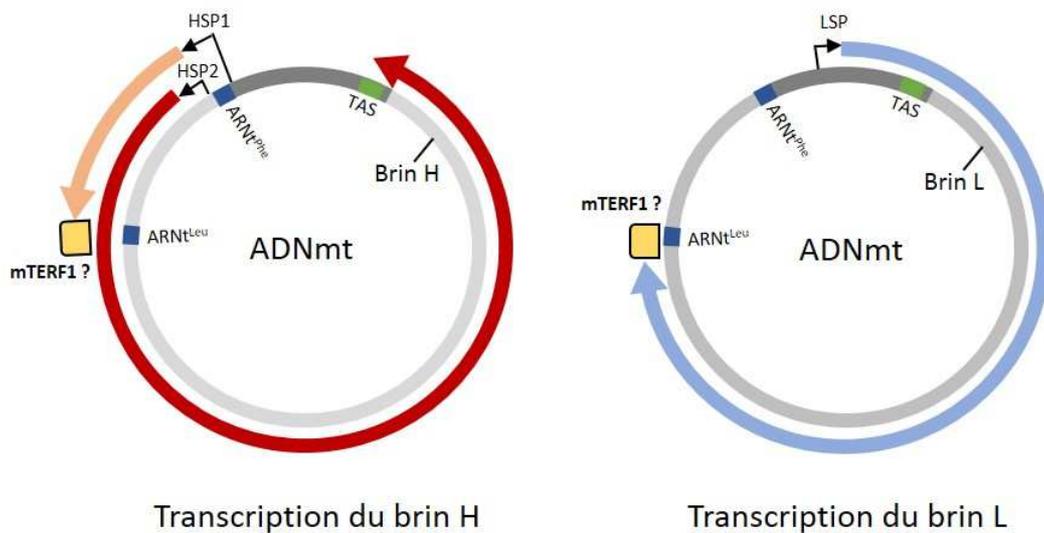


Figure 8. La transcription de l'ADNmt humain.

A gauche, la transcription du brin H depuis les promoteurs HSP1 et HSP2. Le site d'arrêt de la transcription initiée au niveau de HSP1 est localisé dans le gène de l'ARNt^{Leu(UUR)} et cet arrêt pourrait être médié par la fixation de la protéine mTERF1. L'arrêt de la transcription initiée au niveau de HSP2 est réalisé au niveau de la séquence TAS. A droite, le rôle de mTERF1 pourrait être d'arrêter la transcription du brin L initiée au niveau du promoteur LSP.

5. La synthèse protéique au sein de la mitochondrie

L'acteur majeur de la synthèse protéique au sein des mitochondries de mammifère est un mitoribosome, qui sédimente à 55S, et qui est composé d'une grande (mt-LSU) et d'une petite (mt-SSU) sous-unité. La sortie récente des structures des mitoribosomes porcins (Greber *et al.*, 2015) et humains (Amunts *et al.*, 2015) obtenues par cryo-microscopie électronique ont permis une analyse détaillée de leur structure et de leur composition (**Tableau 1**). Ainsi, alors que le ribosome bactérien est composé en majorité d'ARN (ratio 70/30 en ARN/protéine), le mitoribosome a inversé ce ratio, ce qui est à la fois le résultat de la suppression de domaines d'ARNr et d'une augmentation globale de la masse protéique. Ces protéines sont d'ailleurs retrouvées principalement en périphérie du mitoribosome, ce qui permet notamment de suggérer leur rôle dans la protection des ARNr. De façon similaire à la plupart des ribosomes, les sites fonctionnels A-, P- et E- peuvent être identifiés dans le mitoribosome.

Chez l'Homme, la mt-SSU est composée de l'ARNr 12S et de 30 protéines. De façon concordante avec l'absence de région 5'UTR (**UnTranslated Region**) sur les ARNm mitochondriaux, l'ARNr 12S ne porte pas de séquence anti-Shine-Dalgarno. La mt-LSU est quant à elle composée de l'ARNr 16S, de 53 protéines et d'un autre ARN dont la nature a longtemps été l'objet de débats sur lesquels nous reviendrons plus tard en évoquant l'ARNr 5S. Les dernières études ont cependant permis de confirmer l'identité de cet ARN, puisque l'ARNt^{Phe} dans le mitoribosome porcin (Greber *et al.*, 2015) et l'ARNt^{Val} dans le mitoribosome humain (Amunts *et al.*, 2015) ont pu y être décrits. Nous pouvons d'ailleurs remarquer qu'au sein du génome mitochondrial, ces deux ARNt flanquent les ARNr et sont transcrits avec eux en un long ARN polycistronique, ce qui pourrait en partie expliquer leur présence au sein du mitoribosome. De façon très surprenante, il a de plus été récemment démontré que lorsque la quantité d'un de ces deux ARNt est affectée, le mitoribosome peut incorporer l'autre ARNt à sa place (Rorbach *et al.*, 2016). La fonction de cet ARNt au sein du mitoribosome est cependant toujours inconnue.

	Ribosome bactérien (<i>Escherichia coli</i>)	Ribosome porcin (<i>Sus scrofa</i>)	Ribosome humain
Coefficient de sédimentation	70S	55S	55S
Ration ARN:Protéines	2:1	1:2	1:2
mt-SSU	30S	28S	28S
ARN	ARNr 16S	ARNr 12S	ARNr 12S
Protéines	21	30 (15 mt-spécifiques)	30 (14 mt-spécifiques)
mt-LSU	50S	39S	39S
ARN	ARNr 23S + ARNr 5S	ARNr 16S + ARNt ^{Phe}	ARNr 16S + ARNt ^{Val}
Protéines	34	≈52 (22 mt-spécifiques)	≈53 (≈23 mt-spécifiques)

Tableau 1. Comparaison du ribosome bactérien et des mitoribosomes porcin et humain.

Mt-SSU, petite sous-unité mitochondriale ; mt-LSU, grande sous-unité mitochondriale. Adapté de (Mai, Chrzanowska-Lightowlers and Lightowlers, 2017).

Les 9 ARNm monocistroniques ainsi que les 2 ARNm dicistroniques sont traduits par le mitoribosome dans un processus qui peut être divisé en 4 étapes très similaires à ce qui a lieu dans le cytosol : initiation, élongation, terminaison et recyclage (Mai, Chrzanowska-

Lightowers and Lightowers, 2017). En revanche, les ARNm mitochondriaux ont un usage des codons différent du code génétique universel (**Tableau 2**). Par exemple, chez les mammifères, alors que le codon UGA détermine une terminaison de traduction au niveau du cytosol, ce codon correspond au tryptophane dans le code génétique mitochondrial. Le codon AUA y est quant à lui reconnu comme une méthionine tandis que les codons AGA et AGU, qui sont reconnus par des ARNt^{Arg} au niveau du ribosome cytosolique, ne sont pas reconnus par des ARNt mitochondriaux.

Codon	Code génétique universel	Code génétique mitochondrial
UGA	STOP	Trp
AUA	Ile	Met
AGA	Arg	STOP
AGU	Arg	STOP

Tableau 2. Différences entre le code génétique dit « universel » et le code génétique mitochondrial.

6. La réplication de l'ADNmt

La réplication fidèle du génome mitochondrial est un processus fondamental pour assurer la production d'énergie dans l'ensemble des cellules de l'organisme. Néanmoins, bien qu'ayant été étudié depuis de nombreuses années et très largement documenté, le mécanisme qui gouverne cette réplication n'est toujours pas bien élucidé.

6.1. Le réplisome mitochondrial

De nombreux acteurs de ce processus ont pourtant été clairement identifiés et décrits. Ainsi, une machinerie basale de réplication de l'ADNmt a pu être reconstituée *in vitro* en utilisant seulement 5 protéines recombinantes (Korhonen *et al.*, 2004) : la sous-unité catalytique de l'ADN polymérase γ (POL γ A), sa sous-unité processive (POL γ B), l'hélicase TWINKLE, la protéine de liaison à l'ADN simple brin mtSSB et l'ARN polymérase POLRMT (**Figure 9**).

L'ADN polymérase γ est un hétérotrimère asymétrique de 245 kDa comprenant 2 sous-unités accessoires POL γ B et une sous-unité catalytique POL γ A (Yakubovskaya *et al.*, 2006).

Cette sous-unité catalytique porte une activité polymérase permettant la synthèse d'ADN, mais aussi une activité 3'-5' exonucléase pour corriger les erreurs pendant la réplication. La sous-unité POL γ B agit quant à elle comme un facteur de processivité, augmentant la vitesse de polymérisation de l'ADN polymérase γ ainsi que l'affinité de la sous-unité catalytique pour l'ADN double-brin.

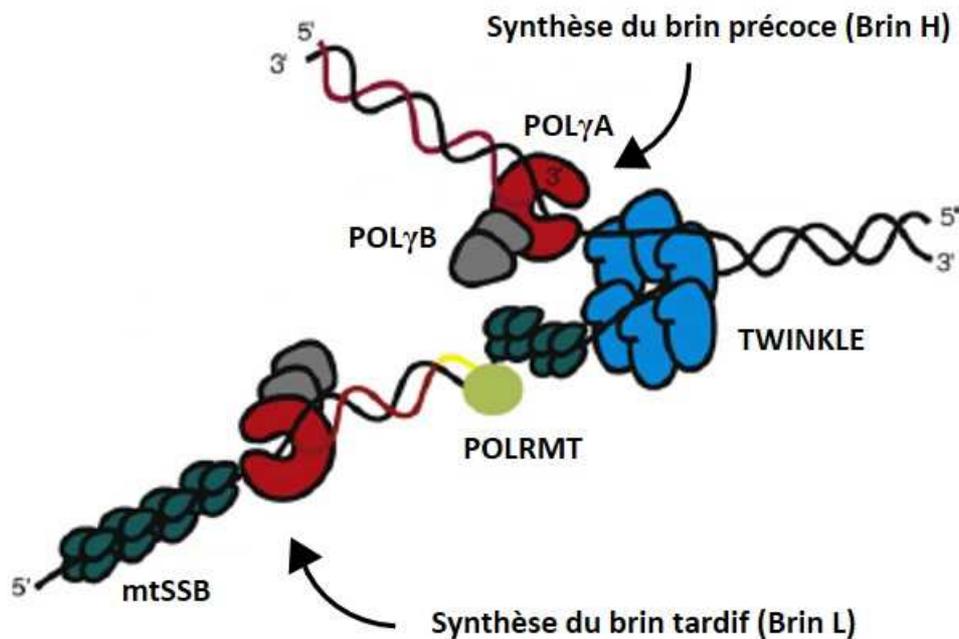


Figure 9. Le réplisome mitochondrial minimal.

Représentation schématique du réplisome mitochondrial minimal qui se compose de la sous-unité catalytique POL γ A (en rouge), des sous-unités accessoires POL γ B, de l'hélicase TWINKLE (en bleu), de l'ARN polymérase POLRMT (en vert clair) et des protéines mtSSB (en vert foncé). Adapté de (Wanrooij and Falkenberg, 2010).

TWINKLE est l'hélicase mitochondriale qui déroule l'ADN double brin dans le sens 5'-3' et dont l'activité est essentielle *in vivo* (Wanrooij *et al.*, 2007). Formant des hexa- ou des heptamères, sa multimérisation est dépendante d'une petite région faisant le lien entre les domaines N- et C-terminaux de cette protéine. Les mutations au sein du gène permettant l'expression de TWINKLE sont une source très importante de maladies mitochondriales, car elles mènent souvent à l'accumulation de délétions au sein de l'ADNmt ou à des déplétions de ce génome. Plus de 30 mutations pathogéniques de ce gène ont ainsi été décrites à ce jour, confirmant le rôle essentiel de cette protéine dans la réplication de l'ADNmt.

Les protéines mtSSB jouent également un rôle clé dans le métabolisme de l'ADNmt car elles empêchent le repliement de l'ADN simple brin et elles le protègent des attaques nucléolytiques. La structure cristallographique de ces protéines a permis de démontrer que l'ADNmt simple brin s'enroule autour d'un tétramère de protéines mtSSB (Yang *et al.*, 1997). La présence de ces protéines augmente la capacité de reconnaissance des amorces et la processivité de POLy et stimule l'activité hélicase de TWINKLE, favorisant ainsi la synthèse d'ADNmt.

Enfin, POLRMT est non seulement requise pour la transcription de l'ADNmt, mais permet également la synthèse des amorces ARN qui sont utilisées pour initier la synthèse d'ADN au niveau des origines de réplication (Wanrooij *et al.*, 2008). La synthèse du brin H au niveau de l'origine de réplication O_H est ainsi initiée par une amorce d'environ 100 nt formée par transcription depuis le promoteur LSP. La synthèse d'ADN par la POLy prend ensuite le relais environ 5 à 10 nt en aval de CSBII. La synthèse du brin H permettra plus tard la libération d'une région non codante d'environ 30 nt qui contient le site d'initiation de la réplication du brin L, O_L . Ce site qui se retrouve alors sous sa forme simple brin, adopte une conformation en tige-boucle, reconnue par POLRMT qui synthétise une amorce ARN au niveau de la boucle de cette structure (Wanrooij and Falkenberg, 2010). Cette amorce est ensuite utilisée pour initier la réplication du brin L, un site de transition ARN-ADN ayant été identifié à la base de la tige de cette structure.

Ces cinq protéines forment le réplisome minimal, mais bien sûr d'autres protéines semblent jouer un rôle important dans la réplication de l'ADNmt comme la RNase H1 (Cerritelli *et al.*, 2016), la DNA ligase III ou encore des topoisomérases (Sobek and Boege, 2014).

6.2. Mécanisme de réplication de l'ADN mitochondrial

Bien que les acteurs gouvernant la réplication de l'ADNmt aient été bien identifiés et décrits, le mécanisme exact par lequel celle-ci est accompli fait toujours l'objet d'intenses débats puisqu'à ce jour, trois modèles ont été proposés.

Le modèle de réplication asynchrone ou par déplacement de brin

Pendant plusieurs décennies, on considérait ainsi que la réplication de l'ADNmt suivait un modèle par déplacement de brin (**Strand-Displacement Model, SDM**) (**Figure 10**). Ce premier modèle, proposé en 1972 (Robberson and Clayton, 1972), est basé sur des

observations par microscopie électronique de l'ADNmt purifié sur gradient de chlorure de césium, qui montrait que toutes les molécules d'ADNmt présentaient une région simple brin. Selon ce modèle, la synthèse du brin précoce H est initiée depuis une amorce synthétisée par POLRMT. La fourche de réplication va ainsi débiter la synthèse par extension de cette amorce en progressant de façon unidirectionnelle en déplaçant le brin H parent qui sera alors protégé par les protéines mtSSB (Miralles Fuste *et al.*, 2014). Ces protéines permettraient également d'empêcher la synthèse non spécifique d'amorces de réplication à partir de ce brin libre. La fourche de réplication progresse alors jusqu'aux 2/3 de l'ADNmt et va libérer l'origine de réplication O_L. Cette origine se retrouvant alors sous forme simple brin, va pouvoir adopter une structure en tige-boucle qui empêche la fixation de protéines mtSSB et permet alors le recrutement de POLRMT. Cette ARN polymérase synthétise alors l'amorce permettant l'initiation de la synthèse du brin L. La POLy peut ensuite prendre le relai pour synthétiser la totalité du brin L.

Le modèle RITOLS

Plus tard, au début des années 2000, l'utilisation de l'électrophorèse bidimensionnelle sur gel d'agarose (2D-AGE) a permis de mettre en évidence des intermédiaires de réplication double-brin qui ne pouvaient pas être digérés par des enzymes de restriction (Holt, Lorimer and Jacobs, 2000). Ces duplex sont en revanche sensibles à l'action de la RNase H (Yang *et al.*, 2002), enzyme qui dégrade l'ARN dans les hybrides ADN/ARN. Ces observations ont ainsi mené à la proposition en 2006 d'un nouveau modèle nommé RITOLS (**R**NA **I**ncorporation **T**hrough**O**ut the **L**agging **S**trand) (**Figure 11**) (Yasukawa *et al.*, 2006). Très similaire au modèle SDM, il se distingue par le fait que le brin retardé serait recouvert initialement par de l'ARN avant que celui-ci ne soit converti en ADN. L'ARN aurait ainsi ici pour rôle de protéger l'ADN simple brin et remplacerait alors les protéines mtSSB. La source de ces ARN n'a toujours pas été établie, mais deux modèles ont été proposés : l'ARN pourrait ainsi être produit par une primase « exhubérante » qui synthétise de très longues amorces ARN, ou bien ces ARN seraient des transcrits s'hybridant avec le brin retardé (c'est le modèle « bootlace ») (Yasukawa *et al.*, 2006).

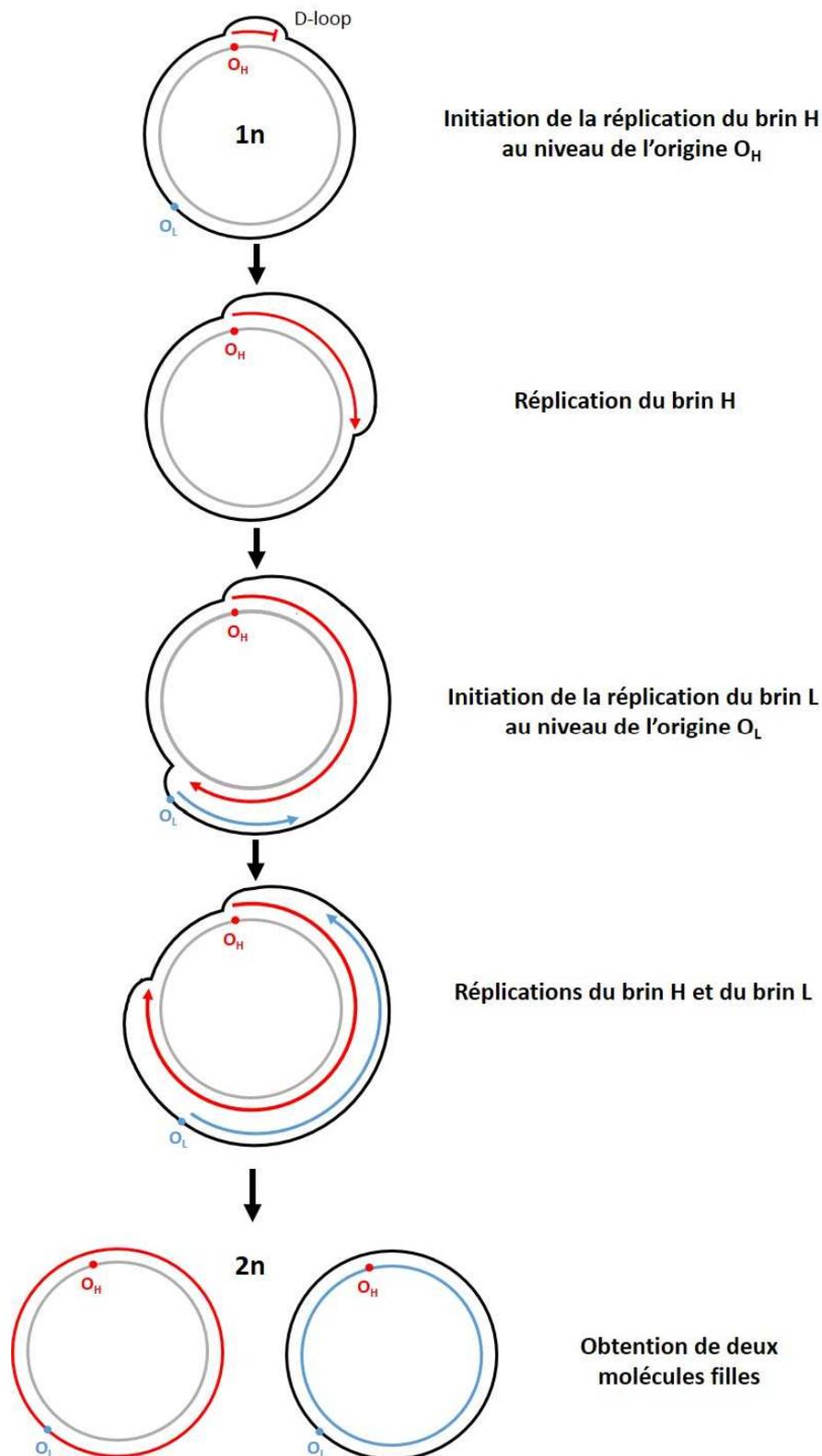


Figure 10. Le modèle de réplication asynchrone ou par déplacement de brin (SDM).

Modèle de réplication asynchrone, unidirectionnel et asymétrique proposé par Clayton en 1972. En noir, le brin H parent ; en gris, le brin L parent ; en rouge, le brin H néosynthétisé et en bleu, le brin L néosynthétisé. Adapté de (Wanrooij and Falkenberg, 2010).

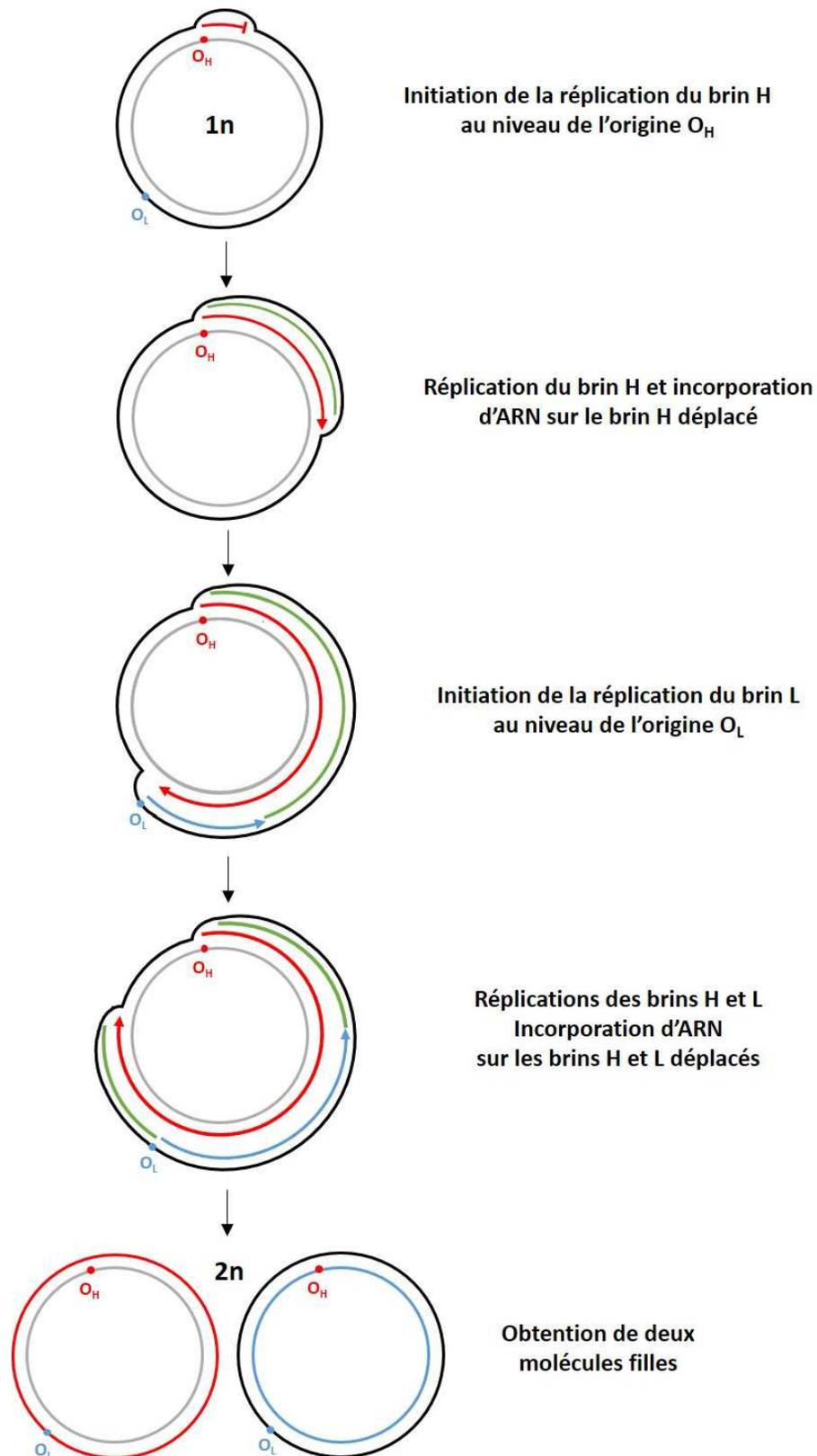


Figure 11. Le modèle de réplication RITOLS.

Modèle de réplication RITOLS proposé dans (Yasukawa *et al.*, 2006). En noir, le brin H parent ; en gris, le brin L parent ; en vert, l'ARN incorporé en cours de réplication ; en rouge, le brin H néosynthétisé et en bleu, le brin L néosynthétisé. Adapté de (Wanrooij and Falkenberg, 2010).

Le modèle de répliation synchrone

Enfin, un troisième modèle fit son apparition au début des années 2000 avec l'apport de la technique 2D-AGE. Celui-ci propose une répliation synchrone des brins précoces et retardés grâce à la formation de fragments d'Okazaki (**Figure 12**). Ce modèle se base sur le fait qu'une proportion des intermédiaires de répliation de l'ADNmt sont retrouvés sous forme de duplex, et supporté par une étude de 2003 (Bowmaker *et al.*, 2003) qui suggère que la plupart des sites d'initiation de la répliation se trouvent dans une zone de plusieurs kilobases située en dehors de la NCR et nommée OriZ.

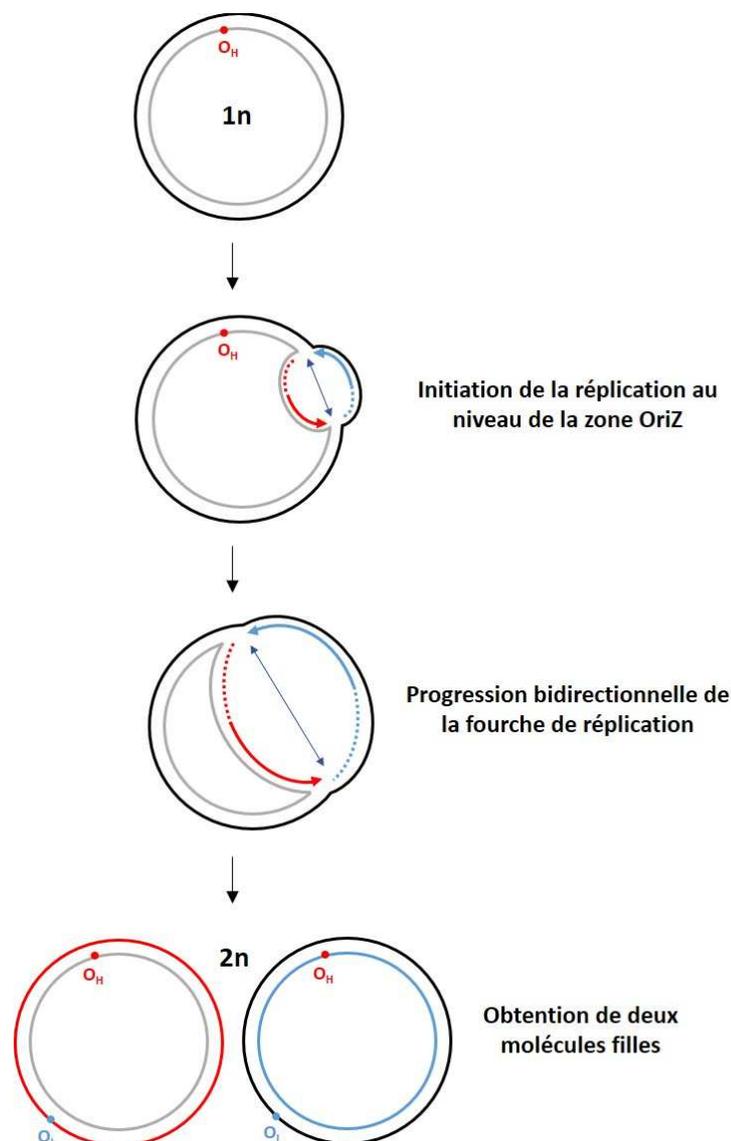


Figure 12. Le modèle de répliation synchrone bidirectionnel.

Modèle de répliation synchrone, bidirectionnel et symétrique proposé par Holt en 2000. En noir, le brin H parent ; en gris, le brin L parent ; en rouge, le brin H néosynthétisé ; en bleu, le brin L néosynthétisé ; en pointillés, les fragments d'Okazaki. Adapté de (Wanrooij and Falkenberg, 2010).

De nombreux éléments ayant été apportés en faveur des trois mécanismes présentés ici, l'hypothèse actuellement admise par une partie de la communauté scientifique énonce que ces mécanismes existeraient tous trois mais seraient dépendants du type cellulaire ou du métabolisme de la cellule (Pohjoismäki *et al.*, 2006). Ainsi, la réplication de type RITOLS correspondant à un mécanisme non synchrone surviendrait en situation physiologique, tandis que la réplication synchrone pourrait avoir lieu en conditions de stress qui nécessitent alors une synthèse d'ADN plus rapide.

6.3. Régulation de la réplication de l'ADN mitochondrial

La région de contrôle NCR est une zone critique de régulation de la réplication de l'ADNmt et de son expression. En effet, c'est un évènement de transcription qui s'arrête prématurément environ 120 pb en aval de LSP dans la région riche en guanine appelée CSBII (Conserved Sequence Block II) située à proximité de O_H, qui permet la génération d'une amorce de réplication. Cet arrêt de transcription serait le résultat de la formation d'un hybride G-quadruplex entre l'ARN naissant et le brin d'ADN non matrice. En revanche, pour poursuivre la transcription, un nouveau facteur de transcription intervient : TEFM (Transcription Elongation Factor, Mitochondrial) (Agaronyan *et al.*, 2015). En présence de ce facteur, POLRMT peut en effet transcrire efficacement à travers CSBII. Il agit ainsi comme un facteur qui empêche l'arrêt de la transcription, ce qui serait accompli par l'intermédiaire de l'interaction de TEFM avec l'ARN naissant et la partie C-terminale de POLRMT.

La transcription et la réplication seraient ainsi des processus mutuellement exclusifs (**Figure 13**). Quand TEFM est absent, la transcription débute au niveau de LSP mais s'arrête au niveau de CSBII, ce qui produit une amorce de réplication de 120 nt au niveau de O_H. Cette amorce est utilisée par le réplisome pour répliquer le brin H tandis qu'un autre évènement d'initiation par POLRMT est réalisé au niveau de O_L. A cause de sa faible processivité, la transcription depuis HSP ne produit pas un transcrit complet. Quand TEFM est présent, celui-ci permet la transcription complète depuis HSP. Au même moment, la transcription depuis LSP n'est pas stoppée au niveau de CSBII et peut avoir lieu jusqu'au site de terminaison qui semble dépendre de mTERF1.

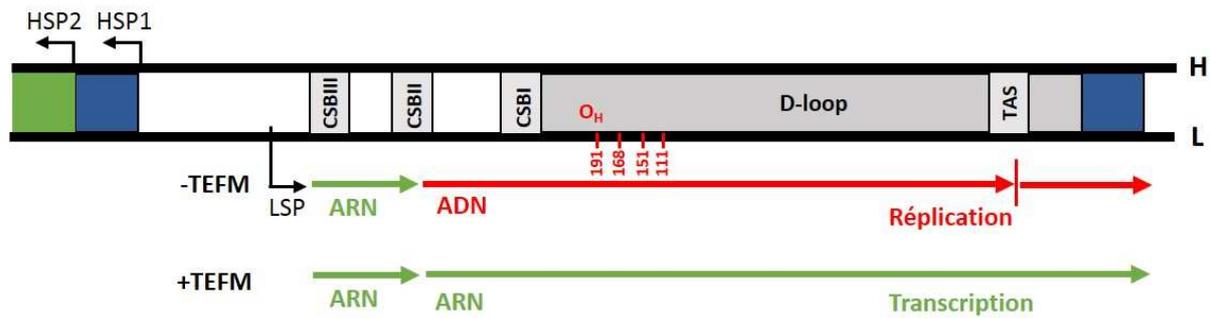


Figure 13. La transition Réplication/Transcription au niveau de la NCR.

En absence du facteur TEFM, l'initiation de la transcription depuis le promoteur LSP s'arrête au niveau de la région CSBII. L'ARN synthétisé est utilisé comme amorce pour initier la réplication du brin H à partir de l'origine O_H. Lorsque TEFM est présent, la transcription depuis le promoteur LSP peut se poursuivre afin de produire un long transcrite polycistronique correspondant au brin L de l'ADNmt. Adapté de (Falkenberg, Larsson and Gustafsson, 2007).

De plus, chez les mammifères, dans les conditions normales, la plupart des évènements d'initiation de la réplication du brin H (environ 95%) s'arrêtent environ 600 pb en aval de O_H. Le brin synthétisé, nommé ADN 7S, reste hybridé de façon stable au brin matrice formant ainsi une structure triple brin avec un brin H déplacé, connue sous le nom de D-loop (Displacement-loop) (Arnberg *et al.*, 1971). La fonction exacte de cette structure n'a toujours pas été élucidée, mais elle semble essentielle dans le processus de réplication de l'ADNmt.

Enfin, très récemment, il a été démontré que de nombreuses molécules d'ADNmt contiennent un ARN au niveau de la NCR. Cet ARN, similaire dans sa taille et sa localisation à la D-loop, est complémentaire à l'ADN 7S, et forme une structure au niveau de cette région, nommée R-loop. Une étude récente a ainsi montré que des mutations dans la Ribonucléase H1 conduisent à un niveau réduit de cet ARN. Cette quantité réduite d'ARN est associée à une agrégation d'ADNmt suggérant ainsi un rôle de cette R-loop dans l'organisation de l'ADNmt et sa ségrégation (Akman *et al.*, 2016).

7. Réparation de l'ADN mitochondrial

L'ADNmt présente un taux de mutagenèse qui serait environ 10 à 20 fois plus élevé que l'ADN nucléaire (Tuppen *et al.*, 2010). Plusieurs explications ont été avancées pour justifier ce taux de mutagenèse élevé comme l'environnement de l'ADNmt et notamment la présence d'une grande quantité de radicaux libres à cause de la chaîne respiratoire ou encore

l'absence d'histones pour protéger l'ADNmt. Une troisième explication repose quant à elle sur une faible efficacité des systèmes de réparation de l'ADNmt. Ceci était notamment supporté par le fait que les mitochondries sont incapables de réparer des dimères de pyrimidines induits par les UV ou des dommages causés par des alkylations (Miyaki, Kazuko and Ono, 1977). Cependant, cette vue a quelque peu changé au fil des années car plusieurs études ont proposé l'existence de presque toutes les voies majeures de réparation de l'ADN au sein des mitochondries.

7.1. BER : Réparation par excision de base

La voie de réparation de l'ADNmt prédominante et la mieux caractérisée est la voie de réparation par excision de base BER (**B**ase **E**xcision **R**epair). BER est la voie de choix pour la réparation des lésions oxydatives de l'ADN et sa présence dans la mitochondrie est donc tout à fait logique si l'on considère la proximité de l'ADNmt avec la chaîne respiratoire, source majeure des ROS. En fait, la 8-oxodG, la lésion oxydative de l'ADN prédominante, est même réparée de façon plus efficace dans la mitochondrie que dans le noyau (Thorslund *et al.*, 2002). Deux mécanismes peuvent ainsi y être retrouvés : le short-patch BER (SP-BER) et le long-patch BER (LP-BER). Ces mécanismes peuvent être décrits en 4 étapes : 1) excision de la base endommagée et clivage du brin au niveau du site abasique, 2) Réparation des extrémités d'ADN, 3) Synthèse d'ADN pour combler l'espace et 4) Ligation (**Figure 14**). Le SP-BER est ainsi utilisé quand la suppression du nucléotide endommagé est accompagnée par la génération d'une extrémité 3'OH libre d'un côté et d'une extrémité 5'P de l'autre. Cependant, l'excision du nucléotide crée souvent une extrémité 5' qui ne peut pas être utilisée pour la ligation et dans ce cas, c'est le LP-BER qui est utilisé.

La première étape du BER consiste en la reconnaissance de la base endommagée par des ADN glycosylases, celle-ci étant facilitée lorsque la lésion de l'ADN altère l'architecture de la double hélice. Plusieurs ADN glycosylases sont disponibles dans les mitochondries, monofonctionnelles ou bifonctionnelles, chacune reconnaissant un type de lésion de l'ADN. Ces enzymes vont ainsi enlever la base endommagée en créant un site apurique ou apyrimidique, puis cliver le brin d'ADN en 3' de ce site. Chaque lésion, et donc chaque enzyme, générera des extrémités d'ADN variables, qui ne seront pas forcément 5'P et 3'OH. La seconde étape fait donc appel à des enzymes qui pourront modifier ces extrémités afin de permettre les dernières étapes de polymérisation et de ligation. Après polymérisation pour remplacer le

nucléotide manquant par la POL γ , l'ADN ligase III va pouvoir finalement lier les deux extrémités d'ADN.

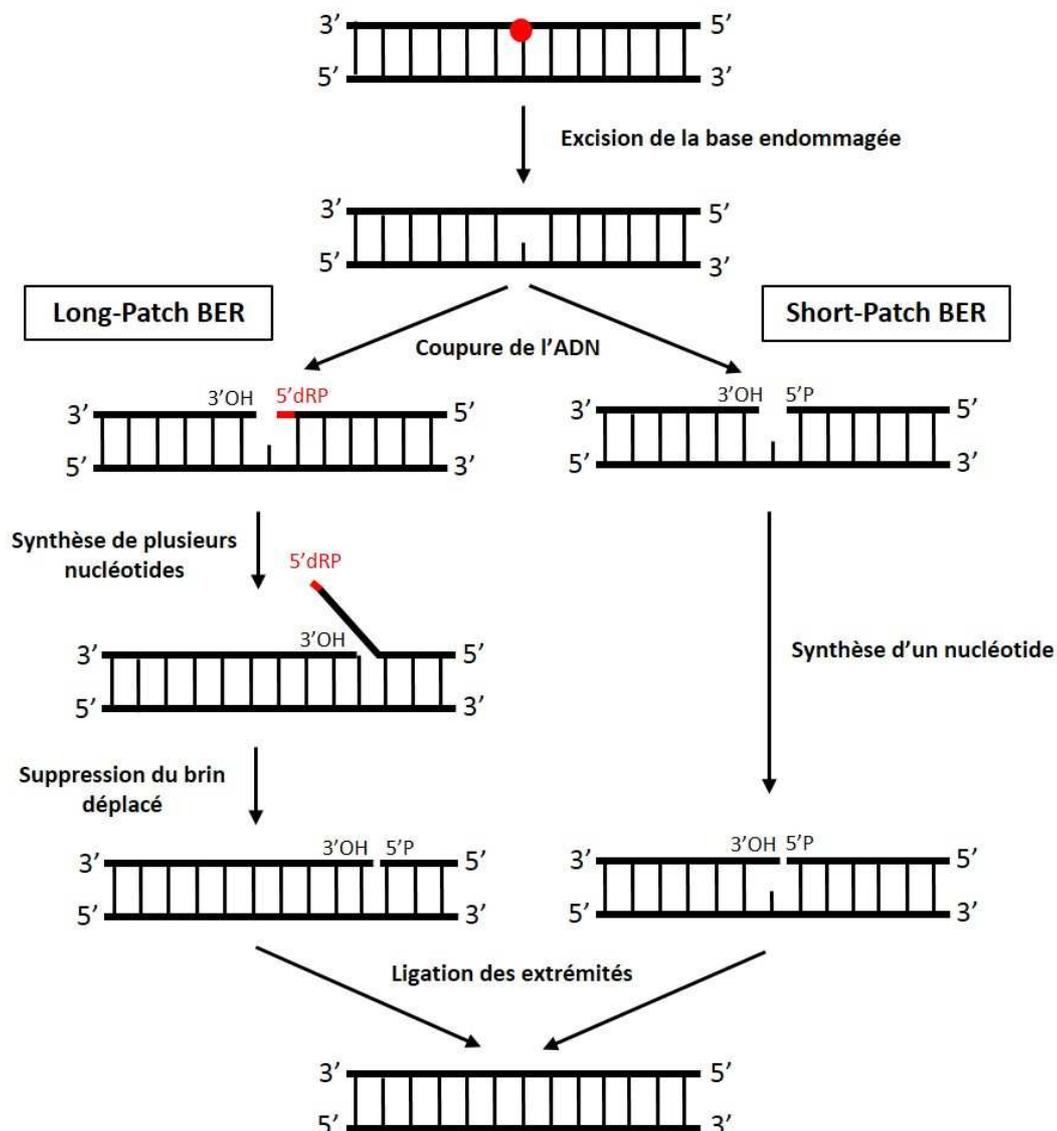


Figure 14. Les étapes principales de la voie de réparation par excision de base (BER).

La base endommagée (en rouge) est reconnue par des ADN glycosylases qui vont pouvoir l'exciser, créant alors un site apurique ou apyrimidique, puis cliver l'ADN. Deux voies sont alors possibles. Si l'excision de la base génère des extrémités 3'OH et 5'P correctes, l'ADN polymérase γ n'aura à synthétiser qu'un seul nucléotide, c'est le Short-Patch BER. Si l'excision de la base génère une extrémité 5' altérée (en rouge, 5'dRP = 5' déoxyribosephosphate), l'ADN polymérase γ va synthétiser plusieurs nucléotides en déplaçant le brin d'ADN altéré qui sera par la suite supprimé, c'est le Long-Patch BER. Les extrémités 3'OH et 5'P correctes peuvent alors être liguées grâce à l'ADN ligase III.

On peut également noter qu'une voie de réparation des mésappariements MMR a également été détectée dans des lysats mitochondriaux de rats et dans différentes lignées cellulaires (Mason *et al.*, 2003). Une étude a ainsi démontré que les mismatch dans la mitochondrie sont reconnus par la protéine YB1 (Y-box binding protein 1), qui est localisée à la fois dans le noyau et dans la mitochondrie où elle permettrait le recrutement des complexes MMR dont la composition n'est pas encore connue, afin d'initier la réparation. Il reste donc beaucoup à découvrir sur cette voie de réparation dans les mitochondries.

7.2. SSBR : Réparation des cassures simple brin de l'ADN

Des cassures de l'ADNmt peuvent avoir lieu suite à l'exposition à des sources endogènes ou exogènes. L'ADN simple brin étant très sensible aux attaques de nucléases ou aux processus d'hydrolyse spontanée, la cellule a développé des mécanismes de réparation des cassures simple brin de l'ADN.

En termes de réparation, le SSBR est très similaire au système BER et il partage avec lui plusieurs de ses étapes : la réparation des extrémités d'ADN, la synthèse d'ADN ainsi que la ligation. C'est pourquoi il est souvent considéré comme une sous-étape du BER (Kazak, Reyes and Holt, 2012). En effet, la plupart des cassures simple brin peuvent être réparées par des enzymes impliquées dans le BER : APE1, PNKP et la polymérase gamma. Mais il existe aussi certains cas où les étapes du BER ne sont pas nécessaires. Ces voies impliquent alors TDP1 (tyrosil-DNA phosphodiesterase 1) ou APTX (aprataxin) (Meagher and Lightowlers, 2014). Ainsi, un clivage simple brin de l'ADN peut être le résultat de l'action de la topoisomérase mitochondriale (TOP1MT) dans son rôle au cours de la réplication de l'ADNmt. Mais, il peut arriver que cette topoisomérase entre en conflit avec la POLRMT ou la POLy, ce qui résulte en une structure particulière où la topoisomérase peut se retrouver attachée de façon covalente à l'ADNmt. Celle-ci subira alors un clivage protéolytique. En revanche, une tyrosine va rester fixée à l'extrémité 3' de l'ADN. L'enzyme TDP1 intervient alors pour réparer cette lésion et rétablir une extrémité 3'OH correcte. Cette enzyme peut aussi réparer les extrémités 3'phosphoglycolate qui peuvent être induites par radiations ionisantes. D'autres lésions peuvent provoquer l'attachement covalent d'AMP à l'extrémité 5' de l'ADN. Dans ces cas particuliers, il a été montré que APTX peut restaurer l'extrémité 5'P correcte de l'ADN.

7.3. DSBR : Réparation des cassures double brin de l'ADN

Puisque les cassures double brin au sein de l'ADN nucléaire peuvent avoir des conséquences catastrophiques, la cellule a développé trois voies permettant de réparer ces lésions au sein du noyau : NHEJ (Non-Homologous End Joining), MMEJ (Microhomology Mediated End Joining) et HR (Homologous Recombination). Au sein des mitochondries de mammifère, en revanche, la présence de multiples copies d'ADNmt pourrait suggérer que cet organelle ne requière pas particulièrement de système de réparation pour ces lésions. Cependant, plusieurs études laissent à penser que la mitochondrie peut tout de même réparer les cassures double brin.

En effet, alors que la recombinaison homologue dans les mitochondries de levure est bien établie et utilisée pour la manipulation génétique de l'ADNmt dans ces organismes, elle apparaît comme étant un évènement très peu fréquent dans les mitochondries de mammifère. Une première étude a ainsi détecté des évènements de recombinaison homologue intramoléculaire mais seulement de façon très rare puisque leur détection n'a été faite que lorsque l'ADNmt a d'abord été déplété avec du bromure d'ethidium (D'Aurelio *et al.*, 2004). De tels évènements ont également été détectés dans des cellules en culture et dans des foies de souris après introduction d'une endonucléase de restriction coupant l'ADNmt (Bacman, Williams and Moraes, 2009). Dans ces expériences, la réparation des cassures double brin était accompagnée par la formation de délétions au sein de l'ADNmt, parmi lesquelles certaines avaient leur point de délétion flanqué de répétitions directes, ce qui pourrait alors impliquer de la recombinaison homologue (Srivastava and Moraes, 2005).

L'existence d'une voie de réparation des cassures double brin par NHEJ n'a été que très peu documentée. Les mitochondries de mammifères possèdent en effet une activité de liaison des extrémités de l'ADN puisque des extraits protéiques mitochondriaux peuvent lier des extrémités franches d'ADN bien qu'avec une très faible efficacité et une très faible précision comparée à des extrémités cohésives.

Très récemment, il a en revanche été suggéré que la voie majeure de réparation des cassures double brin au sein de la mitochondrie était le MMEJ. Dans cette étude, (Tadi *et al.*, 2016) décrivent qu'alors que la voie classique NHEJ est indétectable dans les mitochondries humaines, la voie MMEJ peut efficacement réparer ces lésions (**Figure 15**). Tout particulièrement, une réparation robuste par MMEJ a pu être observée pour des substrats

ADN portant des micro homologies de 5, 8, 10, 13, 16, 19 et 22 nucléotides avec une augmentation progressive de l'efficacité avec la taille croissante de l'homologie. La DNA ligase III serait impliquée dans la liaison finale des extrémités. Cette voie de réparation entraîne par contre de larges délétions de l'ADN et est dépendante de la position des microhomologies puisqu'en effet, si la microhomologie est positionnée à plus de 24 nt de la coupure, le MMEJ ne peut pas être réalisé.

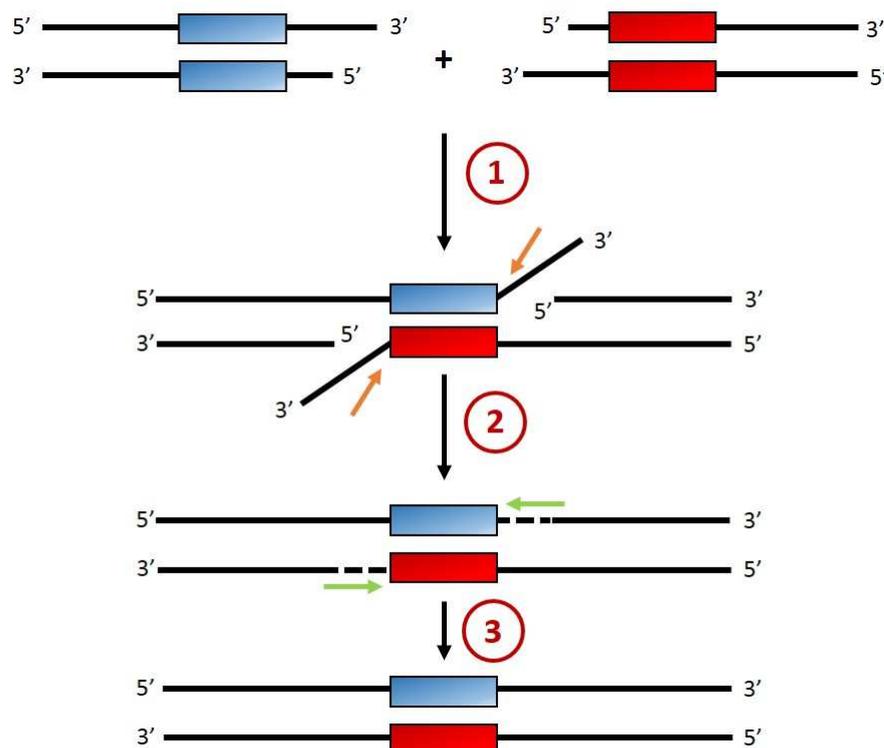


Figure 15. La voie de réparation par « Microhomology-mediated End Joining ».

Schéma du mécanisme proposé de MMEJ. Deux régions homologues situées à proximité d'une cassure double brin de l'ADN peuvent s'hybrider (rectangles rouge et bleu) (1). Les brins d'ADN situés en 3' de la région homologe seraient alors coupés (flèches orange) (2), les espaces générés comblés par de l'ADN (flèches vertes) et enfin les extrémités d'ADN sont liguées (3). Modifié de (Tadi *et al.*, 2016).

7.4. Elimination des ADN mitochondriaux endommagés

La mitochondrie semble donc être en capacité de réparer les lésions diverses qui peuvent affecter l'ADNmt. Néanmoins, il arrive que les systèmes de réparation mitochondriaux ne soient pas en mesure de réparer certaines lésions de l'ADNmt. Dans ce cas, il reste encore plusieurs options envisageables pour assurer la production d'énergie au sein de la cellule ou même encore dans le contexte global d'un tissu (**Figure 16**).

La première des options qui s'offre à la mitochondrie consiste en la dégradation pure et simple de l'ADNmt endommagé. En effet, comme celui-ci est présent en un grand nombre de copies au sein d'une même cellule, l'élimination des molécules qui pourraient être altérées, en particulier par des cassures simples ou doubles brins, peut, dans une certaine mesure, ne pas affecter le fonctionnement de la chaîne respiratoire. Ce rôle fut longtemps attribué à l'endonucléase G (EndoG), la nucléase la plus active et la plus abondante au sein de la mitochondrie (Ikeda and Ozaki, 1997), mais une étude récente suggère qu'aucune des cinq nucléases connues qui sont présentes dans les mitochondries ne sont impliquées dans ce processus (Moretton *et al.*, 2017). Des études supplémentaires devront donc permettre de décrire la voie par laquelle la mitochondrie élimine les molécules d'ADNmt endommagées.

Dans certains cas, les molécules endommagées qui ne sont pas réparées, s'accumulent au sein des mitochondries, ce qui altère la production d'énergie par le processus de phosphorylation oxydative. Pour maintenir un niveau de production d'énergie suffisant, la cellule a développé un système qui permet d'éliminer les mitochondries qui ne permettent pas de produire suffisamment d'énergie, c'est la mitophagie. Comme nous avons pu le voir précédemment, les mitochondries forment un réseau très dynamique qui s'étend dans toute la cellule et qui est régi par de nombreux événements de fusion et de fission. Une mitochondrie isolée, si elle n'est plus adaptée à une production d'énergie optimale, peut ainsi être éliminée par mitophagie dans un processus médié par les protéines Parkin et PINK1 (PTEN-induced kinase 1). En effet, lorsque le potentiel membranaire d'une mitochondrie est significativement réduit, PINK1 s'associe de façon stable à la membrane mitochondriale externe (Narendra *et al.*, 2010), où elle pourra recruter l'ubiquitine-ligase Parkin. L'ubiquitination de plusieurs protéines cibles permettra alors le recrutement de la machinerie d'autophagie et l'élimination de la mitochondrie altérée.

Enfin, une dernière voie bien plus drastique s'offre à la cellule si le nombre de mitochondries altérées devient trop important et que la production d'énergie n'est plus suffisante. Dans ce cas, la cellule entrera dans la voie de l'apoptose ou mort cellulaire programmée et sera éliminée par ce processus dont la mitochondrie est un acteur majeur.

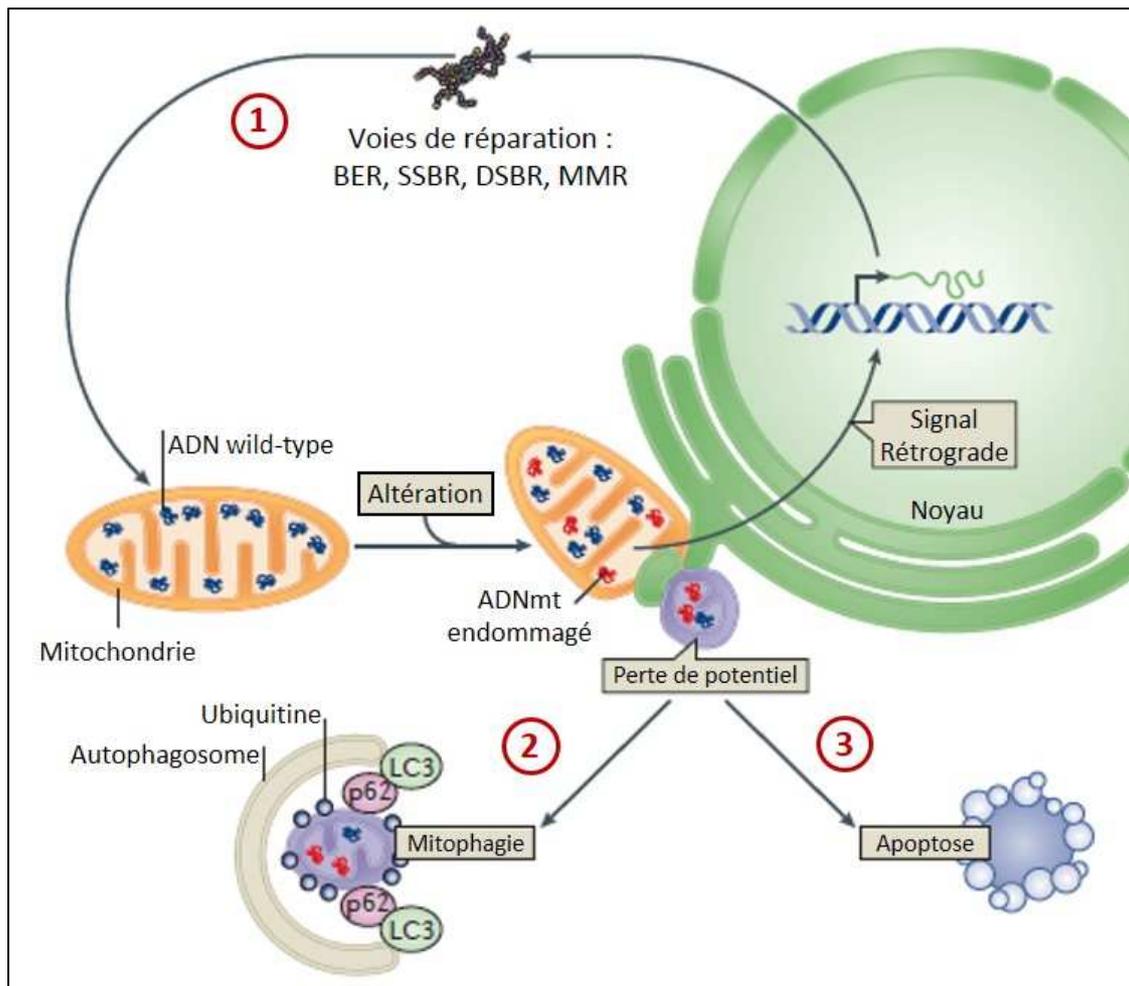


Figure 16. Maintenance de la cellule suite à un altération de l'ADNmt.

Lorsque l'ADNmt est endommagé, il peut être réparé grâce à l'existence de plusieurs voies de réparation mitochondriales exprimées depuis le génome nucléaire (1). Si le nombre de molécules d'ADNmt endommagées est trop important, la mitochondrie va perdre son potentiel membranaire, ce qui peut déclencher deux voies distinctes : si le nombre de mitochondries altérées est faible, celles-ci seront éliminées au cours du processus de mitophagie (2) ; si les dommages affectent un trop grand nombre de mitochondries, le processus de mort cellulaire programmé par apoptose sera enclenché. Adapté de (Kazak *et al.*, 2012).

II. L'import mitochondrial de macromolécules

Nous venons de voir que les mitochondries possèdent leur propre génome ainsi que tous les éléments nécessaires à son expression. Cependant, celui-ci contient un nombre très limité de gènes et chez l'Homme, il ne permet la production que de 13 protéines qui sont toutes des composants essentiels de la chaîne respiratoire et de l'ATP synthase. Pour fonctionner, la mitochondrie doit donc importer un très grand nombre de macromolécules depuis le cytosol. Je vais ainsi présenter ici dans un premier temps les mécanismes et les acteurs qui gouvernent l'import mitochondrial de protéines, puis je résumerai dans un second temps l'état de nos connaissances sur l'adressage mitochondrial d'ARN.

1. L'import mitochondrial de protéines

Alors que l'ADNmt humain ne permet que la production de 13 polypeptides, des analyses protéomiques ont permis de déterminer que les mitochondries humaines contiennent 1000 à 1500 protéines différentes (Lopez *et al.*, 2000). Environ 99% des protéines mitochondriales sont donc encodées par le génome nucléaire, avant d'être synthétisées par les ribosomes situés dans le cytosol et transportées à l'intérieur des mitochondries. Une très grande partie de nos connaissances sur les mécanismes d'import mitochondrial de protéines sont issues d'études réalisées chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, mais la plupart des complexes protéiques impliqués dans ces processus sont très conservés. Ainsi, au moins quatre voies principales d'import mitochondrial des protéines peuvent être décrites, déterminant chacune la destination finale de celles-ci dans la matrice, la membrane interne, l'espace intermembranaire ou la membrane externe, et ceci grâce à des signaux d'adressages particuliers.

1.1. Les signaux d'adressage mitochondrial

L'adressage mitochondrial des protéines nécessite la présence de signaux peptidiques particuliers (**Figure 17**) qui peuvent être soit clivés après import soit conservés au sein de la protéine mature. Le signal d'adressage classique et le plus fréquent, est une extension N-terminale nommée préséquence, qui forme une hélice α amphiphile avec une charge positive nette, et qui mène la plupart du temps les protéines dans la matrice mitochondriale. Généralement d'une taille de 15 à 55 acides aminés, la plupart de ces préséquences sont

clivées après import dans la matrice par la peptidase MPP (**Mitochondrial Processing Peptidase**) (Vögtle *et al.*, 2009). Parfois, ce signal est associé à un domaine hydrophobe situé juste après la préséquence. Ce signal va alors arrêter la translocation de la protéine à travers la membrane interne, et celle-ci sera libérée latéralement dans la bicouche lipidique (Glick *et al.*, 1992). Pour d'autres protéines, ce même domaine hydrophobe va être clivé par la peptidase de la membrane interne IMP, et elles resteront alors dans l'espace intermembranaire (Glick *et al.*, 1992).

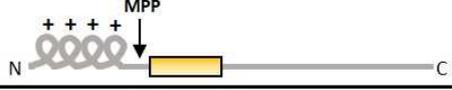
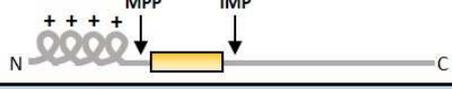
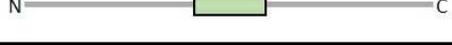
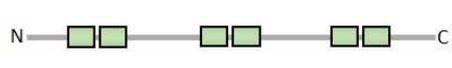
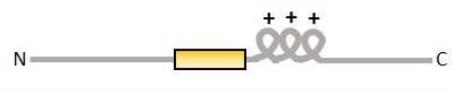
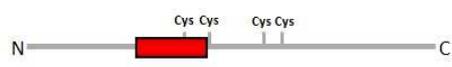
Préséquences et ses variations		Voie d'import	Destination
Hélice α amphiphile clivé en général après import		TOM TIM23 PAM	Matrice
Hélice α amphiphile + signal hydrophobe non clivé		TOM TIM23 (PAM)	MIM
Hélice α amphiphile + signal hydrophobe clivé		TOM TIM23 (PAM)	IMS
Signaux non clivables de protéines hydrophobes		Voie d'import	Destination
Signal β		TOM SAM	MOM (Tonneaux β)
Ancre N-terminal		Mim1	MOM
Signal C-terminal		?	MOM (Hélices α)
Signal interne		(TOM) (SAM)	MOM (Hélices α)
Multiplés signaux internes		TOM Tim9-Tim10 TIM22	MIM (Transporteurs des métabolites)
Préséquence interne précédée d'un signal hydrophobe		TOM TIM23	MIM
Signal interne de protéines de l'espace intermembranaire		Voie d'import	Destination
Signal contenant des cystéines		TOM MIA	IMS

Figure 17. Les différents signaux d'adressage mitochondrial.

Les signaux d'adressage mitochondrial sont clivés ou non par la peptidase mitochondriale de la matrice (MPP) ou par la peptidase mitochondriale de la membrane interne (IMP). Presque toutes les protéines à préséquence empruntent le complexe TOM (Translocase of the Outer Membrane) puis le complexe TIM (Translocase of the Inner Membrane) pour passer à travers la membrane interne (MIM). Certaines protéines sont transloquées dans la matrice par la PAM (Presequence translocase-Associated Motor). D'autres protéines vont contacter le complexe SAM (Sorting and Assembly Machinery) pour être incorporés dans la membrane externe (MOM). Enfin, certaines protéines vont être dirigées vers l'espace intermembranaire (IMS) via le complexe MIA (Mitochondrial Intermembrane space Assembly pathway). Adapté de (Chacinska *et al.*, 2009).

Un grand nombre de protéines contiennent quant à elles des signaux d'adressage internes qui ne sont pas clivés après import mitochondrial et qui sont en général moins bien caractérisés. Les protéines à tonneau β de la membrane mitochondriale externe contiennent ainsi un signal β dans leur partie C-terminale formé par le dernier feuillet β de la protéine (Kutik *et al.*, 2008). Les autres protéines de la membrane externe, qui ne présentent pas cette structure en tonneau β , possèdent des signaux d'adressage dont la localisation est variable. En effet, des petits segments transmembranaires α -hélicaux souvent flanqués par des résidus chargés positivement peuvent y être retrouvés en N-terminal, en C-terminal ou au milieu de la protéine. D'autres signaux d'adressage retrouvés dans certaines protéines de la membrane interne consistent en plusieurs séries d'environ 10 acides aminés qui peuvent être distribués le long de la protéine ou encore en un signal de structure similaire aux préséquences mais retrouvé au milieu de la protéine.

1.2. Les différentes voies d'import mitochondrial de protéines

Il est globalement admis que l'import mitochondrial des protéines est un évènement post-traductionnel. Pour empêcher le mauvais repliement et l'agrégation des protéines dans le cytosol, les segments hydrophobes des précurseurs protéiques sont protégés du milieu aqueux par un ensemble de chaperonnes spécifiques, qui escortent les protéines jusqu'à la surface des mitochondries. Cependant, pour certaines protéines, l'import mitochondrial semble être un évènement co-traductionnel (Yogev, Karniely and Pines, 2007). En effet, certains ARNm de protéines mitochondriales semblent être traduits par des ribosomes cytosoliques retrouvés à proximité de la membrane mitochondriale externe. Des signaux spécifiques localisés à la fois dans la partie 3' non-traduite et dans la partie codante des ARNm semblent permettre leur adressage à la surface des mitochondries (Michaud, Maréchal-Drouard and Duchêne, 2014).

Hormis quelques protéines de la membrane externe, toutes les protéines vont entrer dans la mitochondrie par le complexe TOM (**T**ranslocase of the **O**uter **M**embrane). Les récepteurs Tom20 et Tom70 servent de point d'ancrage initial permettant uniquement l'import des protéines qui ont un signal d'adressage approprié (Saitoh *et al.*, 2007). Le composant majeur du complexe TOM, Tom40 est quant à lui intégré dans la membrane externe en formant des pores permettant le passage des protéines. Puis, en fonction de leur

signal d'adressage, et donc de leur localisation finale, les protéines pourront être prises en charge par les complexes TIM (Translocase of the Inner Membrane), le complexe MIA (Mitochondrial intermembrane space Import and Assembly) ou encore le complexe SAM (Sorting and Assembly Machinery).

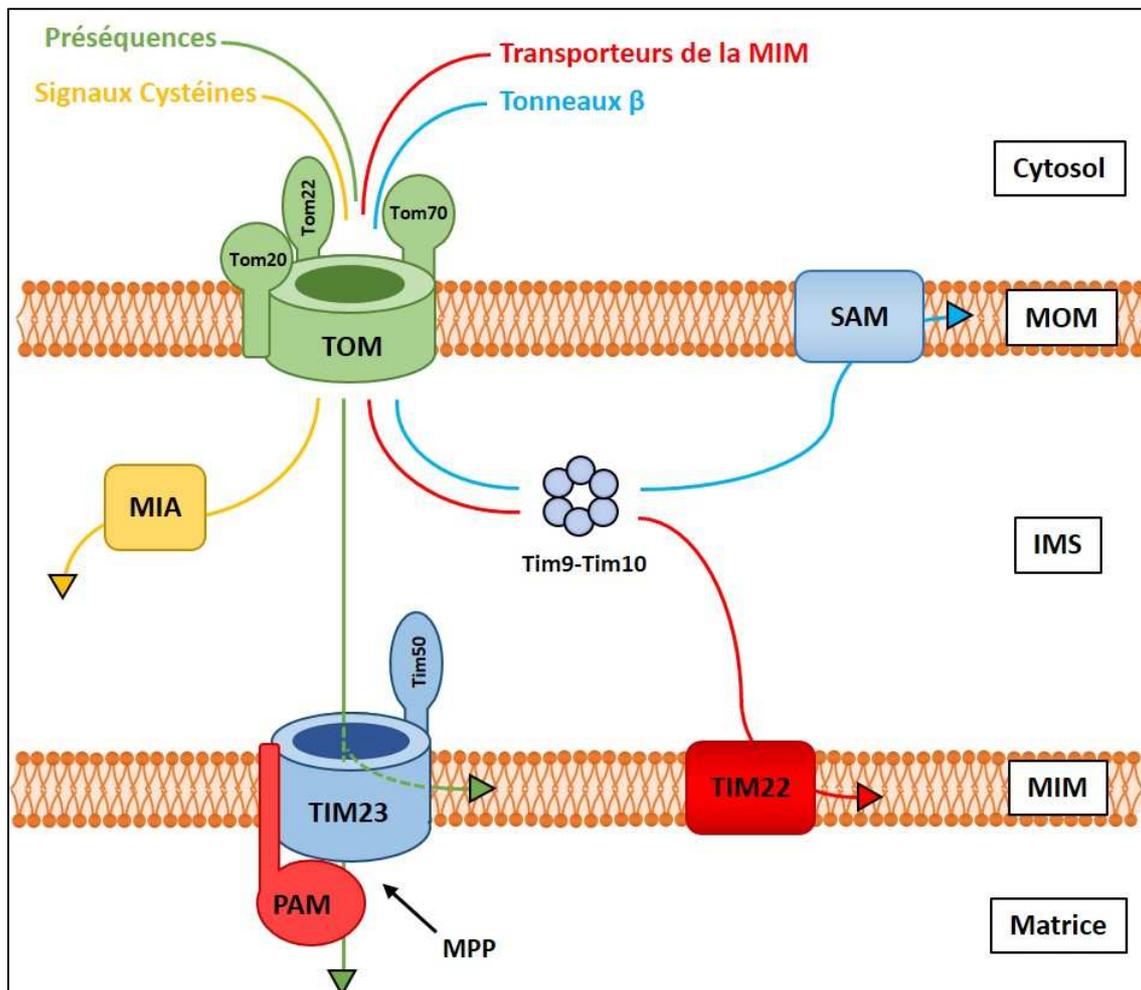


Figure 18. Les différentes voies d'import mitochondrial.

Représentation schématique des différentes voies d'import mitochondrial de protéines. Presque toutes les protéines traversent la membrane externe (Mitochondrial outer membrane, MOM) par le complexe TOM (Translocase of the Outer Membrane). Puis, les protéines à préséquences vont emprunter le complexe TIM (Translocase of the Inner Membrane) et entrer dans la matrice grâce à l'action de la PAM (Presequence-translocase Associated Motor). La préséquence peut être clivée par MPP (Mitochondrial Processing Peptidase). D'autres protéines à préséquences qui contiennent un signal hydrophobe pourront être intégrées dans la membrane interne (Mitochondrial Inner membrane, MIM). Les protéines à signaux cystéines sont prises en charge par le complexe MIA (Mitochondrial Intermembrane Space Import and Assembly) pour être relâchées dans l'espace intermembranaire (IMS). Les protéines de la famille des transporteurs de métabolites vont d'abord contacter le petit complexe Tim9-Tim10 et vont être insérées dans la MIM grâce au complexe TIM22. Les protéines à tonneau β vont être intégrées dans la MOM grâce au complexe SAM (Sorting and Assembly Machinery). Adapté de (Chacinska *et al.*, 2009).

Voie d'import mitochondrial des protéines à préséquences

La voie d'import des protéines à préséquence est celle qui est la mieux caractérisée (Dudek, Rehling and van der Laan, 2013). Ainsi, après fixation du précurseur par Tom20, les protéines se lient aux domaines cytosoliques de Tom22 et Tom5. Elles peuvent alors s'engager dans le pore formé par Tom40 et contacter un site de liaison situé sur la partie du complexe TOM qui se trouve dans l'espace intermembranaire. Pour ces protéines, le passage à travers la membrane externe est étroitement couplé à leur translocation à travers la membrane interne par le biais du complexe TIM23. Les protéines à préséquences vont ainsi se lier au récepteur Tim50 et pourront pénétrer dans la matrice par le canal formé dans la membrane interne par Tim23. Cette étape semble dépendante du potentiel membranaire. Le complexe TIM23 est associé du côté matriciel à PAM (**P**resequence-**t**ranslocase **A**ssociated **M**otor) dont la sous-unité majeure est la chaperonne mtHsp70. Cette chaperonne va ainsi se lier à la chaîne polypeptidique et permettre son entrée dans la matrice dans un processus qui nécessite l'hydrolyse d'ATP. Après l'entrée dans la matrice mitochondriale, la préséquence pourra être clivée grâce à l'action de la peptidase MPP. Celle-ci reconnaît un motif particulier qui présente un résidu arginine situé deux aminoacides avant le site de clivage. En revanche, cette étape déstabilise la protéine mature, et une seconde peptidase pourra intervenir pour la stabiliser (Vögtle *et al.*, 2009). Enfin, comme nous l'avons vu précédemment, la présence d'un domaine hydrophobe après la préséquence peut induire un arrêt de la translocation et la libération des protéines dans la membrane interne (Glick *et al.*, 1992). Bien que le mécanisme précis permettant cette intégration dans la membrane interne ne soit pas bien élucidé, il semble néanmoins nécessiter l'ouverture latérale du canal Tim23 (Chacinska *et al.*, 2005).

Voie d'import des transporteurs de métabolites de la membrane interne

D'autres protéines insérées dans la membrane mitochondriale interne utilisent une voie différente pour atteindre leur destination, ce sont les transporteurs de métabolites. Ces protéines sont reconnues à la surface de la mitochondrie par le récepteur Tom70. Comme ces protéines contiennent plusieurs signaux d'adressage internes, plusieurs protéines Tom70 vont s'y fixer en formant alors des oligomères dont le rôle pourrait être d'empêcher l'agrégation de ces protéines hydrophobes. En formant une boucle, elles vont ensuite passer dans le complexe TOM et se lier au petit complexe Tim9-Tim10 situé dans l'espace intermembranaire,

qui servira de chaperonne guidant la protéine vers la membrane interne. C'est alors le complexe TIM22 qui va permettre leur insertion dans la membrane interne par un mécanisme qui dépend du potentiel membranaire.

Import des protéines de l'espace intermembranaire via le complexe MIA

Alors que certaines protéines de l'espace intermembranaire contiennent une préséquence suivie d'un domaine hydrophobe qui leur permet d'emprunter la voie menant à TIM23, la majorité des protéines de l'espace intermembranaire contiennent des motifs spécifiques riches en cystéines qui forment des ponts disulfures intramoléculaires. Ces protéines traversent la membrane externe sous leur forme réduite (-SH) sans ponts disulfures, et lorsqu'elles émergent dans l'espace intermembranaire interagissent avec le complexe MIA. Cette interaction est réalisée par le biais de Mia40 qui forme des ponts disulfures avec la protéine importée, catalysant ensuite son repliement sous sa forme mature et sa libération dans l'espace intermembranaire grâce à une série de réactions d'oxydo-réduction.

Voie d'import des protéines de la membrane externe

Les protéines de la membrane externe vont emprunter deux voies différentes en fonction de leur structure en tonneau β ou en hélices α . Les protéines à tonneau β , parmi lesquelles on retrouve notamment VDAC ou Tom40, pénètrent dans la mitochondrie via le complexe TOM. Dans l'espace intermembranaire, elles seront ensuite fixées par les petits complexes Tim9-Tim10 ou Tim8-Tim13, qui vont la guider vers le complexe SAM qui est enchâssé dans la membrane externe. Ce complexe va alors, grâce à ses sous-unités essentielles Sam50 et Sam35, insérer progressivement les feuillets β dans la bicouche lipidique pour former la protéine mature. La voie d'insertion des protéines à hélices α dans la membrane mitochondriale externe est bien moins connue. Pour certaines de ces protéines, elle semble néanmoins dépendre du récepteur Tom70 et c'est la protéine membranaire Mim1 qui les intégrerait dans la membrane externe.

Bien qu'il reste encore beaucoup à découvrir sur le phénomène d'import mitochondrial des protéines, les nombreuses études concernant ce sujet ont permis dans l'ensemble de bien définir les signaux, les acteurs et les mécanismes qui le régissent. Nous

allons voir maintenant par comparaison que le phénomène d'import mitochondrial des ARN est bien moins caractérisé et que de nombreux éléments restent encore à éclaircir.

2. L'import mitochondrial d'ARN

L'import mitochondrial d'ARN est un phénomène qui peut être considéré comme quasi-ubiquitaire puisqu'il a été décrit dans de nombreux organismes répartis dans les quatre grands règnes des eucaryotes : les animaux, les végétaux, les champignons et les protistes. Les macromolécules importées sont en général des petits ARN non-codants, principalement des ARNt, mais d'autres ARN ont également été décrits comme étant adressés vers les mitochondries. Dans cette partie, je vais donc résumer les connaissances que nous possédons sur ce phénomène dans les différents organismes étudiés. Comme mon projet de thèse exploite principalement les voies d'import mitochondrial d'ARN décrites chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* et chez l'Homme, je ne décrirai ici que très succinctement les mécanismes qui ont lieu chez les protozoaires et chez les plantes.

2.1. L'import d'ARN chez les protozoaires

Le premier article faisant état d'un phénomène d'import mitochondrial d'ARN a été publié il y a tout juste 50 ans, lorsque en 1967, Suyama découvrit qu'une grande partie des ARNt mitochondriaux du protozoaire *Tetrahymena pyriformis* s'hybrident à l'ADN nucléaire plutôt qu'à l'ADNmt (Suyama, 1967). Plus tard, des résultats similaires furent décrits pour les protistes *Trypanosoma brucei* (Hancock and Hajduk, 1990) et *Leishmania tarentolae* (Simpson and Shaw, 1989) dans lesquels le phénomène d'import mitochondrial d'ARN est très important. Les génomes mitochondriaux de ces deux organismes sont en effet totalement dépourvus de gènes d'ARNt, et ils doivent donc tout deux importés l'ensemble de leurs ARNt mitochondriaux depuis le cytosol.

L'import mitochondrial des ARNt chez *T.brucei* semble spécifié par la présence d'un signal localisé dans leur boucle T (Crausaz Esseiva *et al.*, 2004) permettant l'interaction dans le cytosol avec le facteur eEF1a qui est requise pour définir sa localisation (**Figure 19**). Cette interaction implique ainsi que ces ARNt soient aminoacylés avant leur import mitochondrial. Très récemment, le processus par lequel les ARNt sont transloqués à travers les deux membranes mitochondriales a connu une avancée significative. Celui-ci est en effet réalisé par un processus ATP-dépendant (Bouzaidi-Tiali *et al.*, 2007) qui ne requiert pas la présence de

VDAC. En revanche, les ARNt semblent transloqués à travers la membrane mitochondriale externe grâce au complexe ATOM (Archaic Translocase of the Outer Membrane), empruntant ainsi la même voie d'import que les protéines (Niemann *et al.*, 2017).

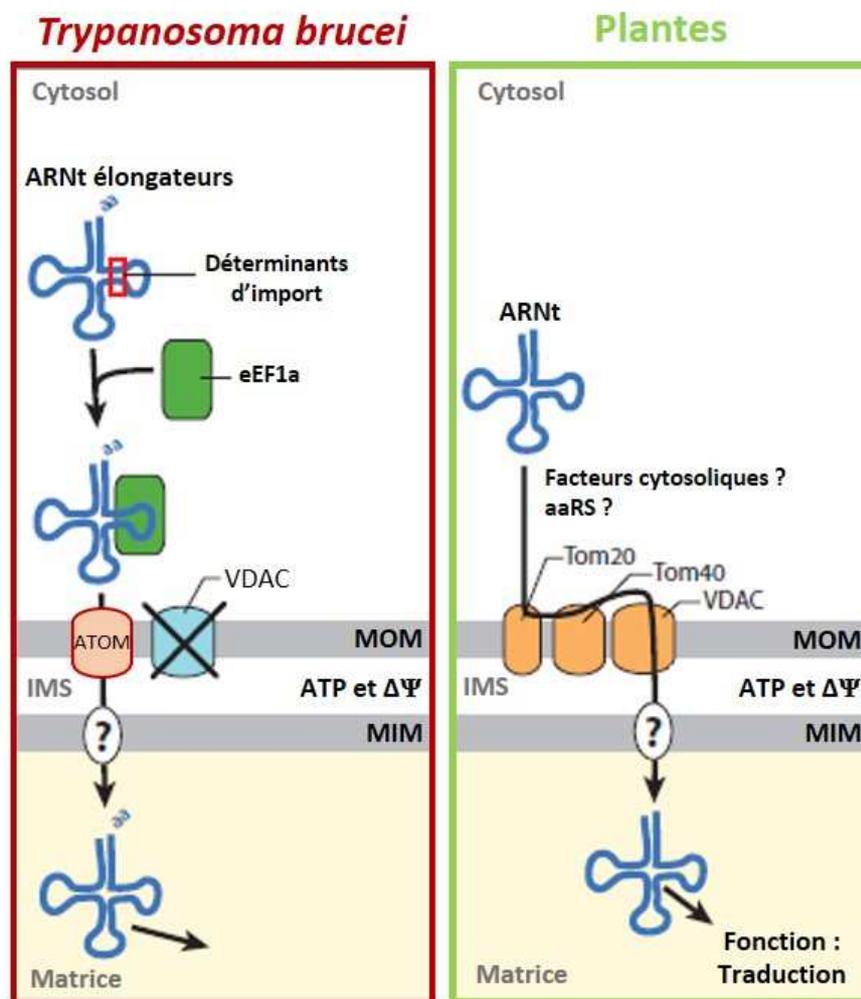


Figure 19. L'import mitochondrial d'ARN chez les plantes et chez *Trypanosoma brucei*.

A droite, l'import mitochondrial d'ARNt chez les plantes. L'adressage mitochondrial des ARNt ne semble pas nécessiter la présence de facteur cytosolique. La translocation à travers la membrane externe requiert Tom20, Tom40 et le canal VDAC (Voltage-dependent Anion Channel). La voie de translocation à travers la membrane interne est inconnue. A gauche, l'import mitochondrial des ARNt chez le protiste *Trypanosoma brucei*. L'interaction de la protéine eEF1a avec l'ARNt semble diriger cet adressage mitochondrial. La voie de translocation au travers des membranes ne requiert pas la présence de VDAC mais semble être médiée par le complexe ATOM (Archaic Translocase of the Outer Membrane). Adapté de (Schneider, 2011).

2.2. L'import d'ARN chez les plantes

Toutes les plantes étudiées présentent un import mitochondrial d'ARNt, mais le nombre et l'identité de ces ARNt varie énormément d'une espèce à l'autre. Dans la plupart des cas, la situation est en tout cas très claire, puisque les ARNt qui sont importés correspondent à ceux dont le gène n'est pas présent sur l'ADNmt. En revanche, à cause des variations observées entre les espèces, le mécanisme qui dirige l'import des ARNt chez les plantes reste très difficile à étudier.

Aucun motif d'import mitochondrial commun n'a pu être identifié sur les ARNt qui sont importés dans les mitochondries de plantes, les signaux dirigeant cet import pourraient ainsi être très dépendants de l'organisme étudié (Schneider, 2011; Salinas-Giegé, Giegé and Giegé, 2015). Des tests d'import *in vitro* suggèrent que les ARNt peuvent être importés dans les mitochondries sans ajout de facteurs cytosoliques, en revanche *in vivo* la présence des aminoacyl-ARNt synthetases semble requise. Le mécanisme par lequel ces ARNt pénètrent dans la mitochondrie est dépendant de l'ATP et du potentiel membranaire (Delage *et al.*, 2003), mais il reste en grande partie à déterminer. VDAC semble ainsi représenter la voie principale de translocation des ARNt au travers de la membrane mitochondriale externe, mais des protéines de la machinerie d'import protéique, comme Tom20 et Tom40, semblent aussi jouer un rôle dans cet import (Salinas *et al.*, 2006).

2.3. L'import d'ARN chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*

L'ADNmt de la levure *Saccharomyces cerevisiae* porte l'ensemble des gènes d'ARNt nécessaires pour accomplir la traduction au sein des mitochondries. Cependant, en 1979, l'étude des ARNt mitochondriaux de cette levure ont permis de déterminer qu'une petite fraction d'un ARNt dont le gène est porté par l'ADN nucléaire, est retrouvé dans la fraction mitochondriale (Martin *et al.*, 1979). Ainsi, *S.cerevisiae* possède trois isoformes de l'ARNt^{Lys} : tRK1 (ARNt^{Lys(CUU)}) et tRK2 (ARNt^{Lys(UUU)}) qui sont tous deux encodés par le génome nucléaire, et tRK3 (mt-ARNt^{Lys(UUU)}) porté par le génome mitochondrial. Les études menées sur les ARNt de cet organisme ont ainsi permis de démontrer qu'alors que tRK2 est strictement cytosolique, environ 2 à 3% de tRK1 est retrouvé dans les mitochondries.

La voie d'adressage mitochondrial de tRK1 a été largement analysée et est maintenant bien connue. Elle implique au moins deux facteurs cytosoliques : l'enzyme glycolytique

Enolase-2 (Eno2) et le précurseur de la lysyl-tRNA synthetase mitochondriale (pre-Msk1). Eno2 peut se lier de façon spécifique à tRK1 (Entelis *et al.*, 2006), le dirigeant alors vers la surface de la mitochondrie, où cette protéine peut entrer dans un complexe glycolytique associé à la membrane externe (Brandina *et al.*, 2006). Le précurseur pre-Msk1 est quant à lui synthétisé à proximité de la mitochondrie. L'interaction d'Eno2 avec tRK1 induit un changement de conformation de cet ARNt, qui peut alors former un complexe avec pre-Msk1p (Tarassov, Entelis and Martin, 1995). Cette interaction permet alors l'import mitochondrial de tRK1 au cours d'un processus qui nécessite de l'ATP, un potentiel membranaire ainsi qu'une machinerie d'import protéique intacte.

Les déterminants permettant l'adressage sélectif de tRK1 ont été mis en évidence grâce à des analyses par mutagenèse. Ce sont ainsi l'anticodon CUU, en particulier par la position 34, et des nucléotides du bras accepteur, qui semblent critiques pour le processus d'import (Kazakova *et al.*, 1999). Ceux-ci permettent un changement de conformation particulier de tRK1, qui à la place de sa forme L, adopte alors une structure nommée F, composée de trois tiges-boucles dans laquelle l'extrémité 3' de l'ARNt et la boucle T Ψ C sont proches l'une de l'autre. Dans cette structure, seule la boucle D de l'ARNt sous sa forme L est conservée. Ce serait donc la capacité des ARNt à adopter cette structure particulière suite à l'interaction avec Eno2 qui confère la spécificité d'import mitochondrial. Des expériences de SELEX ont quant à elles permis l'identification de deux structures au sein de cette molécule qui peuvent diriger son import mitochondrial (**Figure 20**) (Kolesnikova *et al.*, 2010). En effet, des petits ARN contenant à la fois la tige-boucle D et une deuxième tige-boucle issue de tRK1 sous sa forme F (nommée tige-boucle F) sont caractérisés par une très haute capacité d'import dans les mitochondries de levure, ainsi que dans les mitochondries de cellules humaines, comme nous le verrons dans la partie suivante (**II-2.4**).

La fonction de tRK1 au sein de la mitochondrie a longtemps été le sujet de questionnements puisque la levure *S.cerevisiae* contient déjà tRK3 qui peut en principe décoder tous les codons lysine. Cependant, il a été démontré que l'import de tRK1, bien que non essentiel à 30°C, devient indispensable à 37°C. Ceci pourrait trouver son explication dans l'efficacité de modification de la position wobble de tRK3. En effet, cette position est occupée par une uridine modifiée (c'est une 5-carboxyméthylaminométhyl-2-thiouridine ou cmnm⁵s²U) qui permet le décodage des codons lysine AAA et AAG dans la mitochondrie. A 37°C, il a été montré que cette position est hypomodifiée, ce qui empêche le décodage du

codon AAG (Kamenski *et al.*, 2007). L'import mitochondrial de tRK1, qui présente l'anticodon CUU, permet alors de compléter cette déficience.

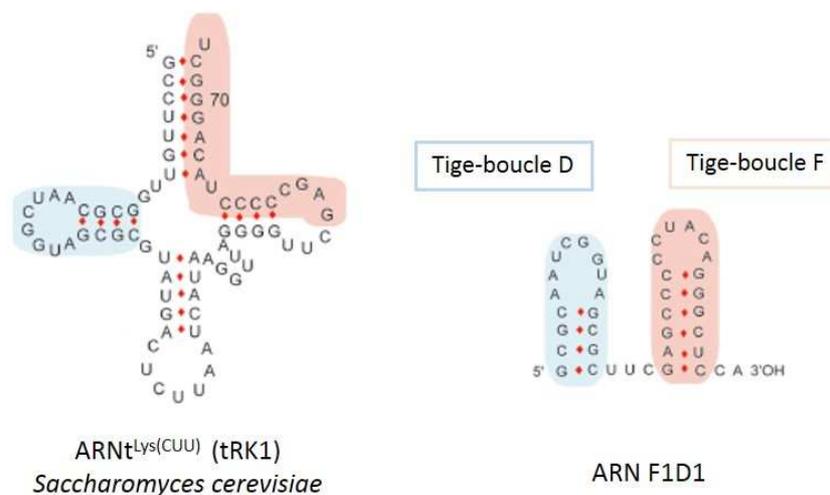


Figure 19. Structure secondaire de tRK1 et du petit ARN artificiel F1D1.

A gauche, structure secondaire « en feuille de trèfle » de l'ARNT^{Lys(CUU)} (tRK1) de *Saccharomyces cerevisiae*. Les déterminants d'import mitochondrial sont surlignés en couleur : en bleu, la tige-boucle D, et en rose la tige-boucle F. A droite, le petit ARN artificiel F1D1 caractérisé par une très haute capacité d'import dans les mitochondries. Il contient la tige-boucle D (en bleu) et la tige-boucle F (en rose) séparés par un linker. Adaptée de (Comte *et al.*, 2013).

Un second ARNt a été décrit comme importé dans les mitochondries de la levure *S.cerevisiae*, c'est l'ARNT^{Gln}. En effet, en 2005, Rinehart et ses collègues observèrent les ARNT^{Gln(UUG)} et ARNT^{Gln(CUG)}, tous deux portés par le génome nucléaire, dans la fraction mitochondriale de levure (Rinehart *et al.*, 2005). De plus, ils purent également constater la présence de la glutaminyl-ARNt synthétase cytosolique dans les mitochondries de cet organisme. L'import *in vitro* de ces deux ARNt ne requiert en revanche ni l'existence d'un potentiel membranaire, ni la présence de facteurs cytosoliques suggérant ainsi que *S.cerevisiae* possède deux voies différentes d'import d'ARNt. Les auteurs proposent ainsi que la glutaminyl-ARNt synthétase cytosolique importée dans les mitochondries de *S.cerevisiae* permet l'aminoacylation des ARNT^{Gln} cytosoliques eux aussi importés. Le génome de levure encode un ARNT^{Gln} présentant l'anticodon UUG dont le premier nucléotide semble porter la modification $\text{cmnm}^5\text{s}^2\text{U}$. Les auteurs émettent alors l'hypothèse selon laquelle cette

modification limiterait la capacité de décodage de cet ARNt au seul codon CAA, ce qui expliquerait la nécessité d'importer l'ARNt^{Gln(CUG)} dans les mitochondries de cet organisme.

Cependant, plus tard, une autre voie d'aminocyclation de l'ARNt^{Gln} a été identifiée et caractérisée dans les mitochondries de la levure *S.cerevisiae* (Frechin *et al.*, 2009). En effet, un complexe hétérotrimérique GatF-GatA-GatB portant une fonction amidotransferase ARNt-dépendante ainsi qu'une glutamyl-ARNt synthétase non-discriminante semble y permettre la formation de Gln-ARNt^{Gln}. De plus, dans cette étude, les auteurs ne purent pas détecter d'ARNt^{Gln} cytosolique dans la fraction mitochondriale, alors que l'ARNt^{Lys(CUU)} cytosolique était bien présent, ce qui suggère que l'import de l'ARNt^{Gln} dans les mitochondries de la levure *Saccharomyces cerevisiae* nécessite confirmation.

2.4. L'import d'ARN chez les mammifères

Chez les mammifères, plusieurs ARN dont les gènes sont portés par l'ADN nucléaire ont été retrouvés dans les mitochondries. Cependant, contrairement aux autres organismes, les ARNt ne représentent qu'une fraction minoritaire des ARN qui ont été décrits comme importés dans les mitochondries de mammifère.

En effet, pendant longtemps, aucun ARNt cytosolique n'avait été retrouvé dans la fraction mitochondriale chez les mammifères. Cependant, une étude de 2008 a suggéré que d'une façon similaire à ce qui peut être retrouvé chez la levure *S.cerevisiae* et pour les mêmes raisons, deux ARNt^{Gln} pourraient être importés dans les mitochondries chez l'Homme et chez le rat (Rubio *et al.*, 2008). Des expériences réalisées sur mitochondries isolées ont de plus démontré que l'import de ces ARNt est un processus ATP-dépendant, mais qui ne requiert pas la présence de facteurs cytosoliques ou d'un potentiel membranaire. Ces résultats nécessitent néanmoins confirmation, puisque les expériences réalisées au laboratoire ne permettent pas la détection de ces deux ARNt dans la fraction mitochondriale.

En revanche, plusieurs autres petits ARN non-codants encodés par le génome nucléaire ont été identifiés dans la fraction mitochondriale des mammifères.

2.4.1. Import mitochondrial de l'ARNr 5S

L'ARN ribosomique 5S (ARNr 5S) est un des composants essentiels de la grande sous-unité du ribosome de tous les organismes connus, à l'exception desquels, les ribosomes mitochondriaux des levures et des mammifères (Amunts *et al.*, 2015 ; Greber *et al.*, 2015). Sa fonction précise au sein du ribosome n'est toujours pas bien élucidée, mais plusieurs expériences suggèrent qu'il serait impliqué dans la coordination des différents centres fonctionnels du ribosome.

Bien que cet ARN ne soit pas encodé par le génome mitochondrial des mammifères, il a pu en revanche être détecté en quantité importante dans les mitochondries et mitoplastes de ces organismes par hybridation de type Northern et par RT-PCR (Yoshionari *et al.*, 1994; Magalhães, Andreu and Schon, 1998). Le trafic de cet ARN au sein des cellules est bien connu (**Figure 21**) : après transcription par l'ARN polymérase III, l'ARNr 5S est exporté du noyau grâce à son interaction avec le facteur de transcription TFIIIA. Lorsqu'il se trouve dans le cytosol, il peut ensuite s'associer à de nombreux partenaires protéiques afin de remplir des fonctions distinctes. Lorsqu'il interagit avec la protéine ribosomique L5, l'ARNr 5S est ainsi dirigé vers le nucléole pour être intégré dans les ribosomes cytosoliques néosynthétisés.

En revanche, son interaction avec d'autres partenaires protéiques va permettre son adressage vers les mitochondries. Tout d'abord, c'est le précurseur d'une protéine du mitoribosome, pre-MRP-L18, qui en interagissant avec cet ARN, va le détourner de la voie le menant vers le ribosome cytosolique, et le mener vers la mitochondrie (Smirnov *et al.*, 2011). Cette interaction induit un changement de conformation de l'ARNr 5S qui permet alors à un second partenaire protéique, la thiosulfate sulfurtransferase (TST) ou rhodanèse, de s'y fixer de façon co-translationnelle (Smirnov *et al.*, 2010). C'est cette seconde interaction qui permet la translocation de l'ARNr 5S dans les mitochondries par un mécanisme qui reste inconnu mais qui est dépendant de la présence d'ATP et du potentiel membranaire (Entelis *et al.*, 2001).

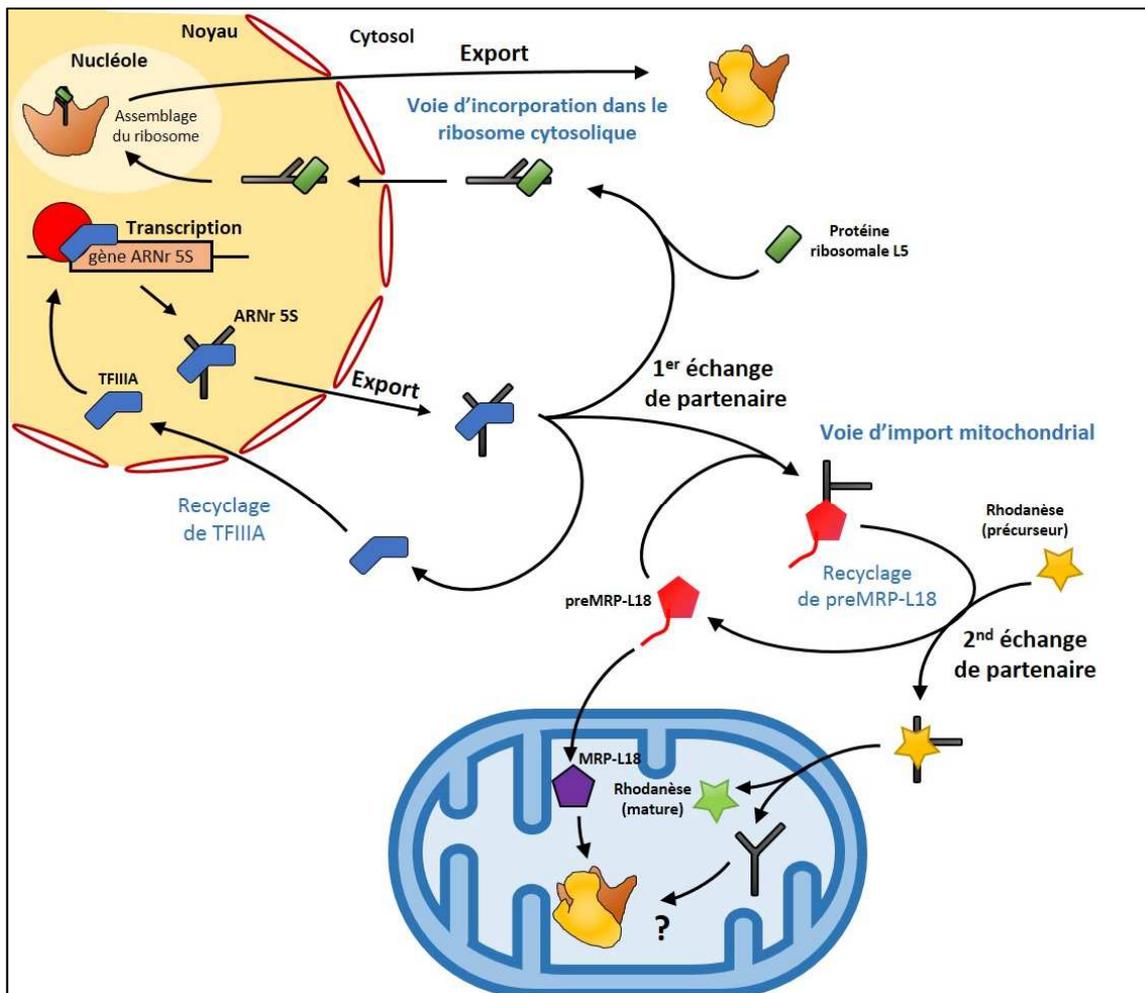


Figure 21. Trafic de l'ARNr 5S au sein des cellules humaines.

Schéma récapitulatif du trafic intracellulaire de l'ARNr 5S au sein des cellules humaines. Au sein du noyau, l'ARNr 5S est transcrit grâce à l'ARN polymérase III (rond rouge) et le facteur de transcription TFIIIA (en bleu foncé). Associé à ce facteur de transcription, l'ARNr 5S est exporté dans le cytosol. A ce moment, il pourra interagir avec plusieurs partenaires protéiques en fonction de sa destination finale. Lorsqu'il interagit avec la protéine ribosomale L5 (rectangle vert), il est ré-importé dans le noyau, au niveau du nucléole, et participe à la formation du ribosome cytosolique. Lorsqu'il interagit avec la protéine précurseur préMRP-L18 (pentagone rouge), il change de conformation, ce qui permet son interaction avec un second partenaire protéique, la rhodanèse (étoile jaune). Cette interaction permet la translocation de l'ARNr 5S dans les mitochondries. Le rôle mitochondrial de l'ARNr 5S n'est pas élucidé, mais certaines expériences suggèrent son implication dans le processus de traduction mitochondriale et un rôle possible dans la maturation du ribosome mitochondriale. Adaptée de (Smirnov *et al.*, 2011).

Les déterminants permettant l'adressage mitochondrial de cette molécule ont également été identifiés (Smirnov *et al.*, 2008) (**Figure 22**). Ainsi, l'ARNr 5S est une molécule très structurée d'environ 120 nucléotides (M= 40kDa) qui est composée de 3 domaines nommés α , β et γ . La partie permettant l'interaction avec la rhodanèse est située au niveau

de l'hélice I du domaine α . L'interaction de l'ARNr 5S avec la protéine précurseur pre-MRP-L18 est réalisée quant à elle grâce à la partie distale du domaine γ (hélice IV et boucle D). L'intégrité des domaines α et γ est donc cruciale pour l'adressage mitochondrial de l'ARNr 5S. En revanche, la partie distale du domaine β (Hélice III et boucle C) est impliquée dans l'interaction avec la protéine ribosomique L5 et donc l'intégration de l'ARNr 5S dans le ribosome cytosolique. Notre équipe a d'ailleurs démontré que la suppression de cette partie distale du domaine β ou sa substitution par 13 nucléotides aléatoires n'altèrent pas l'import mitochondrial de l'ARNr 5S. Au contraire, la molécule résultante a une capacité d'import mitochondrial plus élevée, ce qui est probablement dû à l'impossibilité de cette molécule à interagir avec la protéine L5.

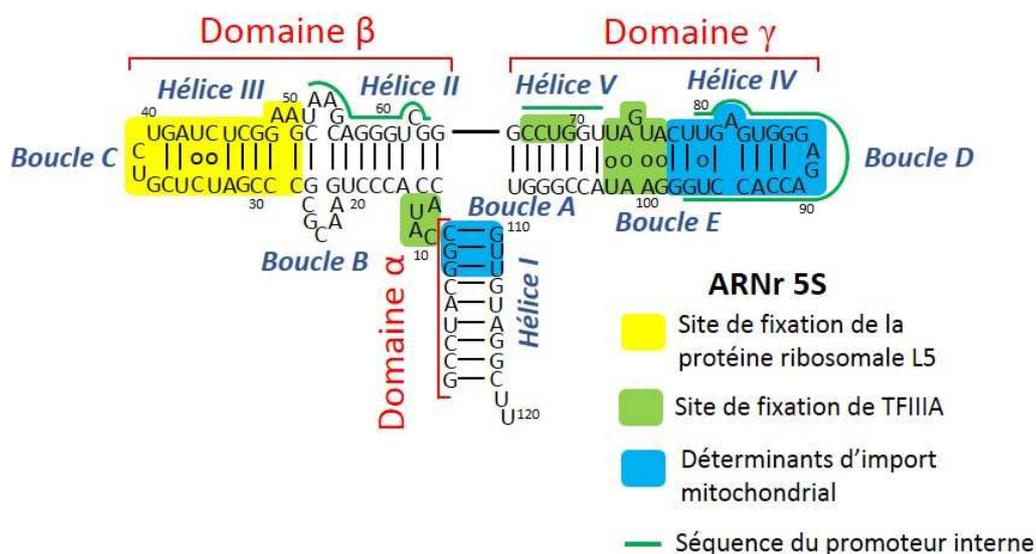


Figure 22. Structure secondaire de l'ARNr 5S humain.

L'ARNr 5S humain est une petite molécule de 120 nucléotides très structurée qui peut être divisée en trois domaines (α , β et γ). Son interaction avec différents partenaires protéiques va permettre son export nucléaire (TFIIIA), son incorporation dans le ribosome cytosolique (protéine ribosomale L5) ou son import mitochondrial (preMRP-L18 et rhodanèse). Adaptée de (Smirnov *et al.*, 2008).

La fonction mitochondriale de l'ARNr 5S chez les mammifères n'a en revanche pas encore été élucidée. Sa présence au sein des mitochondries a bien évidemment d'abord suggéré son implication dans le mitoribosome. Ceci était d'ailleurs plus tard soutenu par le fait qu'un knock-out de la rhodanèse entraîne une diminution de la synthèse protéique mitochondriale, suggérant alors l'implication de l'ARNr 5S dans le processus de traduction

mitochondriale (Smirnov *et al.*, 2011). Cependant, nous avons pu voir précédemment que les structures des mitoribosomes humains et porcins obtenus par cryo-microscopie électronique ne permettent pas l'observation de l'ARNr 5S au cœur du mitoribosome (Amunts *et al.*, 2015 ; Greber *et al.*, 2015). Très récemment, des études réalisées au laboratoire ont montré que l'ARNr 5S interagit avec des protéines qui seraient impliquées dans la maturation du ribosome mitochondrial. Ceci pourrait ainsi indiquer un rôle de l'ARNr 5S dans ce processus mais d'autres expériences seront nécessaires pour confirmer cela.

2.4.2. Import mitochondrial des composants ARN de la RNase P et de la RNase MRP

D'autres données évoquent la présence de deux petits ARN non-codants dans les mitochondries de cellules humaines : le composant ARN de la RNase P et le composant ARN de la RNase MRP.

La RNase P permet la maturation des ARNt en clivant leur extrémité 5'. Cette endonucléase est souvent composée de plusieurs sous-unités protéiques associées à un ARN catalytiquement actif. Le gène de cet ARN est retrouvé dans l'ADNmt de plusieurs organismes (plusieurs levures et quelques protistes), mais est absent du génome mitochondrial de mammifères. Le premier indice de la présence du composant ARN de la RNase P dans les mitochondries de cellules humaines date de l'année 1985, lorsqu'une activité évoquant celle de la RNase P, mais sensible aux traitements par des nucléases, a été identifiée dans des mitochondries de cellules HeLa (Doersen *et al.*, 1985). Plus récemment, un ARN de 340 nucléotides dont la séquence est identique au composant ARN de la RNase P nucléaire a été isolé de mitochondries de cellules HeLa (Puranam and Attardi, 2001), mais en quantité très faible. De façon tout à fait opposée, d'autres études affirment en revanche que l'activité RNase P retrouvée dans les mitochondries de cellules humaines est totalement indépendante de la présence d'ARN (Rossmanith and Karwan, 1998) et un complexe essentiellement protéique possédant cette activité a pu être reconstitué *in vitro* à partir de trois protéines mitochondriales (MRPP1, MRPP2 et MRPP3). Enfin, une dernière étude de 2010 propose l'existence des deux types d'activités au sein des mitochondries, une qui est dépendante de cet ARN, l'autre qui ne l'est pas (Wang *et al.*, 2010).

La RNase MRP (**Mitochondrial RNA Processing**) est une endoribonucléase ribonucléoprotéique dont la fonction a été étudiée dans les mitochondries de souris (Chang and Clayton, 1987). Elle semble ainsi cliver les transcrits au niveau de la NCR pour générer les

amorces nécessaires à la réplication du brin H. Des analyses par hybridation *in situ* ont démontré que le composant ARN de cette RNase est retrouvé majoritairement dans le nucléole, mais qu'une très faible quantité peut aussi être localisée dans les mitochondries. En revanche, la possibilité que de telles quantités d'ARN puissent suffire pour remplir la fonction de la RNase MRP dans les mitochondries fait l'objet de débats (Kiss and Filipowicz, 1992).

2.4.3. Import mitochondrial de microARN

Depuis quelques années, plusieurs publications font état de la présence d'une autre classe d'ARN non-codant au sein des mitochondries de mammifère : les microARN. Ainsi, à ce jour environ 150 microARN ont été détectés dans les mitochondries de mammifères par diverses techniques et sont regroupés sous le nom de « mitomiR » (**mitochondrial microRNA**) (Geiger and Dalgaard, 2017). La plupart d'entre eux n'ont en revanche été détectés que dans un nombre très limité d'études et seul sept mitomiRs ont été décrits dans au moins trois études différentes. De plus, leur fonction mitochondriale n'est souvent pas clairement définie ce qui nous engage à être prudent quant à la présence de l'ensemble de ces mitomiRs dans les mitochondries. Certains composants protéiques du complexe RISC (**RNA-Induced Silencing Complex**) ont pu en revanche être détectés dans les mitochondries de plusieurs tissus de mammifères comme AGO2 ou FXR1 (Jagannathan *et al.*, 2015), mais là aussi cette localisation mérite confirmation. Les investigations concernant l'étude des mitomiRs n'en étant qu'à leur début, de futures expériences devront confirmer leur localisation, analyser leur fonction et décrire leur voie d'import mitochondrial.

2.4.4. Import artificiel de tRK1

Enfin, un cas particulier présentant un grand intérêt pour mes travaux concerne l'import artificiel de l'ARN^{t^{Lys}(CUU)} de la levure *S.cerevisiae* dans les cellules humaines. En effet, au début des années 2000, plusieurs études démontrèrent que tRK1 peut être importé *in vitro* dans les mitochondries isolées de cellules humaines, grâce à des extraits de protéines cytosoliques humains, dans un processus qui requière de l'ATP, un potentiel membranaire et l'ajout du précurseur pre-Msk1p de levure (Kolesnikova, 2000). Plus tard, en changeant les conditions de préparation des extraits protéiques humains, il fut montré que ceux-ci peuvent diriger l'import de tRK1 sans addition de pre-Msk1p (Entelis *et al.*, 2001), suggérant alors que les cellules humaines contiennent toutes les protéines nécessaires pour importer cet ARN. De

façon similaire à ce qui est observé chez la levure, cet import se base sur l'interaction de tRK1 avec le précurseur de la lysyl-ARNt synthétase mitochondriale humaine (pre-KARS2) (Gowher *et al.*, 2013) puis avec l'é nolase (Baleva *et al.*, 2015). L'analyse des structures dirigeant l'import mitochondrial de tRK1 ont par la suite entraîné le développement d'une série de petits ARN qui peuvent être importés dans les mitochondries humaines et notamment le petit ARN artificiel F1D1 (**Figure 20**) (Kolesnikova *et al.*, 2010). Ce petit ARN de 39 bases, composé des hélices F et D de tRK1 séparées par un linker, est caractérisé par une capacité d'import mitochondrial dix fois supérieure à celle de tRK1. Plus tard, il fut démontré que des petits ARN contenant soit l'hélice F, soit l'hélice D, peuvent également être retrouvés dans les mitochondries de cellules humaines *in vivo* (Gowher *et al.*, 2013). L'ensemble de ces données a permis le développement de plusieurs stratégies thérapeutiques pour des maladies causées par des mutations de l'ADNmt dont nous allons parler dans la prochaine partie.

III. Les maladies mitochondriales

Les maladies mitochondriales sont un ensemble de désordres génétiques cliniquement hétérogènes mais toutes caractérisées par un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire. Elles peuvent se manifester dans la phase néonatale, dans l'enfance ou à l'âge adulte. Bien que pouvant affecter tous les tissus et organes du corps humain de façon isolée, elles sont généralement multi-systémiques, en impliquant en particulier les organes les plus énergivores comme le cerveau, les muscles squelettiques ou le cœur. La multiplicité des symptômes observés et leur apparition aléatoire, rendant le diagnostic difficile, a entraîné leur regroupement en syndromes spécifiques. Cependant, la corrélation génotype-phénotype est souvent difficile à établir puisqu'un même syndrome peut être causé par de nombreuses mutations affectant des gènes distincts. La prévalence des maladies mitochondriales chez l'enfant de moins de 16 ans a été estimée à environ 5 à 15 cas pour 100000 individus (Gorman *et al.*, 2016). Une autre étude a quant à elle évalué la prévalence des maladies mitochondriales chez l'adulte à environ 1 personne affectée sur 4300 dans la population du Nord-Est de l'Angleterre (Gorman *et al.*, 2015).

A l'origine de ces maladies, on retrouve des mutations de l'ADN qui peuvent toucher soit des gènes mitochondriaux portés par l'ADN nucléaire, soit directement l'ADN mitochondrial.

1. Maladies mitochondriales dues à une mutation dans l'ADN nucléaire

Plus de 1500 gènes nucléaires codent pour des protéines mitochondriales qui sont impliquées dans le processus de phosphorylation oxydative ou qui remplissent d'autres fonctions. Un nombre croissant de mutations dans ces gènes ont été associées à des maladies mitochondriales et leur prévalence est estimée à 2,9 cas pour 100000 individus d'après l'étude de cohorte menée dans le Nord-Est de l'Angleterre (Gorman *et al.*, 2015). Ces mutations suivent un mode de transmission mendélienne et peuvent être autosomiques dominantes, récessives ou bien liées au chromosome X. Une classification de ces mutations de gènes nucléaires qui se base sur l'impact de celles-ci a pu être établie (Chinnery, 2014), regroupant ces mutations en cinq grandes catégories :

- Les mutations dans des gènes de sous-unités structurales de la chaîne respiratoire
- Les mutations dans des gènes de facteurs d'assemblage de la chaîne respiratoire

- Les mutations dans des gènes de facteurs de la traduction mitochondriale
- Les mutations associées à des délétions de l'ADNmt ou à une déplétion en ADNmt
- Les autres mutations qui n'entrent dans aucune des catégories précédentes

Je ne m'attarderai pas plus sur la description des maladies mitochondriales causées par des mutations dans le génome nucléaire puisque mon projet de thèse concerne essentiellement l'autre source de maladies mitochondriales : les mutations de l'ADNmt.

2. Maladies mitochondriales dues à une mutation dans l'ADNmt

Les premières mutations de l'ADNmt associées à des maladies mitochondriales chez l'Homme furent décrites en 1988 (Holt, Harding and Morgan-Hughes, 1988). Depuis lors, près de 300 mutations pathogéniques de l'ADNmt ont été décrites (MITOMAP). Elles peuvent être regroupées en trois types : les mutations ponctuelles dans des gènes codant pour des protéines de la chaîne respiratoire, les mutations ponctuelles dans des gènes impliqués dans la synthèse protéique (ARNr ou ARNt) ou enfin les réarrangements de l'ADNmt qui incluent les délétions et les insertions.

Les mutations du génome mitochondrial suivent un mode de transmission particulier puisqu'elles sont exclusivement transmises par la mère. En effet, lors de la fécondation, les mitochondries du spermatozoïde sont éliminées par mitophagie, dans un processus qui implique la dégradation de l'ADNmt paternel par l'endonucléase G mitochondriale CPS-6 (Zhou *et al.*, 2016).

La prévalence des maladies mitochondriales causées par des mutations de l'ADNmt a été estimée à environ 20 cas pour 100000 individus, toujours dans la même cohorte du Nord-Est de l'Angleterre (Gorman *et al.*, 2015). Une autre étude a quant à elle suggéré que plus d'un individu sain sur 200 est porteur d'une mutation pathogénique de l'ADNmt (Elliott *et al.*, 2008), la maladie associée ne se déclarant pas grâce à un phénomène particulier, l'hétéroplasmie.

2.1. L'hétéroplasmie mitochondriale

Comme nous avons pu le voir dans la première partie, l'ADNmt est présent en plusieurs centaines de copies dans les cellules humaines. Toutes ces molécules peuvent être identiques au sein d'une cellule et on parlera alors de situation d'homoplasmie. Au contraire, dans le cas d'une mutation de l'ADNmt, les génomes qui contiennent la mutation peuvent coexister dans la même cellule avec les génomes sauvages, c'est ce qu'on appelle l'hétéroplasmie (Wallace and Chalkia, 2013). Bien qu'il existe des cas où les cellules sont homoplasmiques pour une mutation de l'ADNmt, l'hétéroplasmie est la situation la plus commune. Dans ce cas, la proportion d'ADNmt mutant par rapport à l'ADNmt sauvage joue un rôle très important dans l'expression de la maladie associée (**Figure 23**). En effet, ce ratio, appelé taux d'hétéroplasmie, va être très étroitement lié à l'apparition et à la sévérité des symptômes associés à une mutation donnée. Il a ainsi été démontré que ce taux d'hétéroplasmie doit atteindre un certain niveau seuil avant que les cellules ne présentent un désordre biochimique de la chaîne respiratoire. Généralement, on considère que ce seuil pathogénique est compris entre 60 et 80% d'ADNmt mutant, mais ce taux dépend énormément de l'organe affecté, des individus et surtout de la mutation de l'ADNmt. De plus, le taux d'hétéroplasmie peut varier dans le temps au sein d'un individu, ce qui pourrait notamment être expliqué par plusieurs phénomènes (Craven *et al.*, 2017).

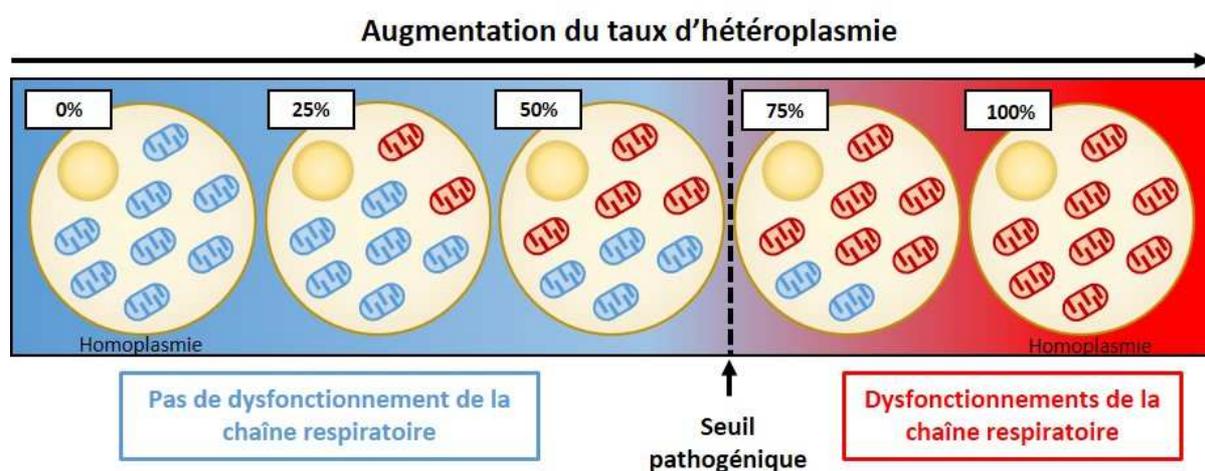


Figure 23. L'hétéroplasmie mitochondriale.

Schéma du principe d'hétéroplasmie mitochondriale. Au sein d'une même cellule, des molécules d'ADNmt mutantes (en rouge) et sauvages (en bleu) peuvent coexister sans induire de dysfonctionnements de la chaîne respiratoire. En revanche, si la proportion de molécules mutantes dépasse un certain seuil pathogénique, des dysfonctionnements de la chaîne respiratoire apparaissent.

Le premier de ces phénomènes est connu sous le nom de ségrégation mitotique (Craven *et al.*, 2017). En effet, à chaque mitose, les mitochondries sont réparties de façon aléatoire entre les deux cellules filles. Cette distribution aléatoire des mitochondries, et par extension des génomes mitochondriaux, va alors pouvoir mener à des variations du taux d'hétéroplasmie entre la cellule mère et les cellules filles, soit en faveur des génomes sauvages, soit en leur défaveur.

Un autre phénomène peut être observé dans les cellules post-mitotiques. En effet, même lorsque les cellules ne se divisent plus, l'ADNmt est continuellement répliqué. Dans ces cellules, des variations d'hétéroplasmie peuvent être observées, ce qui impliquerait que les génomes mutants et sauvages présentent des taux de réplication différents. Ainsi, les tissus qui se divisent rapidement, comme par exemple la moelle osseuse, tendent à diminuer naturellement leur taux d'hétéroplasmie. En revanche, les cellules post-mitotiques, comme les neurones, semblent accumuler l'ADNmt mutant au cours du temps, ce qui pourrait alors expliquer l'apparition lente et tardive des symptômes qui peut être observée chez certains patients.

2.2. Le « genetic bottleneck »

Des variations du taux d'hétéroplasmie peuvent donc être constatées au sein d'un individu, mais elles sont aussi observées entre deux générations. Ainsi, dans une même famille affectée par une maladie causée par une mutation hétéroplasmique de l'ADNmt, la mère et ses enfants peuvent présenter des phénotypes de sévérités variables liées à des niveaux d'hétéroplasmie différents. Pour expliquer ce phénomène, l'hypothèse du « genetic bottleneck » ou goulot d'étranglement génétique, a été proposée, suggérant que seulement une très petite quantité d'ADNmt est transmise de la mère à l'enfant. Bien que le mécanisme précis qui expliquerait cela n'est toujours pas élucidé, plusieurs hypothèses ont été proposées. La première de celles-ci propose que lors de la formation des lignées germinales, le nombre de copies d'ADNmt se réduirait drastiquement pour être à environ une dizaine de molécules dans les cellules germinales primordiales. A ce moment, la distribution des génomes mutants et sauvages est aléatoire et va entraîner l'apparition de taux d'hétéroplasmie très différents dans les cellules germinales matures (Cree *et al.*, 2008). L'étude menée par (Wai, Teoli and Shoubridge, 2008) suggère quant à elle que ce goulot d'étranglement aurait plutôt lieu

pendant la folliculogénèse post-natale. Une autre hypothèse inclut quant à elle la réplication sélective d'une sous-population d'ADNmt sans réduction du nombre de copies d'ADNmt (Cao *et al.*, 2007).

3. Stratégies thérapeutiques des maladies mitochondriales

Malgré les progrès importants réalisés dans le domaine de la biologie mitochondriale et l'élucidation toujours plus importante des mécanismes moléculaires à l'origine des maladies mitochondriales, il n'existe à ce jour toujours pas de traitement curatif efficace pour soigner les patients atteints par ces affections. Néanmoins, la recherche de thérapies pour ces maladies mitochondriales est intense et a mené à l'élaboration de plusieurs stratégies qui peuvent être envisagées pour prévenir leur transmission ou pour les combattre.

3.1. Un modèle d'étude : les cellules cybrides transmitochondriales

A ce jour, il n'existe aucune technologie qui permet de modifier le génome mitochondrial pour y introduire des mutations. Ceci a ainsi compliqué l'étude des mécanismes moléculaires menant d'une mutation de l'ADNmt à une maladie mitochondriale. Pour combler ce manque, un modèle d'étude particulier a été développé en 1989 (King and Attardi, 1989), ce sont les cellules cybrides transmitochondriales (**Figure 24**). Ces cellules sont le résultat de la fusion de cytoplastes de patients porteurs d'une mutation de l'ADNmt avec des cellules immortalisées dépourvues d'ADNmt. En pratique, une lignée immortalisée sans activité thymidine kinase (TK-) subit un traitement qui permet l'élimination de ses génomes mitochondriaux produisant alors une lignée ρ^0 . Ce traitement est en général réalisé par l'utilisation d'un intercalant de l'ADN comme le bromure d'éthidium, qui va altérer la réplication de l'ADNmt menant à son élimination progressive au cours des divisions cellulaires. Les cellules de patients sont quant à elles énucléées par centrifugation et traitement avec un agent qui désorganise le cytosquelette. Après fusion, les cellules sont placées dans un milieu qui contient de la bromodéoxyuridine mais dépourvu d'uridine ou de pyruvate. Ce milieu permet ainsi la sélection des cellules ρ^0 qui ont fusionnées avec des cytoplastes contenant des mitochondries fonctionnelles. Grâce à cette technologie, nous obtenons donc une lignée cellulaire immortalisée qui contient un certain pourcentage de molécules d'ADNmt affectées par une mutation.

Cependant, bien que l'existence de ce modèle ait permis la description des mécanismes moléculaires à l'origine de certaines maladies mitochondriales, quelques précautions sont à prendre lorsque l'on utilise les cellules cybrides. En effet, il ne faut pas oublier que ce modèle est issu de lignées immortalisées qui présentent souvent une aneuploïdie. Celle-ci pourrait avoir un impact sur les mitochondries et sur leurs fonctions, notamment en affectant la stœchiométrie des sous-unités de la chaîne respiratoire (Wilkins, Carl and Swerdlow, 2014).

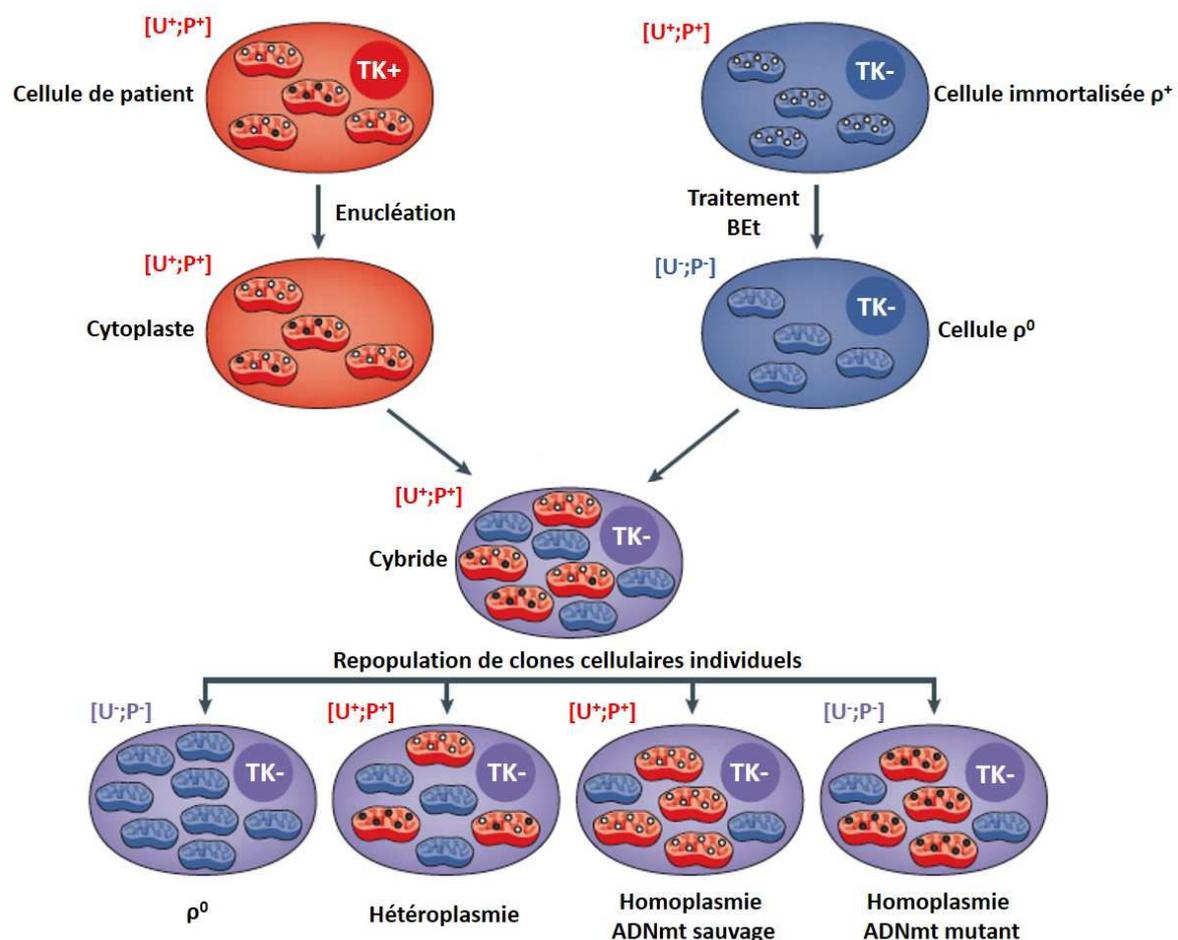


Figure 24. Processus de création des cellules cybrides.

Les cellules cybrides sont issues de la fusion de cytoplastes énucléés de patients atteints par une mutation de l'ADNmt (en rouge) et de cellules ρ^0 immortalisées (en violet) déficientes en thymidine kinase (TK-). Après fusion, les cellules sont sélectionnées sur un milieu sans pyruvate (P-) ou sans uridine (U-). Les ADNmt mutants sont représentés par des points noirs et les ADNmt sauvages sont représentés par des points blancs. Adaptée de (Schon, DiMauro and Hirano, 2012).

3.2. Prévention de la transmission de maladies mitochondriales

En l'absence de traitements efficaces pour les maladies mitochondriales causées par des mutations de l'ADNmt, une attention toute particulière est apportée dans les méthodes permettant de diminuer le risque de transmission de ces mutations. En raison du mode de transmission maternel, ces stratégies sont particulièrement envisagées lorsque dans un couple la mère est porteuse d'une mutation de l'ADNmt. Dans ce cas, la donation d'ovocyte est bien sûr une solution qui peut être envisagée et qui permet d'éliminer le risque de transmission d'une maladie mitochondriale. Cependant, plusieurs autres options sont aussi disponibles afin de permettre à des parents dont la mère est porteuse d'une mutation de l'ADNmt d'avoir un enfant sain (**Figure 25**) (Craven *et al.*, 2017).

La première de ces options consiste à réaliser un diagnostic prénatal au cours des premières semaines de développement embryonnaire. Le taux d'hétéroplasmie du fœtus peut ainsi être déterminé par choriocentèse entre la 10^e et la 12^e semaine de gestation, ou par amniocentèse entre la 15^e et la 22^e semaine de gestation. Bien que des exceptions peuvent avoir lieu, il a été démontré que ce taux d'hétéroplasmie reste stable pendant la suite de la grossesse et qu'une forte corrélation existe entre ce taux et celui déterminé chez l'enfant. Cette option reste en particulier appropriée pour des patients qui présentent un faible taux d'hétéroplasmie.

Une seconde option qui s'offre aux parents est un diagnostic génétique préimplantatoire. Dans ce cas, des cellules sont extraites dans les premiers stades de développement embryonnaire obtenus après fécondation *in vitro* (en général au stade 8-cellules ou au stade blastocyste). Le taux d'hétéroplasmie retrouvé au sein des cellules prélevées est déterminé et les embryons présentant un risque réduit de développement de maladies mitochondriales peuvent être implantés. Ici aussi, cette option est particulièrement appropriée pour des patients qui ont un taux d'hétéroplasmie relativement faible.

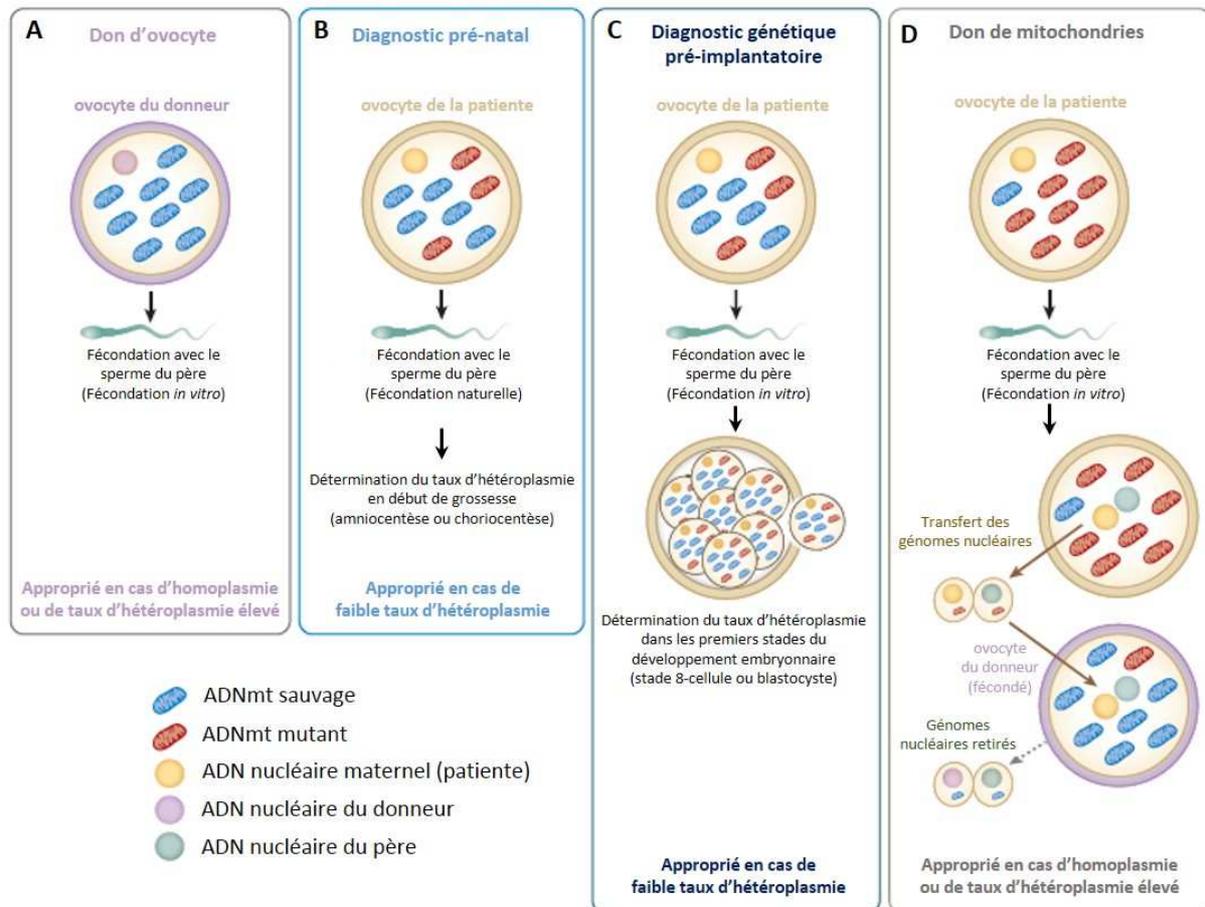


Figure 25. Les différentes options de reproduction pour les femmes porteuses de mutations de l'ADNmt.

Enfin, très récemment, une dernière option qui était envisagée depuis plusieurs années, a fait l'objet d'intenses débats et a connu des avancées très importantes, il s'agit de la donation de mitochondries. Cette technique consiste à prélever le génome nucléaire d'un ovocyte ou d'un zygote venant d'une femme porteuse d'une mutation de l'ADNmt et de le transférer à un ovocyte ou un zygote d'une donneuse saine dont le génome nucléaire a été retiré au préalable. Le résultat est donc un ovocyte ou un zygote reconstitué qui contient le génome nucléaire des parents mais l'ADNmt sauvage d'une donneuse. L'embryon résultant qui sera implanté est donc lié génétiquement à ses deux parents mais présente un risque diminué de souffrir d'une maladie mitochondriale. La possibilité d'appliquer cette technique a fait un véritable bond en avant en 2015, lorsque le Parlement du Royaume-Uni a autorisé son utilisation pour les êtres humains. Cependant, ce n'est pas dans ce pays, mais au Mexique, que le premier enfant issu de cette technique naquit en 2016 grâce à une équipe américaine. Bien que peu de détails ne soient disponibles sur la procédure utilisée, les auteurs décrivent

que le blastocyste obtenu présentait un taux d'hétéroplasmie de 5,73% pour une mutation ponctuelle menant à un syndrome de Leigh, et qu'après trois mois, l'enfant est apparemment en bonne santé (Zhang *et al.*, 2016). L'avantage de cette troisième option est qu'elle peut être parfaitement utilisée pour des mères qui sont affectées par une mutation homoplasmique de l'ADNmt ou avec un taux d'hétéroplasmie très élevé.

3.3. Traitements pharmacologiques et stratégies diététiques

Bien qu'aucun traitement curatif n'existe à ce jour pour les maladies mitochondriales, plusieurs solutions ont été proposées pour diminuer les effets néfastes des mutations de l'ADNmt et peuvent être utilisés par les patients.

Les patients atteints par ces maladies utilisent ainsi souvent des suppléments alimentaires qui incluent des anti-oxydants (comme le coenzyme Q10, la vitamine C et la vitamine E), des agents qui modulent le flux d'électron dans la chaîne respiratoire (comme la vitamine B2 ou le coenzyme Q10) ou encore des composés qui stimulent la biogenèse mitochondriale (comme la vitamine B3).

3.4. Stratégies de thérapie génique

De nombreuses stratégies de thérapie génique ont été proposées dans les dernières années pour les maladies causées par des mutations de l'ADNmt. Elles visent à adresser dans les mitochondries la version saine du produit d'un gène mitochondrial défectueux, c'est la stratégie allotopique, ou à diminuer le taux d'hétéroplasmie au-dessous du seuil pathogénique, ce sont les stratégies antigénomiques.

3.4.1. La stratégie allotopique

La stratégie allotopique consiste à intégrer dans le génome nucléaire la version saine d'un gène mitochondrial défectueux et à adresser l'ARN ou la protéine produits depuis ce gène dans les mitochondries, grâce à l'ajout de signaux d'import mitochondrial.

Le premier essai d'approche allotopique fut développé en 1988 chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* lorsque le gène codant pour la sous-unité MT-ATP8 couplé à la préséquence de la sous-unité 9 de l'ATPase de *Neurospora crassa* a été inséré dans le génome nucléaire de cet organisme porteur d'une mutation dans le gène MT-ATP8 mitochondrial

(Nagley *et al.*, 1988). Les levures ainsi transformées pouvaient à nouveau croître sur un milieu favorable à la respiration cellulaire grâce à la présence de complexes ATPase fonctionnels. La même stratégie a plus tard été adaptée sur des cellules humaines contenant une mutation dans le gène *MT-ATP6* associée à un syndrome NARP (**N**europathie, **A**taxie et **R**etinitis **P**igmentosa) (Manfredi *et al.*, 2002). Cependant, une étude réalisée quelques années plus tard est venue contester ces résultats en affirmant que la protéine est bien adressée vers les mitochondries mais qu'elle ne s'assemble pas en un complexe ATPasique fonctionnel (Bokori-Brown and Holt, 2006). Ce dernier résultat fut plus récemment supporté par une autre étude réalisée chez la souris qui suggère que la restauration des fonctions de la chaîne respiratoire peut en réalité être due à la sélection artificielle des révertants du gène muté (Perales-Clemente *et al.*, 2011). En 2016, l'expression allotopique stable des gènes *MT-ATP8* et *MT-ATP6* précédés par la préséquence d'adressage mitochondrial de la sous-unité ATP5G1, a permis leur import mitochondrial et leur intégration dans le complexe V, restaurant la production d'ATP dans des cellules cybrides porteuses d'une mutation ponctuelle située à la jonction de ces deux gènes (Boominathan *et al.*, 2016). Enfin, plusieurs études récentes ont démontré que l'expression allotopique du gène *MT-ND4* introduit au moyen de vecteurs de type AAV permet l'assemblage de la sous-unité ND4 au sein du complexe I et prévient les défauts de ce complexe au sein de fibroblastes. Cette stratégie fait désormais l'objet de plusieurs essais cliniques (Cwerman-Thibault *et al.*, 2015 ; Feuer *et al.*, 2016 ; Wan *et al.*, 2016)

Une explication pouvant justifier ces résultats contradictoires reposerait dans la grande hydrophobicité des protéines mitochondriales qui pourrait compromettre leur import. La possibilité d'utiliser une stratégie allotopique chez l'humain resterait donc soumise aux propriétés de chaque protéine qu'il faut adresser dans la mitochondrie.

Un grand nombre de mutations de l'ADNmt affectent des gènes codants pour des ARNt, ce qui a pour effet d'altérer le processus de synthèse protéique mitochondrial et donc de causer des défauts de la chaîne respiratoire. Pour remédier à cela, notre équipe a développé une stratégie allotopique particulière prenant appui sur les voies naturelles d'import mitochondrial d'ARN. L'objectif de cette stratégie est d'utiliser tRK1 qui est importé dans les mitochondries de la levure *S.cerevisiae* et qui peut également être importé de façon artificielle dans les mitochondries humaines pour compenser les défauts causés par des mutations dans des gènes d'ARNt mitochondriaux. Ainsi, cette stratégie a tout d'abord été

développée sur un modèle cybride présentant la mutation ponctuelle A8344G qui se situe dans le gène de l'ARNt^{Lys} mitochondrial et qui est associée à un syndrome MERRF (**M**yoclonic **E**pilepsy with **R**agged-**R**ed **F**ibres). Cette mutation est responsable d'une faible aminoacylation de l'ARNt^{Lys} et a été liée à une terminaison prématurée de la traduction mitochondriale au niveau de certains codons lysine. L'expression dans ces cellules de versions saines de l'ARNt^{Lys} a ainsi permis de restaurer partiellement la traduction mitochondriale ainsi que les fonctions respiratoires (Kolesnikova *et al.*, 2004). Plus récemment, une stratégie similaire a été utilisée pour compléter l'effet de la mutation A3243G située dans le gène MT-TL1 et associée à un syndrome de type MELAS (**M**itochondrial **E**ncephalomyopathy with **L**actic **A**cidosis and **S**troke-like episodes). Dans ce cas, plusieurs mutations ont été introduites dans les ARNt^{Lys} de la levure *S.cerevisiae* afin de leur conférer les déterminants d'identité de l'ARNt^{Leu(UUR)}. L'expression de ces différents ARNt^{Lys} modifiés dans les cellules cybrides et leur import mitochondrial a permis de restaurer partiellement les effets négatifs de la mutation A3243 (Karicheva *et al.*, 2011). L'expression allotopique de dérivés de l'ARNt^{Lys} pourrait donc être utilisée pour compléter les effets négatifs de mutations retrouvées dans des gènes d'ARNt mitochondriaux.

3.4.2. La stratégie anti-réplivative

Une seconde option a été imaginée pour traiter les maladies mitochondriales causées par des mutations hétéroplasmiques de l'ADNmt. Puisque le taux d'hétéroplasmie doit excéder un certain seuil pathogénique pour provoquer l'apparition des défauts de la chaîne respiratoire et les symptômes associés, cette seconde stratégie vise à moduler ce taux d'hétéroplasmie afin qu'il soit inférieur au niveau seuil. Pour cela, une première méthode a été proposée, c'est la stratégie anti-réplivative. Celle-ci repose sur l'adressage mitochondrial de molécules capables de s'hybrider spécifiquement aux génomes mitochondriaux mutants pour interférer avec leur réplification et ainsi donner un avantage répliatif aux génomes mitochondriaux sauvages (**Figure 26**).

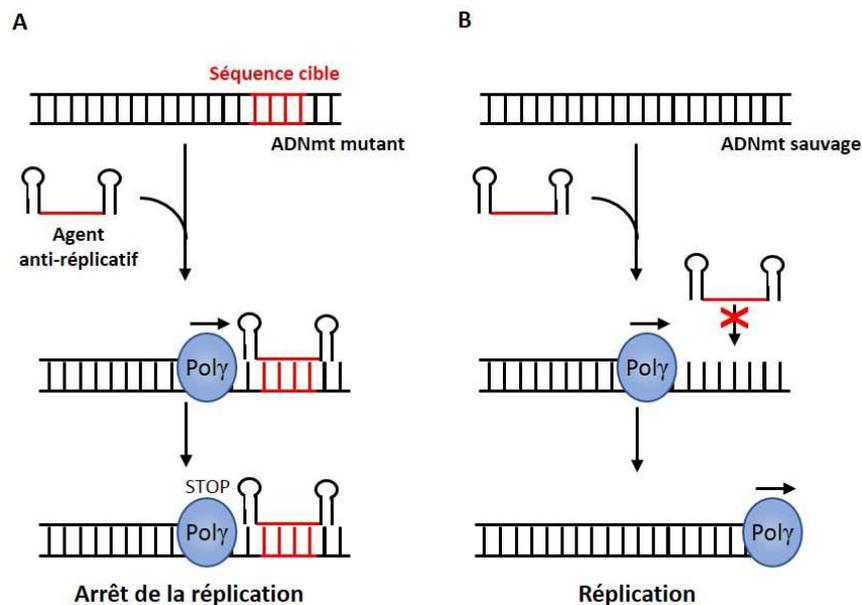


Figure 26. La stratégie anti-répllicative.

Schéma de la stratégie anti-répllicative. (A) L'agent anti-réplcatif contient une séquence complémentaire à l'ADNmt mutant. Son hybridation spécifique à cet ADN peut induire une pause dans la réplication par l'ADN polymérase mitochondriale (Poly). (B) Cette même molécule ne peut pas s'hybrider à l'ADNmt sauvage, et la fourche de réplication peut progresser normalement.

Cette stratégie a tout d'abord été développée en utilisant des molécules spécifiques appelées PNA (**Peptide-Nucleic Acids**). Les PNA sont des molécules synthétiques dans lesquelles les chaînes de purines et de pyrimidines sont liées par un squelette pseudo-peptidique non chargé. Ces molécules présentent une forte affinité pour l'ADNmt et peuvent empêcher spécifiquement sa réplication *in vitro* (Taylor *et al.*, 1997). Par la suite, pour provoquer leur import mitochondrial, ces molécules ont été couplées à une préséquence peptidique d'adressage mitochondrial (Chinnery *et al.*, 1999) ou à des cations lipophiliques. Cependant, alors qu'il a d'abord été suggéré que ceux-ci permettaient l'adressage mitochondrial des PNA avec succès, l'absence d'effet *in vivo* a par la suite révélé que ces molécules n'étaient en fait pas capables de franchir la membrane mitochondriale interne.

Plus récemment, notre laboratoire a également développé une stratégie anti-répllicative mais en exploitant les voies d'adressage mitochondrial d'ARN. Une première étude a été réalisée sur des cellules cybrides contenant environ 65% de molécules d'ADNmt affectées par une large délétion qui a été associée à un syndrome de type Kearns Sayre Shy

(KSS). En utilisant les données accumulées sur l'import mitochondrial de tRK1 et de ses dérivés dans les mitochondries de cellules humaines, une série de petites molécules artificielles a été développée. Ces petites molécules sont composées d'une courte séquence d'ARN pouvant s'hybrider spécifiquement à l'ADNmt mutant encadrée par les hélices F et D de tRK1. Après synthèse par transcription *in vitro* ces petits ARN artificiels ont été introduits dans les cellules cybrides par lipofection. Leur introduction, suivi de leur import, a ainsi permis l'obtention de diminutions transitoires de l'hétéroplasmie de l'ordre de 20%, ce qui constitue le premier exemple concluant d'une stratégie anti-réplivative *in vivo* (Comte *et al.*, 2013). La même stratégie a été utilisée plus tard sur un modèle cybride contenant la mutation ponctuelle A13514G située dans le gène MT-ND5. De façon similaire, l'application des molécules anti-réplivatives sur les cellules cybrides a permis l'observation d'une diminution de l'hétéroplasmie d'environ 20%, confirmant l'efficacité de la stratégie anti-réplivative *in vivo* (Tonin *et al.*, 2014).

Dans le même but, notre laboratoire a aussi développé une stratégie anti-réplivative basée sur l'exploitation de la voie d'adressage mitochondrial de l'ARNr 5S (Comte *et al.*, 2013). Ainsi, la partie distale du domaine β de l'ARNr 5S a été remplacée par une courte séquence de 13 nucléotides correspondant au brin H du génome mitochondrial mutant KSS et pouvant donc s'hybrider au brin L de ce génome (ARNr 5S recombinant nommé 5S-KSS-13H) ou par une séquence de 14 nucléotides pouvant s'hybrider au brin H de l'ADNmt mutant (ARNr 5S recombinant nommé 5S-KSS-14L). L'adressage mitochondrial de ces molécules a été démontré par des tests d'import sur mitochondries isolées tandis qu'un test de réplivication *in vitro* a permis de mettre en évidence leur capacité à altérer spécifiquement la réplivication de l'ADNmt mutant.

Afin d'exprimer ces molécules au sein de cellules cybrides, les gènes de ces ARNr 5S recombinants ont été insérés dans un vecteur d'expression. L'intégration aléatoire de ces plasmides dans le génome des cellules cybrides et la sélection par antibiotique a permis d'isoler 20 à 25 clones de chaque série. De façon intéressante, alors que les clones obtenus après intégration du vecteur vide ou du vecteur contenant l'ARNr 5S sauvage ne présentaient que très peu de variations de leur taux d'hétéroplasmie, les clones issus de l'intégration des ARNr 5S recombinants « 5S-KSS-13H » ou « 5S-KSS-14L » ont montré, dans environ 30% des

cas, une diminution stable de leur taux d'hétéroplasmie par rapport à la lignée initiale. Tandis que la plupart des clones présentaient une diminution modeste de leur taux d'hétéroplasmie (environ 10 à 15% de diminution), un clone exprimant l'ARNr 5S recombinant « 5S-KSS-13H » a démontré une diminution plus importante de 28%. Cette baisse d'hétéroplasmie est importante compte tenu du faible niveau d'expression de cette molécule au sein des cellules, comme cela a été déterminé par RT-PCR semi-quantitative (30 ± 5 molécules par cellule). Une partie de mon projet de thèse a ainsi visé à poursuivre les travaux de l'équipe sur le développement de cette stratégie anti-répllicative basée sur l'utilisation de l'ARNr 5S comme vecteur d'import mitochondrial, nous y reviendrons donc dans la partie « **Résultats et Discussions** ».

3.4.3. La stratégie anti-génomique

Toujours dans l'objectif de moduler le taux d'hétéroplasmie au sein de cellules contenant des mutations de l'ADNmt, une autre stratégie a été proposée, visant à détruire spécifiquement les génomes mitochondriaux mutants. Pour atteindre ce but, différentes technologies ont été utilisées.

Utilisation d'endonucléases de restriction

La stratégie anti-génomique a tout d'abord été développée en adressant certaines endonucléases de restriction dans les mitochondries. En effet, il arrive que des mutations de l'ADNmt entraînent l'apparition de sites cibles spécifiques de certaines enzymes. Ces études visent ainsi à adresser ces endonucléases dans les mitochondries pour cliver spécifiquement l'ADNmt mutant. Cette stratégie a été appliquée pour la première fois en adressant l'enzyme PstI dans les mitochondries de cellules de souris dont une partie des ADNmt contient deux sites cible de cette enzyme (Srivastava and Moraes, 2001). L'expression de PstI a ainsi mené à un clivage spécifique de l'ADNmt qui est par la suite rapidement dégradé. Suivant la même stratégie, l'enzyme SmaI a par la suite été adressée dans les mitochondries de cellules cybrides contenant une mutation ponctuelle liée à un syndrome de Leigh, permettant la dégradation spécifique de ces molécules (Tanaka *et al.*, 2002). Le développement de cette technique s'est ensuite poursuivi par son application sur des modèles murins contenant deux haplotypes d'ADNmt différents (Bayona-Bafaluy *et al.*, 2005). Dans cette étude, l'haplotype mitochondrial

BALB contient un site cible unique de l'enzyme de restriction ApaLI, qui n'est en revanche pas présent sur l'haplotype NZB. Pour étudier la cinétique du changement d'hétéroplasmie, le gène de l'endonucléase ApaLI fusionnée à la préséquence de la protéine COX8 a été placé sous le contrôle d'un promoteur inductible. L'expression de la protéine Mito-ApaLI résultante a ainsi permis l'observation d'un changement rapide de l'hétéroplasmie en faveur de l'haplotype NZB, puisqu'en moins de 24h, les cellules transfectées semblent homoplasmiques pour cet haplotype. Puis, comme ce système est *a priori* limité aux mutations créant des sites de restriction uniques au sein de l'ADNmt, de nouvelles expériences ont visé à étudier l'effet de clivages multiples au sein des génomes mitochondriaux. Pour cela, les souris BALB/NZB ont été transfectées avec l'enzyme de restriction Mito-ScaI, dont le site est présent cinq fois sur l'ADNmt NZB et trois fois sur l'ADNmt BALB. De façon surprenante, bien qu'une déplétion importante de l'ADNmt soit observée lorsque l'enzyme est exprimée, une diminution sélective de la quantité d'ADNmt NZB a pu être observée (Bacman *et al.*, 2007), suggérant que cette stratégie pourrait donc être étendue à d'autres mutations de l'ADNmt. Enfin, l'injection systémique de l'enzyme Mito-ApaLI par le biais de vecteur AAV (**A**deno-**A**ssociated **V**irus) dans des muscles de souris, induit un changement d'hétéroplasmie dans plusieurs tissus (Bacman *et al.*, 2012). Cette stratégie, bien que très efficace, reste en revanche limitée par le fait qu'une mutation de l'ADNmt doit entraîner l'apparition d'un site de restriction spécifique d'une endonucléase. C'est pourquoi d'autres technologies ont été par la suite adressées vers les mitochondries, comme les ZFN (**Z**inc **F**inger **N**ucleases) ou les TALEN (**T**ranscription-**A**ctivator **L**ike **E**ffector **N**ucleases).

Utilisation de ZFN

Les nucléases à doigt de zinc (ZFN) sont des peptides constitués d'un domaine de liaison à l'ADN couplé à un domaine de restriction FokI. Le domaine de liaison à l'ADN est composé de motifs à doigt de zinc Cys2-His2 qui correspondent à une série de 34 acides aminés contenant un feuillet β antiparallèle et une hélice α stabilisés par un ion zinc. Chaque motif peut se lier à un triplet spécifique de nucléotides et un monomère de ZFN contient 3 à 9 motifs, ce qui permet une liaison spécifique à l'ADN. A l'extrémité C-terminale, on retrouve FokI, une endonucléase non-spécifique. Pour fonctionner, les ZFN utilisent souvent des domaines FokI hétérodimériques obligatoires. Ainsi, deux monomères de FokI différents doivent se trouver à proximité l'un de l'autre pour former un dimère et permettre le clivage

de l'ADN. Ces ZFN peuvent donc se lier à n'importe quelle séquence d'ADN grâce à l'ingénierie spécifique des domaines de liaison à l'ADN, et c'est pourquoi ils ont été utilisés pour cibler des ADNmt affectés par des mutations de l'ADNmt. En 2006, il a ainsi été démontré que des ZFN peuvent être adressés dans les mitochondries de cellules humaines grâce à l'ajout d'une préséquence d'adressage mitochondriale MTS (**Mitochondrial Targeting Sequence**) et d'un signal d'export nucléaire NES (**Nuclear Export Signal**) (Minczuk *et al.*, 2006). L'optimisation des séquences des mito-ZFN a mené à leur application sur des cellules cybrides contenant soit une délétion, soit une mutation ponctuelle dans le gène *MT-ATP6* associée à une syndrome NARP (Gammage *et al.*, 2014). Pour le cas d'une délétion, les monomères de ZFN se retrouvent en théorie à proximité l'un de l'autre uniquement sur l'ADNmt délété. Pour le cas d'une mutation ponctuelle, un des deux monomères se lie à la fois à l'ADNmt mutant et à l'ADNmt sauvage, tandis que le second monomère ne se lie qu'à l'ADNmt mutant. Afin d'évaluer l'effet de cette stratégie, les cellules transfectées avec les deux monomères ont été sélectionnées par cytométrie en flux. En effet, chaque construction plasmidique portant un monomère de ZFN exprime également un peptide fluorescent. La population sélectionnée correspond ainsi à celle qui présente les deux fluorescences. Ces expériences ont ainsi permis l'obtention d'une augmentation de la proportion d'ADNmt sauvage de 10% pour la mutation ponctuelle et de 60% pour la délétion, démontrant que les mito-ZFN sont capables de réduire drastiquement le taux d'hétéroplasmie dans des cellules cybrides. Plus récemment, l'utilisation des mito-ZFN a été optimisée pour obtenir une élimination presque complète d'un ADNmt mutant affecté par une mutation ponctuelle (Gammage *et al.*, 2016). Ainsi, en transfectant plusieurs fois des cellules cybrides, une diminution de l'hétéroplasmie de plus de 70% a pu être obtenue. Cependant, les auteurs ont remarqué que les traitements réalisés engendraient un grand nombre de clivage non spécifique de l'ADNmt sauvage, ce qui entraîne une déplétion très importante de la quantité d'ADNmt. Ces clivages non spécifiques sont en revanche moins fréquents lorsque les mito-ZFN sont exprimés de façon plus mesurée. Tenant compte de ce résultat, les auteurs ont utilisé une technologie originale pour contrôler l'expression des monomères de mito-ZFN. En effet, l'ajout d'un ribozyme combiné à un aptamère ARN sensible à la tétracycline après les gènes de mito-ZFN permet de contrôler leur expression par simple ajout de concentrations croissantes de cet antibiotique. Ces mito-ZFN optimisés semblent donc particulièrement prometteurs dans des stratégies qui visent à moduler le taux d'hétéroplasmie.

Utilisation de TALEN

Les TALEN constituent un autre type de protéines permettant un clivage ciblé de l'ADN. A l'image des ZFN, ces protéines sont constituées d'un domaine de liaison à l'ADN, le domaine TALE issu de la bactérie *Xanthomonas*, auquel est couplé un domaine de la nucléase FokI (**Figure 27**). Ici aussi, les domaines FokI doivent absolument se dimériser pour cliver l'ADN obligeant ainsi les monomères de TALEN à se fixer à proximité l'un de l'autre. La spécificité de liaison à l'ADN est quant à elle conférée par une série de répétitions en tandem de 34 acides aminés qui peut préférentiellement reconnaître chacun des 4 nucléotides en fonction de l'acide aminé présent en position 12 ou 13 de la répétition. En général, 15 à 22 domaines TALE sont utilisés pour un monomère de TALEN. La première utilisation de ces TALEN sur l'ADNmt a été réalisée en 2013, dans une lignée cybride contenant un ADNmt affecté par une large délétion d'environ 5kb (Bacman *et al.*, 2013). L'import de ces molécules a été permis par l'ajout de préséquences d'adressage mitochondrial (MitoTALEN). De façon similaire à ce qui a été réalisé pour les Mito-ZFN, les cellules co-transfectées ont été sélectionnées par cytométrie en flux grâce à l'expression de peptides fluorescents et le taux d'hétéroplasmie a été uniquement analysé dans la population sélectionnée. L'expression des deux monomères de mitoTALEN a ainsi permis l'observation d'une diminution importante de l'hétéroplasmie d'environ 40% dans les 48h suivant la transfection. Cette stratégie a ensuite été appliquée à un modèle cybride portant une mutation ponctuelle de l'ADNmt située dans le gène *MT-ND6* et liée à un syndrome de Leber. L'application de ces mitoTALEN sur les cellules cybrides a une nouvelle fois permis l'obtention de diminutions importantes de l'hétéroplasmie, stables dans le temps, démontrant ainsi l'efficacité de cette stratégie. Plus récemment, cette technologie a été appliquée à de nouveaux modèles : des ovocytes et des embryons de souris contenant deux haplotypes mitochondriaux BALB et NZB (Reddy *et al.*, 2015). Les résultats obtenus suggèrent que ces protéines pourraient être utilisées pour éliminer des génomes mitochondriaux mutants dans la lignée germinale et ainsi prévenir la transmission de maladies mitochondriales causées par des mutations de l'ADNmt. Il faut cependant noter que dans une expérience visant à comparer les efficacités de coupure spécifique des Mito-TALEN, Mito-ZFN et d'endonucléases de restriction (Gammage *et al.*, 2016), les mito-TALEN étaient incapables

de couper un ADNmt affecté par la mutation ponctuelle m.8993T>G alors que les Mito-ZFN et les endonucléases de restriction y parvenaient avec une efficacité comparable.

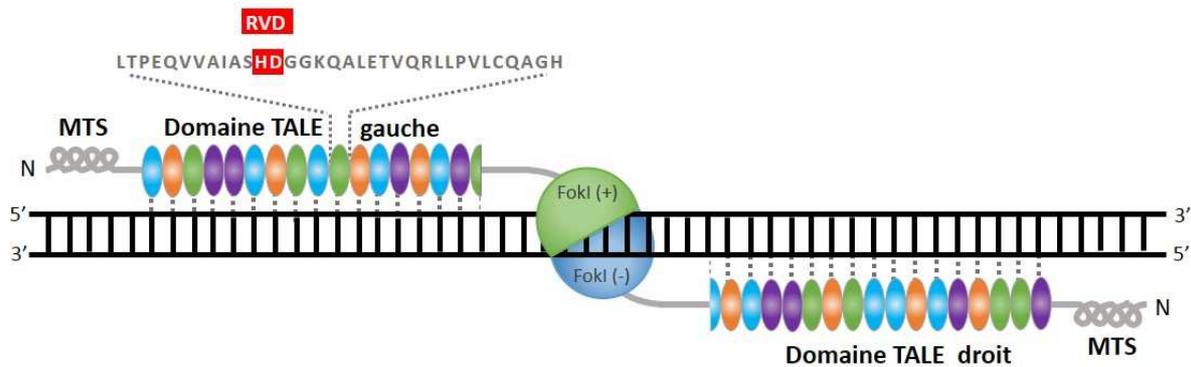


Figure 27. La reconnaissance et le clivage de l'ADN par les mitoTALEN.

Un monomère de mitoTALEN contient un domaine de reconnaissance de l'ADN TALE qui est constitué par un assemblage de 15 à 22 domaines (ovales colorés). Chaque domaine est composé d'une série de 34 acides aminés (en gris) et ce sont deux acides aminés en position 12 et 13 qui vont déterminer le nucléotide reconnu par le domaine. Chaque domaine TALE est couplé à une préséquence d'adressage mitochondrial (MTS) et à un monomère de l'enzyme FokI. L'association des deux mitoTALEN avec l'ADN à proximité l'un de l'autre permet la dimérisation de FokI qui peut alors cliver l'ADN.

La stratégie anti-génomique semble donc être une méthode efficace pour diminuer le taux d'hétéroplasmie au sein de cellules contenant des mutations de l'ADNmt. Pour cela, de nombreux outils d'édition du génome ont été adressés dans les mitochondries afin de couper spécifiquement l'ADNmt mutant, ce qui semble mener à sa dégradation. De façon similaire, nous pouvons imaginer que le même objectif pourrait être atteint grâce à l'adressage mitochondrial d'un puissant outil d'édition du génome : le système CRISPR/Cas9.

IV. L'outil d'édition du génome CRISPR/Cas

Avant 2013, l'édition du génome chez les mammifères reposait principalement sur l'utilisation de nucléases comme les ZFN et les TALEN qui permettent un clivage des deux brins de l'ADN à une position désirée et stimulent alors l'action de systèmes de réparation. Bien qu'ayant permis des progrès importants dans le domaine de la thérapie génique, l'utilisation de ces technologies reste cependant compliquée, nécessitant de longues étapes d'ingénierie coûteuses et finalement assez peu efficaces.

En 2013, l'outil CRISPR/Cas9 a fait une entrée fracassante dans ce domaine, s'imposant depuis lors comme la méthode d'édition du génome la plus simple à utiliser, la plus rapide à mettre en place, la plus précise dans son action, tout en restant très peu coûteuse. Mais avant de décrire cet outil et les nombreuses opportunités qu'il offre, débutons tout d'abord cette partie par un retour à l'origine de la technologie CRISPR/Cas9 : les systèmes d'immunité adaptative procaryotes CRISPR-Cas.

1. Les systèmes d'immunité adaptative CRISPR-Cas

A ce jour, près de 85% des archées et 45% des bactéries séquencées contiennent au moins un locus génomique particulier appelé CRISPR (**C**lustered, **R**egularly **I**nterspaced **S**hort **P**alindromic **R**epeats) (Barrangou and Marraffini, 2014). Pendant longtemps, la fonction de ce locus décrit pour la première fois il y a 25 ans (Mojica, Juez and Rodriguez-Valera, 1993) est restée une énigme. Cependant en 2005, trois groupes notèrent que certaines parties de ces locus présentaient des homologies avec de l'ADN exogène principalement retrouvé dans des virus ou des plasmides (Bolotin *et al.*, 2005; Mojica *et al.*, 2005; Pourcel, Salvignol and Vergnaud, 2005). C'est cette découverte qui a mené à la formulation d'une hypothèse plus tard confirmée : les locus CRISPR confèreraient une immunité adaptative aux organismes procaryotes (Makarova *et al.*, 2006).

Les systèmes CRISPR-Cas permettent en effet aux organismes bactériens et archées de se défendre contre la pénétration en leur sein d'acides nucléiques exogènes d'origine virale ou plasmidique (Barrangou *et al.*, 2007). Ceci est accompli par un clivage spécifique de l'ADN exogène, ou même parfois d'ARN exogène (Hale *et al.*, 2009), dans un processus qui nécessite lui-même la présence d'un ARN nommé **ARN CRISPR** (ARNcr). Pour cela, les organismes contiennent deux composants principaux : un locus génomique CRISPR qui sert de « mémoire

génétique » permettant la production des ARNcr et des protéines Cas (CRISPR-associated) qui sont les acteurs catalytiques du système.

Les locus CRISPR ont une organisation caractéristique à l'origine de leur nom (Jansen *et al.*, 2002). Ils sont en effet constitués d'une succession de petites séquences (de 23 à 40 nucléotides) répétées et très conservées appelées « repeats », qui sont séparées par des séquences uniques et variables de taille à peu près équivalente et nommées « spacers ». Le motif « repeat-spacer-repeat » peut être répété un grand nombre de fois au sein d'un même locus, mais la plupart d'entre eux en contiennent moins de 50. Ces locus CRISPR sont généralement précédés par une séquence riche en Adénine et en Thymines, appelée séquence « leader », qui contient des éléments promoteurs et des sites de liaison pour des protéines régulatrices (Alkhnbashi *et al.*, 2016).

A proximité de ces locus CRISPR, on retrouve souvent les gènes *cas* permettant la production des protéines Cas qui ont des fonctions diverses dans les systèmes CRISPR-Cas (Barrangou *et al.*, 2007). Six de ces gènes *cas* sont extrêmement conservés (*cas1* à *cas6*) mais seuls *cas1* et *cas2* sont présents de façon ubiquitaire au sein des organismes qui contiennent des locus CRISPR. L'organisation des gènes *cas* et les protéines qu'ils encodent ont permis d'établir une classification des systèmes CRISPR-Cas en deux classes, six types et plusieurs sous-types (Makarova *et al.*, 2015). La classe 1 regroupe les systèmes CRISPR-Cas dont l'activité catalytique de clivage de l'ADN exogène est réalisée par un complexe ribonucléoprotéique constitué de plusieurs protéines Cas. Les systèmes CRISPR-Cas de classe 2 reposent quant à eux sur l'utilisation d'un complexe ribonucléoprotéique ne contenant qu'une seule protéine Cas.

Le mécanisme de défense CRISPR-Cas peut être décrit en trois grandes étapes (Hille and Charpentier, 2016). Pour des raisons de clarté, je vais ici me concentrer uniquement sur le système CRISPR-Cas de type II qui appartient à la classe 2 (**Figure 28**).

La première étape dans tous les systèmes CRISPR-Cas est l'adaptation (encore appelée étape d'acquisition du spacer). Dans cette étape, un petit fragment d'ADN exogène nommé « protospacer » et venant d'un phage ou d'un plasmide, est incorporé dans le locus CRISPR au niveau de la séquence leader, formant alors un nouveau spacer (Barrangou *et al.*, 2007). Cette étape permet ainsi à l'organisme hôte de mémoriser une partie de matériel génétique

exogène. Ce processus, qui semble impliquer de façon quasi-ubiquitaire les endonucléases Cas1 et Cas2, n'est pas un phénomène aléatoire. En effet, dans le système CRISPR-Cas de type II, la présence d'une petite séquence très conservée de 2 à 5 nucléotide nommée PAM (**P**rotospacer **A**djacent **M**otif) située en aval du protospacer est cruciale pour son acquisition (Mojica *et al.*, 2009).

La seconde étape du système CRISPR-Cas consiste en la biogénèse des ARNcr et leur intégration dans le complexe ribonucléoprotéique effecteur. Dans cette étape, le locus CRISPR est transcrit en un long **ARN précurseur** (pré-ARNcr) qui va ensuite subir plusieurs étapes de maturation pour produire les petits ARNcr. Dans le système de type II, ce processus de maturation implique l'expression d'un **ARN CRISPR transactivateur** (ARNtracr) dont le gène est situé à proximité du locus CRISPR (Deltcheva *et al.*, 2011). Celui-ci va s'hybrider à chaque séquence répétée située sur le pré-ARNcr formant ainsi une structure ARN double brin stabilisée par la nucléase Cas9. Cette structure particulière va alors induire un clivage par la RNase III qui permet l'obtention d'un fragment d'ARNcr pré-mature contenant un spacer flanqué en 5' et en 3' par une partie des domaines repeat. Après clivage, l'ARNtracr va rester hybridé à l'ARNcr et c'est ce duplex qui va pouvoir s'associer à la nucléase Cas9. Dans ce complexe, l'ARNcr pré-mature va alors subir une nouvelle étape de maturation supprimant le domaine repeat situé en 5' de cet ARN. L'ARNcr mature est donc composé d'un spacer flanqué en 3' par une partie d'un domaine repeat. Le complexe ribonucléoprotéique effecteur comprend la nucléase Cas9 ainsi que le duplex ARNtracr-ARNcr.

Enfin, la dernière étape du système CRISPR-Cas est l'étape d'interférence qui va mener au clivage et à la dégradation de l'ADN exogène précédemment mémorisé. Dans cette étape l'ARNcr sert de guide à la nucléase Cas9 en reconnaissant et en se liant de façon complémentaire aux acides nucléiques exogènes qui sont en général des ADN double-brins (Garneau *et al.*, 2010). Pour éviter de cibler son propre génome, le système CRISPR-Cas de type II va reconnaître spécifiquement la séquence PAM située sur l'ADN exogène en aval du protospacer. Cette séquence ne peut en effet pas être retrouvée en aval du spacer au sein du locus CRISPR. Lorsque le complexe ribonucléoprotéique ARNcr-ARNtracr-Cas9 a reconnu une séquence PAM et s'est hybridé de façon spécifique à l'ADN exogène, il peut alors induire un clivage double-brin de sa cible.

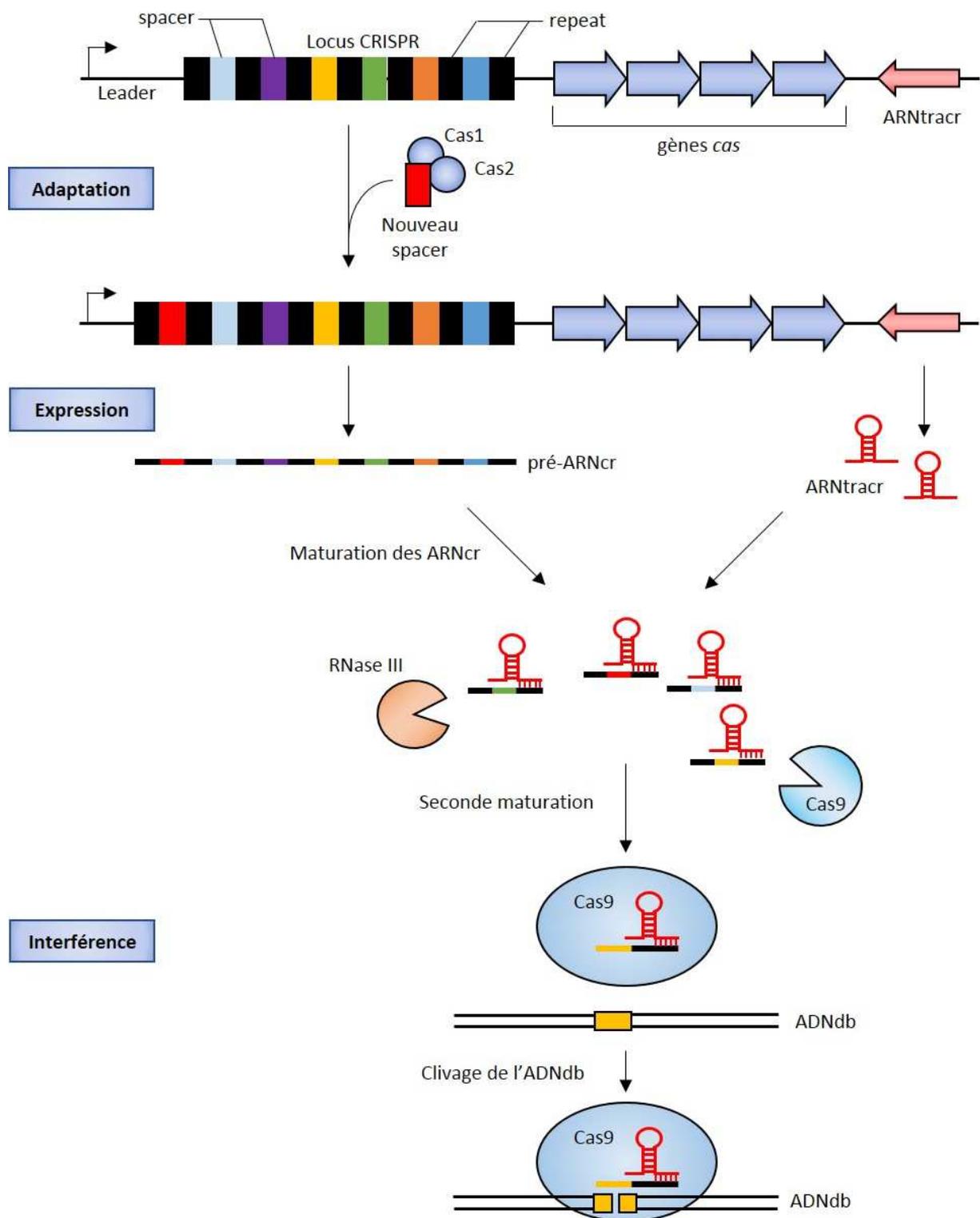


Figure 28. Les trois étapes du système d'immunité adaptative CRISPR-Cas de type II.

Schéma des trois étapes du système d'immunité adaptative CRISPR-Cas de type II. Les protéines Cas1 et Cas2 exprimées depuis les gènes cas permettent l'insertion de nouveaux spacers dans le locus CRISPR. L'expression de ce locus mène à un long pré-ARNcr qui, grâce à l'hybridation des ARNtracr, va être coupé pour donner des petits ARNcr matures. Les duplex ARNcr-ARNtracr s'associent à l'endonucléase Cas9. Dans l'étape d'interférence, les complexes ribonucléoprotéiques Cas9-ARNcr-ARNtracr vont reconnaître un ADN double brin exogène par complémentarité de séquence et le cliver. Adaptée de (Westra, Buckling and Fineran, 2014).

2. L'outil d'édition du génome CRISPR-Cas9

L'outil d'édition du génome CRISPR-Cas9 est directement issu de ces systèmes d'immunité adaptative et de leur étude, et en particulier du système CRISPR-Cas de type II. Une étude de 2012 menée conjointement par les groupes de Jennifer Doudna et Emmanuelle Charpentier a posé les bases de cet outil (Jinek *et al.*, 2012). Leurs expériences ont en effet permis de reconstituer *in vitro* un complexe ribonucléoprotéique ARNcr-ARNtracr-Cas9, capable de couper de façon spécifique un ADN purifié. De plus, ils démontrèrent dans cette étude que l'ARNcr et l'ARNtracr peuvent être fusionnés en un seul ARN guide (l'ARN single-guide, ARNsg) qui conserve sa fonction et sa capacité à interagir avec la nucléase Cas9.

La technologie d'édition du génome CRISPR-Cas9 la plus utilisée à ce jour repose ainsi uniquement sur l'introduction dans une cellule de ces deux éléments : l'endonucléase Cas9 issue de l'organisme *Streptococcus pyogenes* et un ARNsg qui cible une séquence d'intérêt.

L'ARNsg a généralement une taille d'environ 120 nucléotides (**Figure 29A**) (Jinek *et al.*, 2012). Les vingt premiers nucléotides correspondent au protospacer de l'ARNcr et dirigent la nucléase Cas9 vers l'ADN ciblé grâce à la complémentarité des deux séquences. Ces vingt nucléotides sont ensuite suivis d'une structure en tige-boucle qui correspond au duplex ARNcr-ARNtracr. Le reste de l'ARNsg correspond à l'ARNtracr qui présente trois structures en tige-boucle caractéristiques nommées tige-boucle 1, 2 et 3. Dans le système CRISPR-Cas de type II de l'organisme *S.pyogenes*, la séquence ciblée sur l'ADN doit être immédiatement suivie par une séquence PAM de la forme 5'-NGG-3', qui n'est pas présente sur l'ARNsg. L'outil CRISPR-Cas9 peut donc en théorie cibler n'importe quelle séquence du type 5'-N₂₀-NGG-3' par simple modification des vingt premiers nucléotides de l'ARNsg. Souvent, les ARNsg sont exprimés depuis un plasmide, grâce à un promoteur externe de l'ARN polymérase III qui requiert en général la présence d'une guanine en position +1. Dans ce cas, on peut considérer que l'outil CRISPR-Cas9 peut cibler toute séquence qui suit le format 5'-GN₂₀-GG-3' (Mali *et al.*, 2013).

L'endonucléase Cas9 de *S.pyogenes* est une très grande protéine (1368 acides aminés) comportant deux lobes : un lobe de reconnaissance (REC) et un lobe nucléasique (NUC) (**Figure 28B**) (Jiang and Doudna, 2017). Le lobe NUC contient les deux domaines nucléasiques HNH et RuvC qui clivent respectivement le brin d'ADN complémentaire à l'ARNsg et le brin d'ADN

C'est en effet la fixation de l'ARNsg par la nucléase Cas9 qui va induire un changement de conformation de cette protéine et en particulier une réorganisation du domaine C-terminal, permettant alors la reconnaissance de la séquence PAM et une augmentation de l'affinité pour l'ADN (Jinek *et al.*, 2014). Cette interaction est surtout dépendante de la tige-boucle ARNcr-ARNtracr et de la tige-boucle 1. Les tiges-boucles 2 et 3 semblent quant à elles participer très peu à cette interaction. Il a d'ailleurs été montré que des ARNsg dépourvus de tiges-boucles 2 et 3 peuvent toujours conduire à un clivage spécifique de l'ADN *in vitro*, tandis que la délétion de la boucle 1 abolit complètement ce clivage (Jinek *et al.*, 2012). En revanche, *in vivo*, la délétion des tiges-boucles 2 et 3 affecte cette efficacité de clivage (Nishimasu *et al.*, 2014).

Les complexes Cas9-ARNsg ainsi formés vont pouvoir s'associer à l'ADN à la recherche de séquences PAM (**Figure 30**). Lorsqu'il n'y a pas de séquence PAM, les complexes se dissocient rapidement de l'ADN. En revanche, quand une séquence PAM se trouve au niveau du site de fixation des complexes Cas9-ARNsg, cela déclenche la fusion locale de l'ADN et l'hybridation progressive de l'ARN guide (Szczelkun *et al.*, 2014). Plusieurs expériences ont démontré le rôle très important des nucléotides qui sont situés immédiatement en amont de la séquence PAM. En effet, les 10 à 12 nucléotides adjacents constituent la « seed sequence » qui confère la spécificité de clivage des complexes Cas9-ARNsg. Des mésappariements au sein de cette seed sequence vont altérer sévèrement, voire empêcher complètement, le clivage de l'ADN. En revanche, une très forte similarité au niveau de cette région pourra permettre une liaison non spécifique de l'ADN même si de nombreux mésappariements se situent dans le reste de l'hybride ARN-ADN. L'hybridation parfaite de la seed sequence à l'ADN permet alors l'activation de l'endonucléase Cas9 qui génère une coupure 3pb en amont de la séquence PAM sur chaque brin d'ADN grâce à ses domaines HNH et RuvC (Nishimasu *et al.*, 2014). Après clivage, la nucléase Cas9 semble rester fixée sur l'ADN clivé jusqu'à ce que d'autres facteurs cellulaires la déplacent pour la recycler (Sternberg *et al.*, 2014).

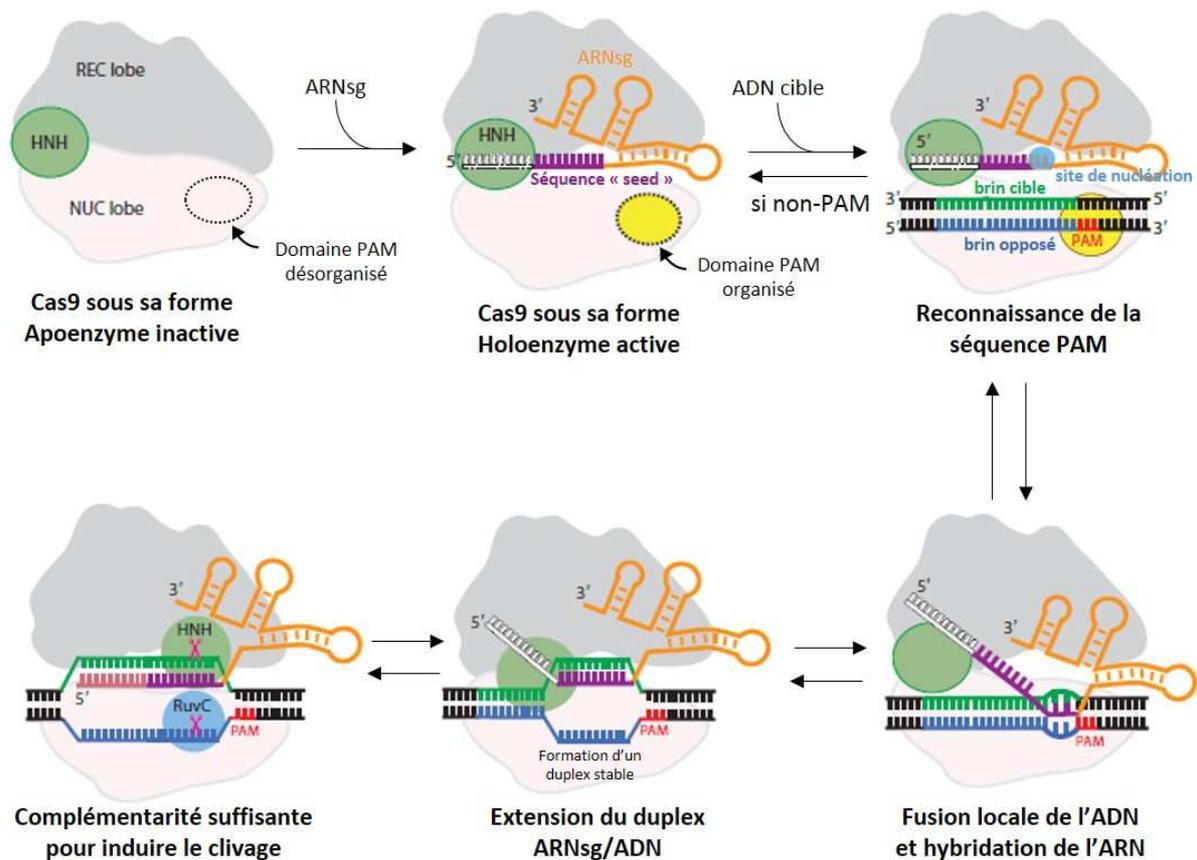


Figure 30. Mécanisme de reconnaissance et de clivage de l'ADN par CRISPR-Cas9.

La fixation de l'ARNsg par la nucléase Cas9 entraîne de larges changements de conformation de cette protéine. Le domaine C-terminal (cercle en pointillés) devient alors structuré pour reconnaître la séquence PAM (Protoadjacent-motif). Lorsqu'une séquence PAM est trouvée sur l'ADN, l'ARNsg peut s'hybrider à l'ADN adjacent par complémentarité de bases. Si un duplex stable se forme, de nouveaux changements conformationnels ont lieu, menant à un clivage des deux brins de l'ADN par les domaines HNH et RuvC. Lobe NUC = Lobe Nucléasique ; Lobe REC = Lobe de Reconnaissance. Adaptée de (Jiang et Doudna, 2017).

3. Les différentes applications de l'outil CRISPR-Cas9

Dans les mois qui suivirent la description de la fonction moléculaire de l'endonucléase Cas9 et la possibilité de l'utiliser pour induire un clivage spécifique de l'ADN *in vitro* (Jinek *et al.*, 2012), plusieurs publications démontrèrent que cette technologie pouvait être utilisée pour modifier spécifiquement le génome de cellules humaines (Mali *et al.*, 2013), de bactéries ou encore d'embryons de poissons-zèbre (Hwang *et al.*, 2013). Par la suite, l'application de l'outil CRISPR-Cas9 a été étendue à de nombreux modèles cellulaires et des organismes variés.

L'application la plus simple de cette technologie pour éditer le génome consiste à cibler spécifiquement un locus d'intérêt en modifiant l'ARNsg pour inactiver un gène (Mali *et al.*,

2013). Le complexe Cas9-ARNsg résultant induit alors une coupure ciblée de l'ADNdb qui pourra être réparée par la voie de réparation NHEJ. Comme celle-ci est une voie de réparation mutagène, elle va entraîner l'apparition de petites insertions ou délétions qui, en fonction de la région ciblée, pourront inactiver un promoteur ou induire un décalage du cadre de lecture (**Figure 31A**).

La technologie CRISPR-Cas9 offre également la possibilité d'introduire plusieurs coupures en parallèle au niveau de sites distincts. Grâce à cela, des délétions plus ou moins grandes de l'ADN entre les deux coupures peuvent être obtenues (**Figure 31C**) (Cong *et al.*, 2013), ainsi que des inversions ou des translocations de séquences (Torres *et al.*, 2014). L'édition du génome peut également être plus précise en utilisant une voie de réparation par homologies. Dans ce cas, l'introduction des complexes Cas9-ARNsg est réalisée de façon conjointe avec un fragment d'ADN donneur qui contient des séquences homologues aux séquences situées de part et d'autre du site de coupure. La voie de réparation utilise alors cet ADN donneur comme matrice, ce qui permet l'intégration de nouvelles séquences dans le locus d'intérêt, à l'image d'étiquettes particulières ou de mutations (**Figure 31B**). Cette stratégie est en revanche bien moins efficace que celle utilisant la voie de réparation NHEJ.

L'édition du génome par l'outil CRISPR-Cas9 repose sur l'introduction d'une coupure de l'ADN double brin. Cette coupure est réalisée grâce aux deux domaines HNH et RuvC. Or, ces deux domaines peuvent être très simplement inactivés par mutagenèse produisant alors une protéine Cas9 catalytiquement non fonctionnelle (dCas9, **deadCas9**). Ceci a permis le développement de toute une série d'applications qui utilisent la capacité des complexes dCas9-ARNsg à se lier spécifiquement à une séquence d'ADN.

La protéine dCas9 peut ainsi être utilisée pour contrôler l'expression de certains gènes. Pour cela, le complexe dCas9-ARNsg peut cibler une région promotrice et s'y fixer sans clivage. L'encombrement stérique ainsi généré empêche la fixation de l'ARN polymérase sur le promoteur, altérant l'expression du gène d'intérêt (Bikard *et al.*, 2013). Une répression encore plus robuste peut être également obtenue en fusionnant la protéine dCas9 à un répresseur transcriptionnel (**Figure 31D**) (Gilbert *et al.*, 2013). Au contraire, la fusion d'un activateur de transcription avec la protéine dCas9 et l'utilisation d'un ARNsg ciblant une région située en amont d'une séquence promotrice permet d'activer spécifiquement la transcription d'un gène d'intérêt (**Figure 31E**) (Gilbert *et al.*, 2013). Les complexes dCas9-ARNsg peuvent donc être

utilisés pour recruter spécifiquement diverses protéines au niveau de séquences d'intérêts, comme par exemple des enzymes de modification de l'ADN (**Figure 31F**).

Une autre application repose sur l'utilisation d'une fusion entre dCas9 et la protéine de fluorescence verte GFP (**Green Fluorescent Protein**). Ainsi, en adressant plusieurs complexes dCas9-GFP-ARNsg sur un locus génomique précis (au moins 30 ARNsg doivent être utilisés), il est possible de le localiser au sein du noyau et de le suivre au cours du temps (**Figure 31G**) (Chen and Huang, 2014).

En 2014, une étude a également démontré qu'il est possible de cibler de l'ARN simple brin avec les complexes Cas9-ARNsg grâce à l'ajout d'un petit oligonucléotide ADN, complémentaire à l'ARN ciblé et contenant la séquence PAM (PAMmer). Le complexe Cas9-ARNsg-PAMmer peut alors se fixer sur l'ARN et le cliver (O'Connell *et al.*, 2014).

Utilisant ce large éventail d'applications et la capacité qu'offre la technologie CRISPR-Cas9 de les utiliser simultanément dans une même cellule, les chercheurs en biologie synthétique ont également la possibilité de construire des circuits génétiques synthétiques (Jusiak *et al.*, 2016).

La technologie CRISPR-Cas9 offre donc de nombreuses possibilités en termes d'édition du génome, mais aussi dans la régulation de son expression ou encore dans sa visualisation. Ces dernières années, son application pour éditer le génome nucléaire d'organismes variés a largement démontré sa grande efficacité. En revanche, principalement à cause des difficultés éprouvées pour importer les ARNsg au sein des mitochondries, il n'a toujours pas été adapté à une manipulation du génome mitochondrial.

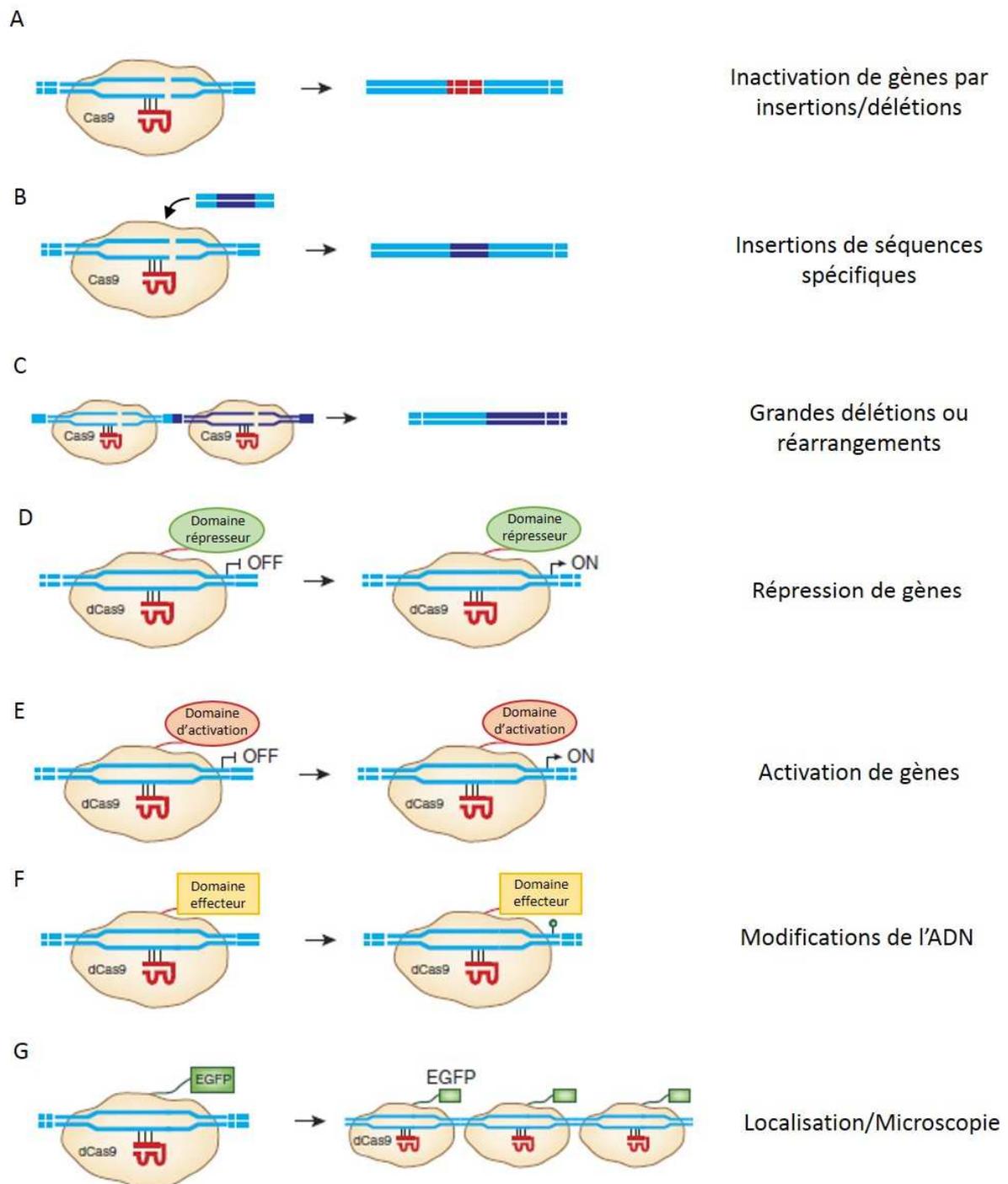


Figure 31. Les différentes applications de la technologie CRISPR-Cas9.

Le système CRISPR-Cas9 peut être utilisé pour introduire des insertions/délétions (A) ou des séquences spécifiques (B). Plusieurs coupures en parallèle permettent l'obtention de grandes délétions, ou stimulent des réarrangements (inversions ou translocations) (C). La nucléase Cas9 inactive (dCas9), peut être fusionnée à un domaine répresseur pour réprimer l'expression de gènes (D), à un domaine activateur pour activer l'expression de gènes (E), à des domaines de modification pour modifier l'ADN ou les protéines environnantes (F), ou à des protéines fluorescentes pour visualiser des locus génomiques spécifiques. Adaptée de (Sander and Joung, 2014).

Projet de Thèse

Mon projet de thèse s'inscrit dans la lignée des travaux du laboratoire visant à exploiter les voies naturelles d'import mitochondrial d'ARN dans le but de développer des stratégies de thérapie génique de maladies provoquées par des mutations de l'ADNmt.

Dans une première partie, j'ai poursuivi le développement de la stratégie anti-répliquative exploitant la voie d'adressage mitochondrial de l'ARNr 5S. Les données obtenues par l'équipe suggèrent que l'expression d'ARNr 5S recombinants contenant un insert anti-répliquatif permet de diminuer le taux d'hétéroplasmie de cellules cybrides contenant un ADNmt affecté par une large délétion. Cet effet a été obtenu malgré une expression très faible des ARNr 5S anti-répliquatifs. Ainsi, mon projet de thèse, dans la continuité de ces travaux, présentait plusieurs objectifs :

- i) Modéliser et sélectionner de nouveaux ARNr 5S recombinants dont l'effet anti-répliquatif pourrait être plus important.
- ii) Créer des lignées cellulaires cybrides stables permettant une plus forte expression des ARNr 5S recombinants pour obtenir des diminutions stables et significatives du taux d'hétéroplasmie.
- iii) Essayer d'étendre cette stratégie anti-répliquative utilisant l'ARNr 5S comme vecteur d'import mitochondrial à une mutation ponctuelle de l'ADNmt.

Dans une seconde partie, mon projet de thèse visait à initier le développement d'une stratégie anti-génomique innovante reposant sur l'adressage mitochondrial des composants du système CRISPR/Cas9 afin de cliver spécifiquement les génomes mitochondriaux mutants et ainsi moduler le taux d'hétéroplasmie de cellules cybrides. Pour cela, j'avais donc plusieurs objectifs :

- i) Adresser les différents composants de l'outil CRISPR/Cas9 (des ARNsg et la nucléase Cas9) au sein des mitochondries de cellules humaines.
- ii) Etudier les capacités de clivage de l'ADNmt par l'outil CRISPR/Cas9 *in vitro* et au sein de lysats mitochondriaux.
- iii) Analyser l'impact de ce système CRISPR/Cas9 mitochondrial sur l'ADNmt dans des cellules humaines en culture.

Résultats Expérimentaux

Partie I

**Développement d'une stratégie anti-réplivative
exploitant la voie d'adressage mitochondrial de l'ARNr 5S**

I. Optimisation de la stratégie anti-répllicative ciblant un ADNmt affecté par une large délétion

Au vu des résultats prometteurs obtenus par le laboratoire dans l'application d'une stratégie anti-répllicative utilisant l'ARNr 5S comme vecteur d'import mitochondrial, j'ai consacré la première partie de mon projet à l'optimisation de cette stratégie afin d'obtenir un effet plus prononcé sur l'hétéroplasmie de cellules contenant un ADNmt affecté par une large délétion.

1. Modèle d'étude

La mutation modèle utilisée dans le développement de cette stratégie est une large délétion de 7075pb (nucléotides 8363 à 15438) liée à un syndrome de type Kearns Sayre Shy (KSS) (**Figure 32**). Cette délétion entraîne la disparition de 9 gènes structuraux (*MT-ATP8*, *MT-ATP6*, *MT-CO3*, *MT-ND3*, *MT-ND4L*, *MT-ND4*, *MT-ND5*, *MT-ND6* et une partie de *MT-CYB*) ainsi que 6 gènes d'ARNt (*MT-TG*, *MT-TR*, *MT-TH*, *MT-TS2*, *MT-TL2* et *MT-TE*). Caractérisée dans le laboratoire d'Anne Lombès (Institut Cochin, Paris), elle a été identifiée chez un patient âgé de 15 ans présentant une surdité légère, une ophtalmoplégie, un ptosis et des difficultés à la marche. L'examen clinique a quant à lui révélé une ataxie modérée et une faiblesse musculaire avec amyotrophie (Comte *et al.*, 2013).

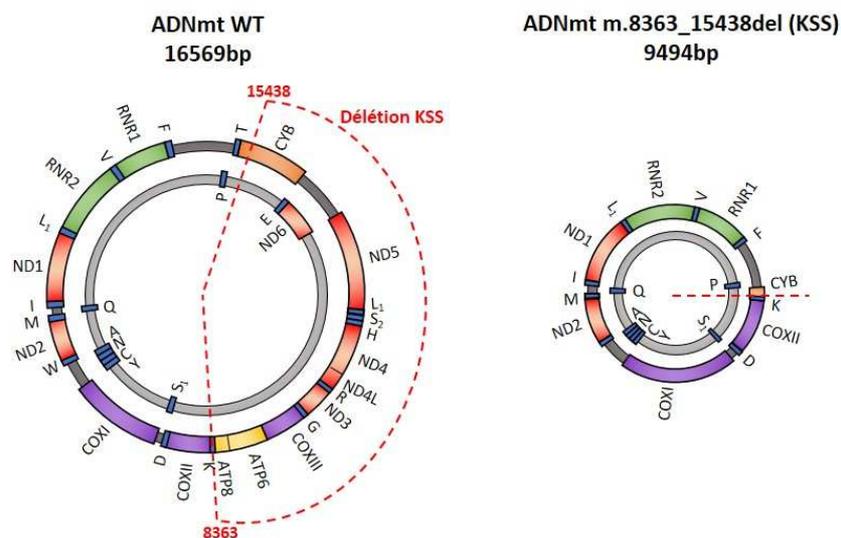


Figure 32. Comparaison de l'ADNmt sauvage et de l'ADNmt affecté par la délétion KSS.

A gauche, carte de l'ADNmt sauvage (WT). La partie de l'ADNmt délétée dans la mutation KSS ainsi que les bornes de la délétion sont indiquées par les pointillés rouges. A droite, carte de l'ADNmt mutant KSS. La jonction des bornes de la délétion est indiquée par des pointillés rouges. La délétion entraîne la disparition de 9 gènes structuraux et 6 gènes d'ARNt. La nomenclature utilisée est la même que dans la **Figure 5**.

Toutes les expérimentations concernant cette mutation ont été réalisées sur une lignée cellulaire cybride transmitochondriale issue de la fusion de cytoplastes provenant du patient précédemment décrit avec des cellules d'ostéosarcome 143B dépourvues d'ADNmt. Les cellules immortalisées résultantes contiennent ainsi environ 65% d'ADNmt affectés par la délétion KSS et sont caractérisées par une diminution de leur consommation d'oxygène de $10\pm 2\%$ par rapport à la lignée initiale 143B.

2. Modélisation et sélection des ARNr 5S recombinants anti-réplicatifs

2.1. Production d'une banque d'ARNr 5S recombinants anti-réplicatifs

En vue de l'optimisation de la stratégie anti-réplivative, mon premier objectif consistait à modéliser de nouveaux ARNr 5S recombinants (5Srec) ciblant spécifiquement l'ADNmt mutant KSS. Par cette étape, je souhaitais tout particulièrement sélectionner des molécules dont l'efficacité d'hybridation à l'ADNmt KSS et la capacité de discrimination entre les deux génomes (mutant KSS et WT) seraient élevées. Le respect de ces deux critères devrait en effet permettre l'obtention d'un effet anti-réplivative important et par conséquent une diminution significative du taux d'hétéroplasmie au sein des cellules cybrides.

Dans ce but, j'ai créé *in silico* une banque de 5Srec contenant chacun un insert d'une taille de 10 à 25 nucléotides, complémentaire au brin H ou au brin L du génome mitochondrial KSS (**Figure 33**). Concrètement, et à titre d'exemple, une séquence de 10 nucléotides qui correspond au brin H de l'ADNmt mutant et dont la première base à l'extrémité 5' est une des bornes de la délétion KSS, constitue un premier oligonucléotide anti-réplivative. La série d'inserts de 10 bases du brin H (la série nommée « 5S-KSS-10H ») est obtenue par incréments successifs d'un nucléotide, amenant à une banque de 9 inserts anti-réplicatifs. Le même processus est effectué pour le brin L de l'ADNmt KSS, ainsi que pour toutes les tailles d'oligonucléotides de 10 à 25 bases. Pour créer la banque de 5Srec, chaque oligonucléotide anti-réplivative est ensuite inséré en lieu et place de la partie distale (nucléotides 28 à 51) du domaine β de l'ARNr 5S, qui a été démontrée comme non-nécessaire à l'import mitochondrial de cette molécule. Par ce procédé, j'ai ainsi constitué une banque de plusieurs centaines de 5Srec pouvant en théorie cibler l'ADNmt affecté par la large délétion KSS.

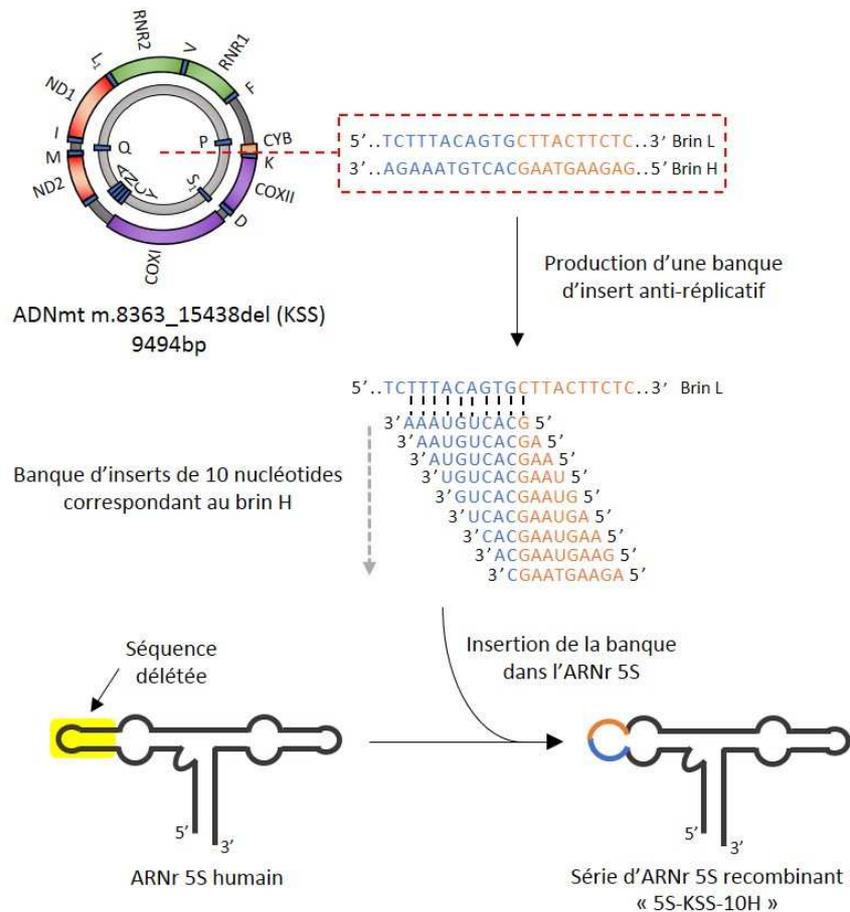


Figure 33. Stratégie de production *in silico* de la banque d'ARNr 5S recombinants.

L'ADNmt KSS contient une séquence à la jonction des bornes de la délétion qui n'est pas retrouvée dans l'ADNmt WT. Ici, une série de 9 inserts de 10 nucléotides qui correspondent au brin H de l'ADNmt KSS est obtenue par incrément successif d'un nucléotide. Chacun de ces inserts est ensuite inséré dans la séquence de l'ARNr 5S en lieu et place de la région du domaine β non nécessaire à l'import mitochondrial. Ce processus permet l'obtention d'une banque d'ARNr 5S recombinants contenant chacun un insert de 10 nucléotides ciblant spécifiquement le brin L de l'ADNmt KSS, c'est la série nommée « 5S-KSS-10H ». Le même procédé est réalisé pour cibler le brin H et pour des tailles d'insert de 10 à 25 nucléotides.

2.2. Sélection des ARNr 5S recombinants anti-réplicatifs

Comme nous ne nous plaçons pas dans une approche à haut-débit visant à évaluer l'effet de chacun des 5Srec de la banque produite *in silico* sur le taux d'hétéroplasmie des cellules cybrides *in vivo*, j'ai par la suite souhaité sélectionner les ARNr 5S recombinants les plus appropriés pour le développement de la stratégie anti-répliative. Pour cela, j'ai réalisé une série d'analyses bio-informatiques de l'ensemble des molécules de la banque de 5Srec. Dans un souci de clarté, je ne présenterai ici que les données obtenues pour les molécules que

j'ai choisies pour la suite des expériences et, à titre de comparaison, celles obtenues pour les molécules 5S-KSS-13H et 5S-KSS-14L décrites dans l'étude précédente.

La première étape de cette sélection a reposé sur l'analyse des températures de fusion (T_m) des molécules anti-répliquatives vis-à-vis des génomes mitochondriaux KSS et WT déterminées au moyen de l'outil *OligoAnalyzer 3.1* (IDT-DNA) (**Tableau 3**). Deux critères de sélection ont été appliqués afin de conserver les 5Srec qui pourraient permettre un effet anti-répliquatif spécifique et efficace :

- Tout d'abord, un T_m vis-à-vis de l'ADNmt KSS supérieur à la température physiologique de 37°C retrouvée au sein des cellules humaines.
- Puis, un écart de température suffisamment grand ($\Delta T_m \geq 10^\circ\text{C}$) entre le T_m obtenu pour l'ADNmt KSS et ceux déterminés vis-à-vis de l'ADNmt WT au niveau de chacune des bornes de la délétion KSS.

5Srec	Hybridation ADNmt KSS	T_m ADNmt KSS	Hybridation ADNmt WT (borne 5')	T_m ADN WT (borne 5')	Hybridation ADNmt WT (borne 3')	T_m ADN WT (borne 3')
5S-KSS-13H	15 b	52,1°C	8 b	17,3°C	8 b	27,3°C
5S-KSS-14L	14 b	45,2°C	7 b	15,6°C	8 b	15,5°C
5S-KSS-15H	17 b	56,6°C	10 b	31,7°C	8 b	27,3°C
5S-KSS-15L	15 b	48,9°C	6 b	9,0°C	10 b	27,6°C
5S-KSS-17H	18 b	58,9°C	9 b	23,7°C	10 b	41,3°C
5S-KSS-20H	20 b	62,8°C	10 b	31,8°C	11 b	45,6°C
5S-KSS-21L	22 b	51,4°C	9 b	22,8°C	14 b	39,9°C
5S-KSS-23H	23 b	68,3°C	12 b	44,3°C	12 b	51,2°C
5S-KSS-24L	26 b	56,3°C	11 b	31,8°C	16 b	46,1°C

Tableau 3. Prédiction de T_m des inserts anti-répliquatifs vis-à-vis des ADNmt KSS et WT.

Les températures de fusion (T_m) ont été déterminées grâce au programme *Oligo Analyzer 3.1* (IDT-DNA). Le nombre de bases participant à l'hybridation avec l'ADNmt KSS ou avec les séquences de l'ADN WT situées au niveau des bornes de la délétion KSS est indiqué (b = bases).

Il faut ici noter que les T_m ont été déterminés en considérant les inserts anti-répliquatifs au sein de l'ARNr 5S. En effet, pour de nombreux 5Srec, les nucléotides situés de part et d'autre de l'insert peuvent participer à l'hybridation de ces molécules aux ADNmt KSS ou WT et donc avoir un impact sur le calcul des T_m . De plus, nous pouvons remarquer que la sélection

des 5Srec est davantage basée sur le ΔT_m , plutôt que sur le fait de présenter un T_m vis-à-vis de l'ADNmt KSS supérieur à 37°C et des T_m vis-à-vis de l'ADNmt WT inférieurs à 37°C. La plupart des molécules sélectionnées ont d'ailleurs au moins un de leur T_m par rapport à l'ADNmt WT supérieur à cette température. Ce choix s'est basé sur plusieurs résultats d'hybridation *in vitro* obtenus précédemment par l'équipe qui suggèrent que le ΔT_m est le critère de première importance pour obtenir une discrimination efficace entre les génomes mutants et sauvages (Tonin et al, 2014). Les 5Srec respectant ces deux critères devraient donc en théorie pouvoir s'hybrider efficacement à l'ADNmt KSS et permettre une discrimination efficace entre les deux types de génome à température physiologique.

Ensuite, dans une seconde étape de sélection, j'ai analysé les structures des différents 5Srec que j'ai obtenus grâce au programme de prédiction de structures secondaires *RNA Folding form* du serveur Mfold (**Figure 34**). Au cours de cette analyse, j'ai choisi en particulier les 5Srec qui respectent les critères suivants :

- Tout d'abord, la présence de l'insert anti-répliatif au sein du domaine β ne doit pas entraîner une trop forte instabilité de la structure de l'ARNr 5S qui se reflète par la prédiction de nombreuses structures secondaires alternatives.
- Ensuite, le motif structural d'interaction avec le facteur de transcription TFIIIA, qui permet l'expression et l'export nucléaire de l'ARNr 5S, doit être préservé au sein des 5Srec.
- Puis, puisque nous souhaitons que ces molécules soient à proximité de l'ADNmt au sein des cellules cybrides, les déterminants structuraux d'import mitochondrial situés dans les domaines α et γ doivent être intacts.
- Enfin, l'insert anti-répliatif ne doit pas être trop structuré car cela pourrait diminuer l'efficacité d'hybridation spécifique au génome mitochondrial KSS.

Les 5Srec qui respectent l'ensemble de ces critères devraient ainsi pouvoir être exprimés depuis le génome nucléaire des cellules cybrides, puis être exportés du noyau et importés dans les mitochondries où ils pourront interagir spécifiquement avec le génome mitochondrial mutant.

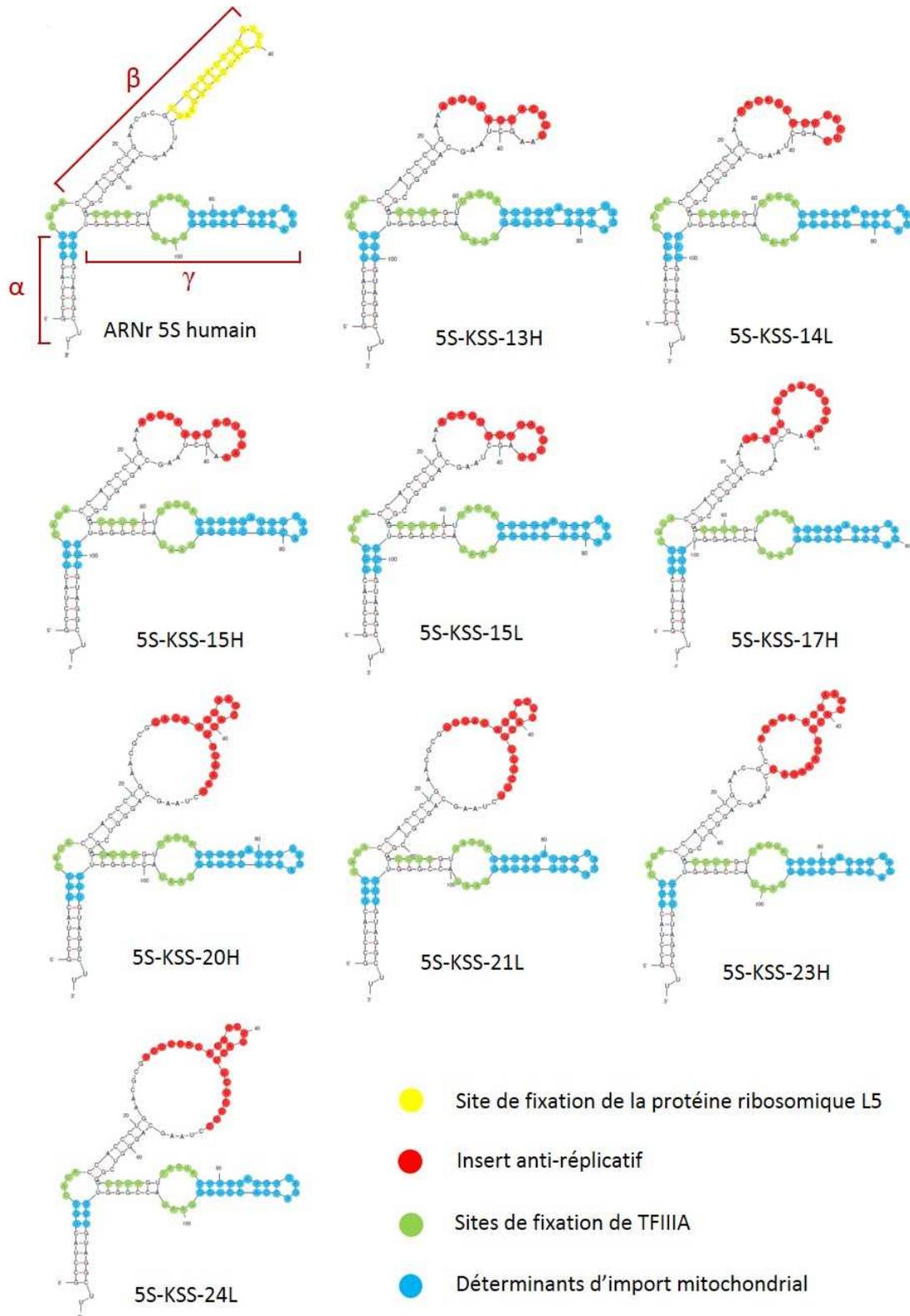


Figure 34. Structures secondaires de l'ARNr 5S humain et des 5Srec ciblant l'ADNmt KSS.

Les structures secondaires ont été prédites au moyen du programme *RNA Folding form* du serveur Mfold. Les différents motifs d'interaction ainsi que l'insert anti-réplicatif sont indiqués sur les structures obtenues.

Ces étapes d'analyse bio-informatique m'ont ainsi mené à sélectionner sept nouveaux ARNr 5S recombinants dont les caractéristiques semblent appropriées pour leur utilisation dans une stratégie anti-répllicative.

3. Etude de la spécificité d'hybridation des ARNr 5S recombinants *in vitro*

Les sept 5Srec choisis devraient donc, d'après les analyses *in silico*, s'hybrider préférentiellement à l'ADNmt KSS. Afin de confirmer ces prédictions bio-informatiques, j'ai ensuite voulu étudier la capacité d'hybridation spécifique des différents ARN anti-répliatifs *in vitro*.

Pour cela, j'ai synthétisé les 5Srec par transcription *in vitro* et je les ai marqués radioactivement au ^{32}P à leur extrémité 5'. Chacune de ces molécules a ensuite été mise au contact d'une membrane de nylon sur laquelle ont été préalablement fixés : un fragment d'ADN amplifié par PCR contenant la séquence d'ADNmt KSS ciblée par les 5Srec et un fragment d'ADN contenant la séquence de l'ADNmt WT située à l'extrémité 3' de la délétion KSS. Afin de m'approcher des conditions physiologiques, l'incubation a été réalisée à 37°C dans un tampon PBS. Après lavages, les signaux radioactifs observés nous renseignent sur l'efficacité d'hybridation des molécules recombinantes à l'ADNmt KSS, mais aussi sur leur capacité de discrimination entre les deux génomes.

Pour les sept 5Srec sélectionnés, nous pouvons à chaque fois observer un signal radioactif au niveau des fragments d'ADNmt mutant, démontrant ainsi leur capacité d'hybridation à ce génome (**Figure 35**). Pour les molécules 5S-KSS-20H, 5S-KSS-23H, 5S-KSS-21L et 5S-KSS-24L, les intensités des signaux obtenus sont variables ce qui, compte tenu des efficacités comparables de radio-marquage de ces quatre molécules, semble refléter des capacités d'hybridation différentes à l'ADNmt KSS. Ainsi, l'hybridation des molécules 5S-KSS-20H et 5S-KSS-23H semble particulièrement faible par rapport aux molécules 5S-KSS-21L et 5S-KSS-24L, alors que les prédictions de températures de fusion suggéraient une hybridation plus forte de ces deux molécules. Les signaux radioactifs obtenus pour les molécules 5S-KSS-15H, 5S-KSS-15L et 5S-KSS-17H sont en revanche comparables ce qui suggère que leurs efficacités d'hybridation à l'ADNmt KSS sont comparables. Pour toutes les molécules testées, aucun signal radioactif ne peut être observé au niveau des fragments d'ADNmt sauvage, ce qui démontre ainsi une très forte spécificité d'hybridation des 5Srec sélectionnés, ce qui confirme les prédictions bio-informatiques.

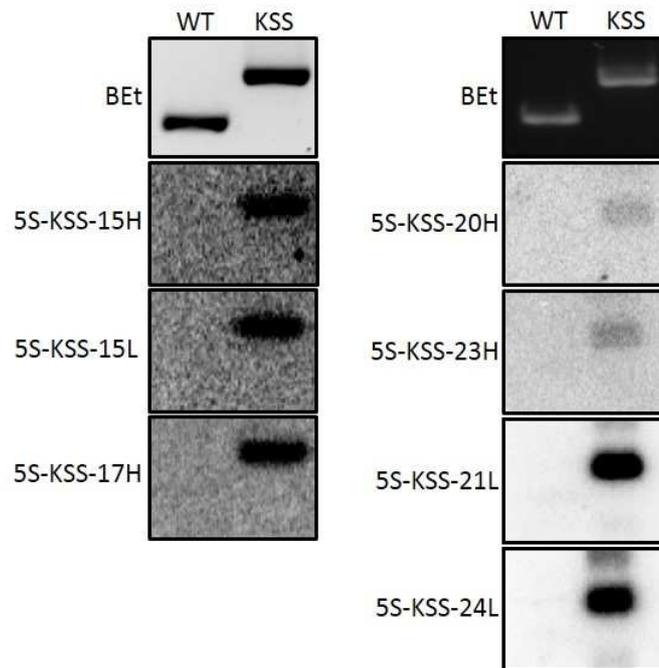


Figure 35. Efficacité et spécificité d'hybridation *in vitro* des 5Srec ciblant l'ADNmt KSS.

Hybridation de type Southern des 5Srec radiomarqués. Les gels d'agarose colorés au bromure d'éthidium (BEt) sur lesquels ont été déposés des plasmides contenant soit la séquence d'ADNmt sauvage (WT), soit la séquence d'ADNmt mutant (KSS), sont présentés au-dessus des membranes comportant les signaux radioactifs qui correspondent à chaque 5Srec (indiqués à gauche de l'hybridation).

4. Production d'une lignée cellulaire cybride KSS Flp-In™

L'étude précédente qui a permis l'obtention d'une baisse d'hétéroplasmie de 28% au sein des cellules cybrides, a fait état d'une expression relativement faible des ARNr 5S recombinants (30 ± 5 molécules/cellule). Mon second objectif dans l'optimisation de la stratégie anti-répllicative a donc consisté à augmenter le niveau d'expression des 5Srec au sein des cellules cybrides. Pour cela, nous avons utilisé le système Flp-In™ T-Rex™ (Invitrogen) qui permet la génération de lignées cellulaires stables dans lesquelles le gène d'intérêt est intégré dans une région favorable à son expression par recombinaison au niveau d'un site FRT (Flp Recombination Target) grâce à la recombinase Flp (**Figure 36**).

Dans une première étape, j'ai donc utilisé ce système pour créer et sélectionner une lignée cellulaire cybride KSS contenant un site de recombinaison FRT dans une région transcriptionnellement active. Pour cela, les cellules cybrides ont été transfectées avec le plasmide pFRT//acZeo linéarisé entraînant son intégration aléatoire au sein de leur génome nucléaire. Ce plasmide qui contient le site de recombinaison FRT, possède aussi un gène de

fusion *lacZ*-Zeocin qui permet d'une part, la sélection des cellules l'ayant intégré grâce au gène de résistance à la Zeocine et d'autre part, une estimation de l'activité transcriptionnelle de la région d'intégration du site FRT grâce à l'expression de la β -galactosidase.

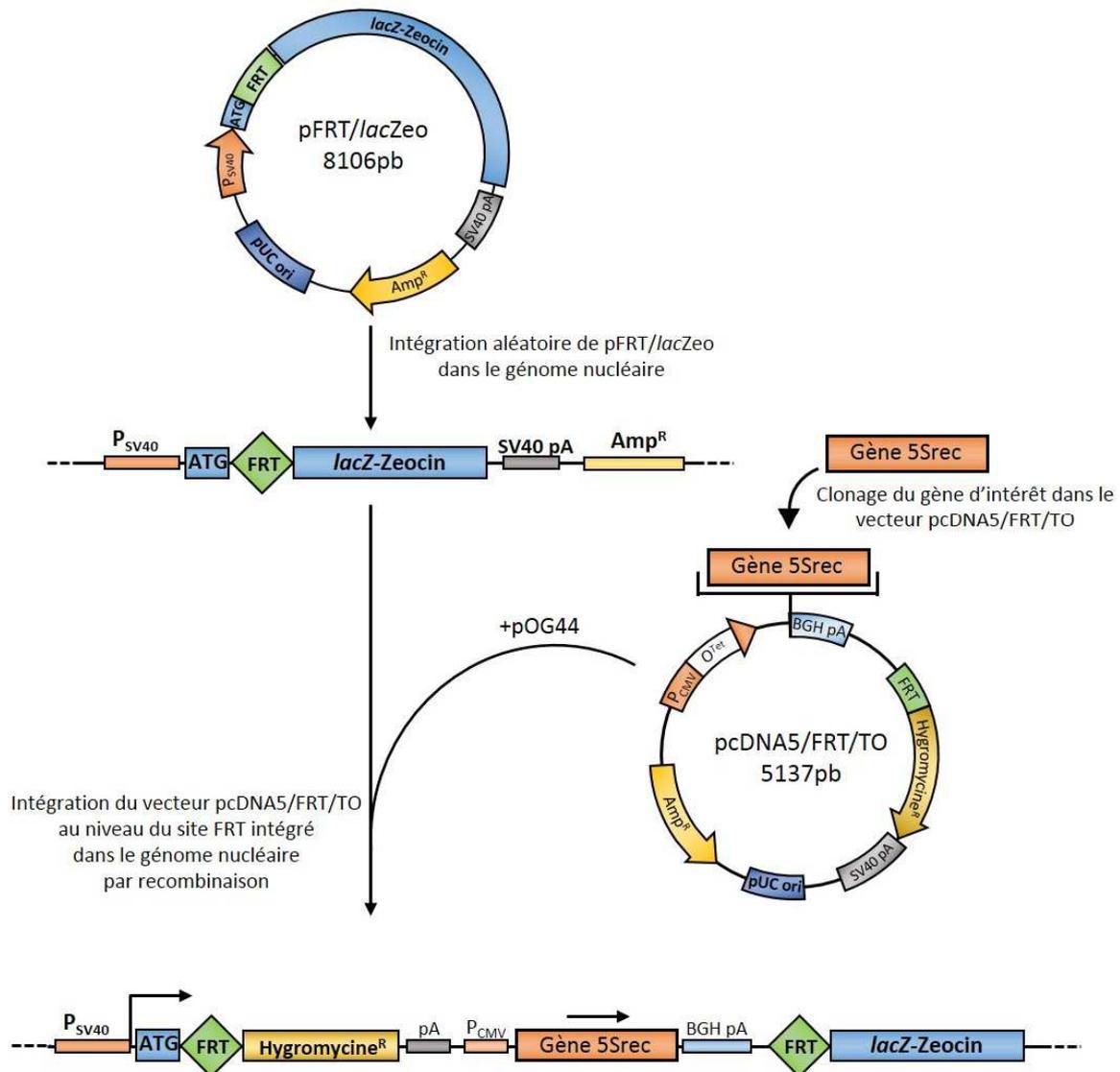


Figure 36. Les principales étapes du système Flp-In™ T-Rex™ (Invitrogen).

Le système Flp-In™ T-Rex™ a été utilisé pour générer des lignées cellulaires cybrides KSS contenant un gène d'ARNr 5S recombinant (5Srec) dans une région transcriptionnellement active. La première étape consiste à intégrer le plasmide pFRT/*lacZeo* dans le génome nucléaire de façon aléatoire. Celui-ci contient un gène de fusion *lacZ*-Zeocin et un site de recombinaison FRT (Flp Recombination Target). Le gène d'intérêt (ici, un gène de 5Srec) est inséré dans le plasmide pcDNA5/FRT/TO par clonage. Celui-ci est intégré dans le génome nucléaire par recombinaison au niveau du site FRT grâce à la co-transfection des cellules avec le plasmide pOG44 qui permet l'expression de la recombinase Flp. La lignée cellulaire résultante, résistante à l'Hygromycine, contient un gène d'ARNr 5S recombinant qui peut s'exprimer grâce à la présence du promoteur interne.

La transfection des cellules cybrides KSS n'a malheureusement permis que l'obtention d'un nombre très limité de clones cellulaires ayant intégré le plasmide pFRT/*lacZeo*. Ceci pourrait notamment s'expliquer par une fragilité accrue de ces cellules qui résistent moins au processus de transfection et à l'intégration de matériel génétique au sein de leur génome. Néanmoins, les trois clones qui ont pu être isolés (nommés KSS pFRT 2, 5 et 8) sont caractérisés par des vitesses de croissance comparables à la lignée initiale suggérant une faible toxicité de l'intégration du plasmide dans ceux-ci.

Pour minimiser le risque de recombinaison au sein du génome nucléaire qui pourrait aboutir à la délétion de parties essentielles de celui-ci, l'intégration du plasmide pFRT/*lacZeo* doit être un évènement unique dans la cellule. J'ai donc déterminé le nombre de sites FRT au sein des trois clones cellulaires par hybridation de type Southern (**Figure 37A**). Chaque clone KSS pFRT présente un seul signal radioactif ce qui démontre qu'ils contiennent chacun un site FRT unique au sein de leur génome.

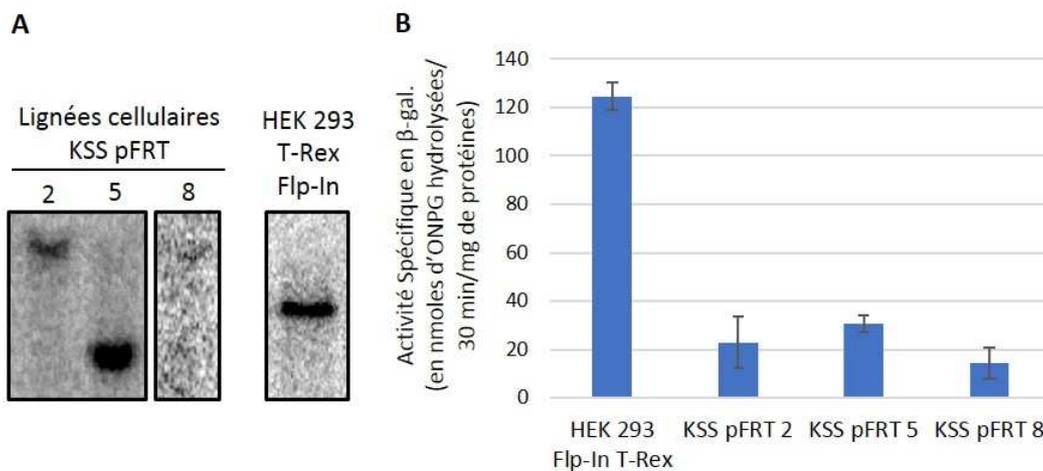


Figure 37. Analyse des clones cellulaires KSS pFRT.

(A) Analyse par hybridation de type Southern du nombre de site FRT au sein du génome des clones cellulaires KSS pFRT et de la lignée commerciale HEK 293 Flp-InTM T-RexTM (contrôle positif). L'ADN cellulaire digéré par des enzymes de restriction (voir **Matériels & méthodes, II-5.8**) est séparé par électrophorèse sur gel d'agarose. Après transfert, les sites FRT sont détectés par hybridation d'une sonde radiomarquée au ³²P ciblant le site FRT.

(B) Quantification de l'activité spécifique en β-galactosidase (en nmoles d'ONPG hydrolysées/30min/mg de protéines) des trois clones cellulaires KSS pFRT et de la lignée commerciale HEK 293 Flp-InTM T-RexTM. Les données présentées et les écart-types sont le résultat de trois quantifications indépendantes. ONPG = Ortho-nitrophényl-β-galactoside, substrat de la β-galactosidase dont l'hydrolyse permet la libération d'orthonitrophénol, composé jaune en milieu alcalin.

L'objectif étant d'obtenir une expression importante des 5Srec au sein des cellules cybrides KSS, j'ai ensuite comparé les activités spécifiques en β -galactosidase des trois clones cellules KSS pFRT. Ces activités spécifiques reflètent l'activité transcriptionnelle de la région d'intégration du site de recombinaison FRT. Bien que les trois clones cellulaires présentent des activités spécifiques très proches, le clone KSS pFRT 5 présente une activité spécifique légèrement supérieure qui pourrait permettre une plus forte expression des 5Srec (**Figure 37B**). Il faut également noter que les activités spécifiques en β -galactosidase obtenues pour les trois clones cellulaires KSS pFRT sont très inférieures à ce qui peut être observé pour la lignée commerciale HEK 293 Flp-In™ T-Rex™. Il pourrait ainsi être possible, en réitérant cette étape de transfection, d'obtenir une lignée cellulaire cybride KSS pFRT dont le site de recombinaison est intégré dans une région bien plus favorable à l'expression du gène d'intérêt.

Enfin, pour terminer l'analyse des clones cellulaires KSS pFRT, j'ai déterminé leur niveau d'hétéroplasmie pour voir si la transfection n'a pas engendré la sélection d'un clone avec un taux d'hétéroplasmie beaucoup plus bas que celui observé dans la lignée cybride KSS d'origine. J'ai ainsi pu observer que les trois clones cellulaires présentent des taux d'hétéroplasmie relativement proches de la lignée d'origine puisqu'ils possèdent tous plus de 50% de génomes mitochondriaux mutants KSS.

L'ensemble de ces informations (**Tableau 4**) m'a donc mené à choisir le clone cellulaire KSS pFRT 5 qui présente un seul site FRT et dont l'activité spécifique en β -galactosidase est la plus élevée des trois clones. Cette lignée cellulaire est caractérisée par un taux d'hétéroplasmie de 51 \pm 4%.

Lignée cellulaire KSS pFRT	KSS pFRT 2	KSS pFRT 5	KSS pFRT 8	HEK 293 T-Rex™ Flp-In™
Nombre de site FRT	1	1	1	1
Activité spécifique en nmol d'ONPG hydrolysé/ 30 min/mg de protéine	23 \pm 10	31 \pm 3	15 \pm 6	125 \pm 6
Taux d'hétéroplasmie	52 \pm 5%	51 \pm 4%	52 \pm 5%	/

Tableau 4. Tableau comparatif des lignées cellulaires cybrides KSS pFRT.

Comparaison des trois lignées cellulaires cybrides KSS pFRT obtenues au laboratoire ainsi que la lignée commerciale sauvage HEK 293 Flp-In™ T-Rex™.

5. Production et analyse des lignées cellulaires cybrides KSS pFRT-5Srec

Après avoir sélectionné des ARNr 5S recombinants dont les caractéristiques semblent adaptées au développement de la stratégie anti-répllicative, et après avoir produit une lignée cellulaire cybride KSS pFRT qui devrait permettre une expression plus importante de ces molécules au sein des cellules, j'ai finalement intégré les différents gènes des 5Srec sélectionnés au sein de cette lignée cellulaire.

Pour cela, j'ai tout d'abord inséré chaque gène permettant l'expression d'un 5Srec sur le vecteur d'expression pcDNA5TM/FRT/TO. Ce vecteur (**Figure 36**) contient un site FRT qui permet son intégration par recombinaison au niveau du site identique qui a été précédemment intégré au sein du génome nucléaire. Celle-ci est assurée par l'expression de la recombinase Flp grâce au plasmide pOG44. Le vecteur pcDNA5TM/FRT/TO possède également un gène de résistance à l'hygromycine permettant la sélection des cellules l'ayant intégré correctement. Le système Flp-InTM T-RexTM offre ainsi la possibilité d'obtenir une population de cellules dont le gène d'intérêt est intégré au même endroit du génome nucléaire, et donc dont l'expression est la même au sein de la population. En utilisant ce système, j'ai donc ensuite produit les lignées cellulaires cybrides permettant chacune l'expression d'un des neuf 5Srec sélectionnés auparavant, c'est-à-dire les deux molécules anti-répliquatives décrites dans (Comte *et al.*, 2013) et les sept molécules que j'ai sélectionnées au cours de mes travaux de thèse.

Grâce à des analyses par RT-PCR, j'ai pu détecter l'expression des 5Srec dans toutes les lignées cellulaires cybrides que j'ai produites. Afin d'évaluer le nombre de molécules exprimées dans ces cellules, des courbes de calibration ont ensuite été réalisées à partir de dilutions successives de chaque transcrite synthétisé *in vitro* (**Figure 38**).

Dans une première expérience, nous avons obtenu deux lignées cellulaires contenant les gènes des molécules 5S-KSS-13H et 5S-KSS-14L caractérisées par une forte expression de ces molécules anti-répliquatives à hauteur d'environ 2000 5Srec/cellule (**Tableau 5, 5S-KSS-13H(1) et 5S-KSS-14L(1)**). Malheureusement, par la suite, nous n'avons jamais réussi à obtenir un niveau si élevé d'expression des 5Srec. En effet, hormis la lignée cellulaire **5S-KSS-15H** (≈ 1300 5Srec/cellule), toutes les autres lignées cellulaires produites sont caractérisées par une expression à peu près 10 fois plus faible (200 à 300 5Srec/cellule) (**Tableau 5**). Malgré ces

variations observées dans l'expression des molécules recombinantes, le système Flp-In™ T-Rex™ que nous avons utilisé ici pour produire des lignées cellulaires stables, nous a permis d'augmenter sensiblement le nombre de 5Srec exprimé dans les cellules. En effet, l'étude précédente ayant estimé le niveau d'expression des molécules anti-répliquatives à 30 ± 5 par cellule, nous avons donc augmenté l'expression par un facteur 10, ce qui devrait permettre un effet sur l'hétéroplasmie plus prononcé.

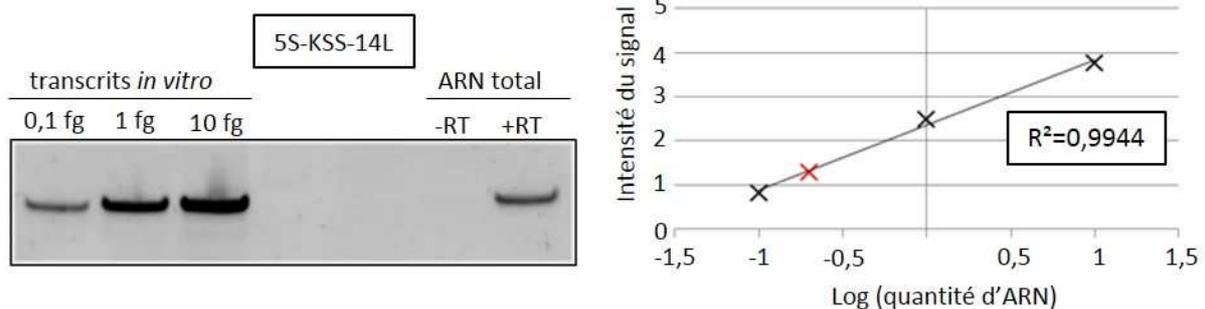


Figure 38. Quantification par RT-PCR semi-quantitative des molécules « 5S-KSS-14L ».

A gauche, analyse sur gel de polyacrylamide natif coloré au bromure d'éthidium des RT-PCR réalisées sur des quantités croissantes (0,1fg ; 1fg ; 10fg) de transcrit 5S-KSS-14L synthétisé *in vitro* et sur un extrait d'ARN total de la lignée cellulaire 5S-KSS-14L (-RT, sans reverse transcription ; +RT, avec reverse transcription). A droite, un exemple de courbe de calibration réalisé pour évaluer le nombre de molécules 5S-KSS-14L au sein des cellules cybrides (R^2 ; coefficient de corrélation).

Lignées cellulaires 5Srec	Nombre de 5Srec/cellule
5S-KSS-13H(1)	2000
5S-KSS-13H(2)	200
5S-KSS-14L(1)	2000
5S-KSS-14L(2)	300
5S-KSS-15H	1300
5S-KSS-15L	215

Tableau 5. Quantités d'ARNr 5S recombinants au sein des lignées cellulaires cybrides.

Les variations de niveau d'expression observées entre les différentes lignées cellulaires peuvent être expliquées par plusieurs phénomènes. Une première possibilité pourrait être une sélection incomplète des cellules avec l'antibiotique suite à l'intégration du gène d'ARNr 5S recombinant. La population hétérogène résultante contiendrait alors des cellules qui

expriment les 5Srec à un niveau élevé et d'autres qui n'en expriment pas, ce qui pourrait expliquer un nombre plus faible de 5Srec/cellule. Dans une seconde possibilité, l'expression plus importante des molécules anti-répliquatives dans certaines lignées cellulaires pourrait trouver son explication par une intégration multiple du vecteur pcDNA5TM/FRT/TO au sein du génome nucléaire, au niveau du site FRT et en dehors de ce site.

J'ai alors cultivé l'ensemble des lignées cellulaires produites pendant plusieurs semaines dans un milieu riche en glucose en mesurant régulièrement leur taux d'hétéroplasmie par qPCR. De façon surprenante, malgré l'augmentation importante du nombre de molécules anti-répliquatives exprimées au sein des cellules, aucune variation significative du taux d'hétéroplasmie n'a pu être observée dans la période de culture des cellules (**Figure 39, 4,5g/L glucose**).

Ne pouvant pas obtenir de variations significatives du taux d'hétéroplasmie dans les lignées cellulaires exprimant des 5Srec cultivées dans un milieu riche en glucose, nous avons ensuite choisi de placer les cellules dans un milieu sélectif dans lequel les cellules avec un taux d'hétéroplasmie plus faible présenteraient un avantage de croissance. Les cellules ont donc été placées dans un milieu dépourvu de glucose. Dans ces conditions, la glycolyse qui permet de produire une partie de l'ATP cellulaire devrait être réduite à son minimum. En revanche, grâce à la présence de l'acide pyruvique au sein du milieu, la respiration cellulaire mitochondriale devrait être la source principale de production d'ATP. Les cellules dont les fonctions mitochondriales sont les plus adaptées à ces conditions sélectives devraient ainsi posséder un avantage de croissance. Nous avons donc émis l'hypothèse que ces conditions devraient donner un avantage sélectif aux cellules dont les 5Srec permettent une diminution de l'hétéroplasmie. Comme précédemment, j'ai mesuré régulièrement le taux d'hétéroplasmie des différentes lignées cellulaires cultivées pendant plusieurs semaines dans le milieu sans glucose.

Les cellules cybrides KSS pFRT sont capables de croître dans le milieu dépourvu de glucose et après 6 semaines de culture, démontraient très peu de variation de leur taux d'hétéroplasmie (**Figure 39, KSS pFRT, 0g/L glucose**). Parmi les onze lignées cellulaires analysées, j'ai ainsi pu observer une diminution significative de l'hétéroplasmie dans deux lignées exprimant des ARNr 5S recombinants anti-répliquatifs. En effet, alors que le niveau d'hétéroplasmie de la lignée initiale KSS pFRT est de $51 \pm 4\%$, la culture de la lignée 5S-KSS-15H

pendant plusieurs semaines en absence de glucose aboutit à une diminution significative du taux d'hétéroplasmie jusqu'à environ $41 \pm 2\%$ (P -value $< 0,01$) (**Figure 39, 5S-KSS-15H, 0g/L glucose**). Une autre lignée cellulaire, la lignée 5S-KSS-13H(1), fut quant à elle caractérisée par une diminution drastique de la proportion de génomes mitochondriaux mutants puisqu'après plusieurs semaines de culture dans un milieu dépourvu de glucose, le taux d'hétéroplasmie y est de $13 \pm 3\%$ (P -value $< 0,001$) (**Figure 39, 5S-KSS-13H, 0g/L glucose – (1)**).

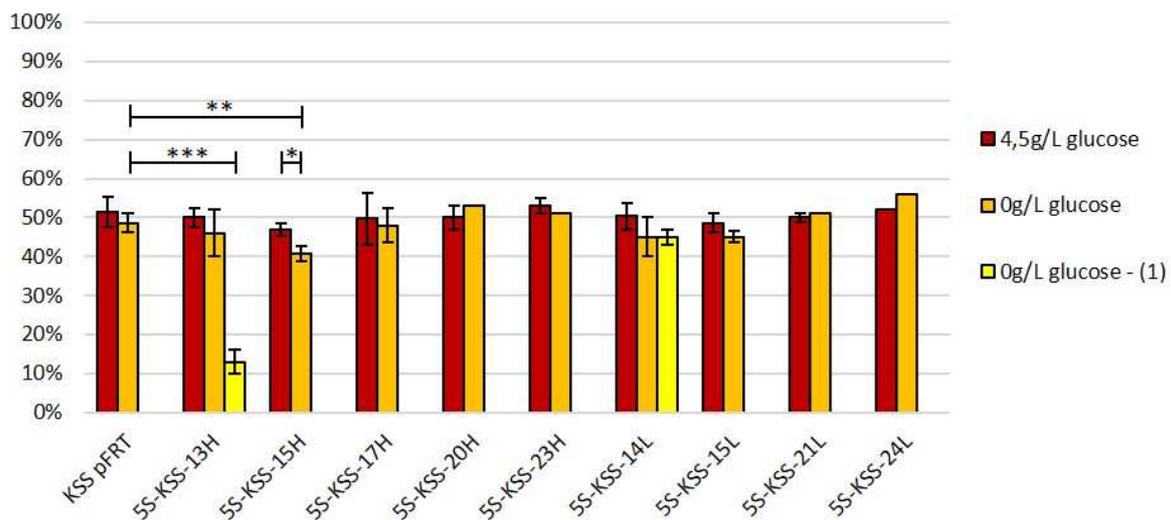


Figure 39. Taux d'hétéroplasmie des lignées cellulaires cybrides KSS pFRT-5Srec après plusieurs semaines de culture en présence (4,5g/L) ou en absence (0g/L) de glucose.

Taux d'hétéroplasmie mesurés par qPCR après 6 à 9 semaines de culture. 0g/L glucose – (1) désigne les lignées cellulaires 5S-KSS-13H(1) et 5S-KSS-14L(1) cultivées dans le milieu dépourvu de glucose. Les écarts-type sont calculés à partir de quantifications qPCR indépendantes ($3 \leq n \leq 7$). Les différences statistiques ont été déterminées avec un test t de Student sur deux échantillons indépendants (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$).

Il est intéressant de remarquer que les lignées cellulaires qui présentent des diminutions du taux d'hétéroplasmie sont celles qui sont caractérisées par les niveaux plus élevés d'expression d'ARNr 5S recombinants. En effet, alors que l'expression à hauteur de 2000 molécules de 5S-KSS-13H par cellule permet l'obtention d'une diminution importante du taux d'hétéroplasmie, l'expression plus faible de cette même molécule n'entraîne pas de variation significative du taux d'hétéroplasmie (**Figure 39, 5S-KSS-13H, 0g/L glucose**). La lignée 5S-KSS-15H qui présente également une diminution du taux d'hétéroplasmie est quant à elle

caractérisée par un nombre de molécules anti-répliquatives d'environ 1300/cellule. Ceci pourrait donc indiquer que l'impact des 5Srec est très fortement dépendant de leur niveau d'expression et que plus de 1000 molécules par cellule pourraient être nécessaires pour affecter la réplication et ainsi diminuer la proportion de génomes mitochondriaux mutants. Cependant, l'expression importante des molécules anti-répliquatives n'est pas suffisante pour permettre une diminution du taux d'hétéroplasmie puisque le même niveau d'expression pour la lignée 5S-KSS-14L(1) n'entraîne pas de variation significative de la proportion d'ADNmt mutant (**Figure 39, 5S-KSS-14L, 0g/L glucose – (1)**). La séquence de l'insert anti-répliquatif ou le brin de l'ADNmt ciblé semble donc ici jouer un rôle important dans l'altération de la réplication de l'ADNmt.

En conclusion, malgré la sélection des ARNr 5S recombinants qui semblent les plus appropriés pour cette stratégie anti-répliquative et l'augmentation de l'expression des molécules d'intérêt au sein des cellules cybrides, nous n'avons pas pu observer de diminution significative du taux d'hétéroplasmie après plusieurs semaines de culture dans un milieu riche en glucose. En revanche, la culture de ces lignées cellulaires dans un milieu sélectif dépourvu de glucose a permis la détection de variations significatives du taux d'hétéroplasmie dans deux des lignées produites. Ces diminutions ont été obtenues dans les lignées qui expriment un nombre plus élevé de molécules anti-répliquatives, ce qui pourrait indiquer sur l'existence d'un niveau seuil de 5Srec nécessaire pour altérer la réplication de façon efficace et ainsi changer la proportion d'ADNmt mutant.

Une partie des données obtenues dans l'application de cette stratégie anti-répliquative utilisant l'ARNr 5S a été regroupée dans un article, actuellement en cours de soumission, qui est présenté en **Annexes** à la fin de ce manuscrit.

II. Adaptation de la stratégie anti-répllicative à une mutation ponctuelle de l'ADNmt

Le choix d'une délétion de l'ADNmt pour initier le développement d'une stratégie anti-répllicative est tout à fait logique puisque dans ce cas, les oligonucléotides anti-répliatifs peuvent avoir un pouvoir discriminant très important entre les génomes mutants et sauvages. Les génomes mitochondriaux mutants porteurs de mutations ponctuelles devraient en revanche être plus difficiles à cibler spécifiquement par un oligonucléotide anti-répliatif puisque la distinction entre les deux génomes ne se fait que par un seul nucléotide. Mon dernier objectif dans l'application de cette stratégie anti-répllicative basée sur l'utilisation de l'ARNr 5S comme vecteur d'import mitochondrial consistait ainsi à tenter de l'étendre à une mutation ponctuelle de l'ADNmt.

1. Modélisation et sélection des ARNr 5S recombinants ciblant la mutation ponctuelle m.13514A>G

Au laboratoire, la stratégie anti-répllicative utilisant les petits ARN artificiels dérivés de l'ARNt^{Lys} de *S.cerevisiae* a été appliquée à la délétion KSS, mais aussi à la mutation ponctuelle m.13514A>G située dans le gène *MT-ND5* (**Figure 40**) (Tonin *et al.*, 2014). Cette mutation a été identifiée chez deux patients ne présentant aucun lien de parenté mais tous deux atteints par un syndrome de type MELAS. Les expériences ont été réalisées en grande partie sur une lignée cellulaire cybride contenant environ 50% d'un ADNmt porteur de cette mutation, créée à partir de fibroblastes des patients précédemment décrits (Corona *et al.*, 2001). Comme des résultats prometteurs ont été obtenus grâce à l'utilisation des petits ARN artificiels sur l'hétéroplasmie de ces cellules, j'ai donc choisi ce même modèle cellulaire pour développer la stratégie anti-répllicative utilisant l'ARNr 5S comme vecteur d'import mitochondrial.

Tout comme pour la large délétion de l'ADNmt KSS, j'ai d'abord produit une banque d'ARNr 5S recombinants ciblant spécifiquement l'ADNmt mutant ND5. Pour cela, je me suis en particulier appuyé sur les données obtenues dans le développement de la stratégie anti-répllicative utilisant les petits ARN artificiels qui suggère notamment que les inserts anti-répliatifs les plus spécifiques dirigés contre la mutation m.13514A>G ont une taille d'environ 20 nucléotides (Tonin *et al.*, 2014).

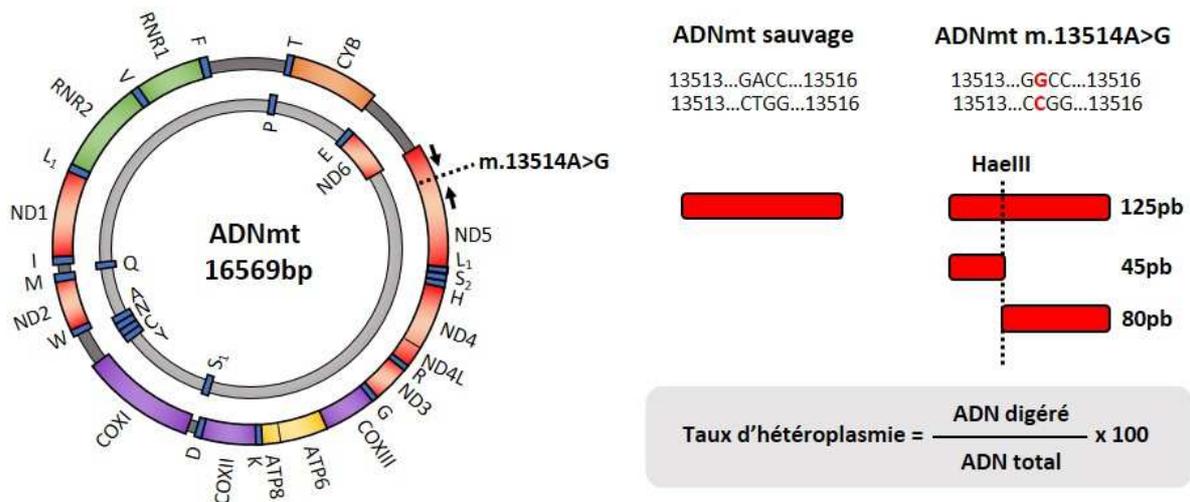


Figure 40. Carte de l'ADNmt m.13514A>G et principe de quantification de son hétéroplasmie

A gauche, carte de l'ADNmt. La position de la mutation m.13514A>G dans le gène *MT-ND5* est indiquée par des pointillés. Les flèches schématisent la position des amorces permettant l'amplification PCR. A droite, principe de mesure de l'hétéroplasmie m.13514A>G par analyse des fragments de restriction. La mutation (en rouge) entraîne l'apparition du site de restriction HaellI (GG/CC). Les fragments d'ADN obtenus par PCR (125pb) sont digérés par l'enzyme HaellI. Seuls les fragments contenant la mutation sont clivés par l'enzyme. Le taux d'hétéroplasmie est déterminé grâce au rapport entre les fragments digérés et le fragment de 125pb.

Comme précédemment, la première étape a consisté en l'analyse des prédictions de température de fusion des inserts anti-répliatifs vis-à-vis des génomes mitochondriaux mutant ND5 et sauvage (**Tableau 6**). La distinction entre les deux génomes ne se faisant que par un seul nucléotide, les T_m sont tous deux supérieurs à la température physiologique de 37°C. J'ai donc une nouvelle fois choisi les molécules dont les ΔT_m étaient les plus importants, suggérant alors une capacité de discrimination élevée entre les deux génomes.

5Srec	Hybridation avec l'ADNmt m.13514A>G	T_m pour l'ADNmt m.13514A>G	T_m pour l'ADNmt WT	ΔT_m
5S-ND5-18L	18 b	58,8°C	53,1°C	5,7°C
5S-ND5-19L	19 b	54,9°C	49,7°C	5,2°C
5S-ND5-20L	21 b	55,5°C	50,6°C	4,9°C
5S-ND5-18H	21 b	53,6°C	43,7°C	9,9°C
5S-ND5-19H	20 b	46,2°C	37,2°C	9,0°C
5S-ND5-20H	21 b	55,9°C	47,4°C	8,5°C

Tableau 6. Prédiction de T_m des inserts anti-répliatifs vis-à-vis des ADNmt m.13514A>G et sauvage (WT).

Comme pour la délétion KSS, j'ai ensuite sélectionné les molécules dont les structures secondaires semblent les plus adaptées au développement de la stratégie anti-répliquative, en suivant les mêmes critères (**Figure 41**). Ces étapes m'ont mené à sélectionner six ARNr 5S recombinants pouvant en théorie cibler spécifiquement l'ADNmt mutant ND5.

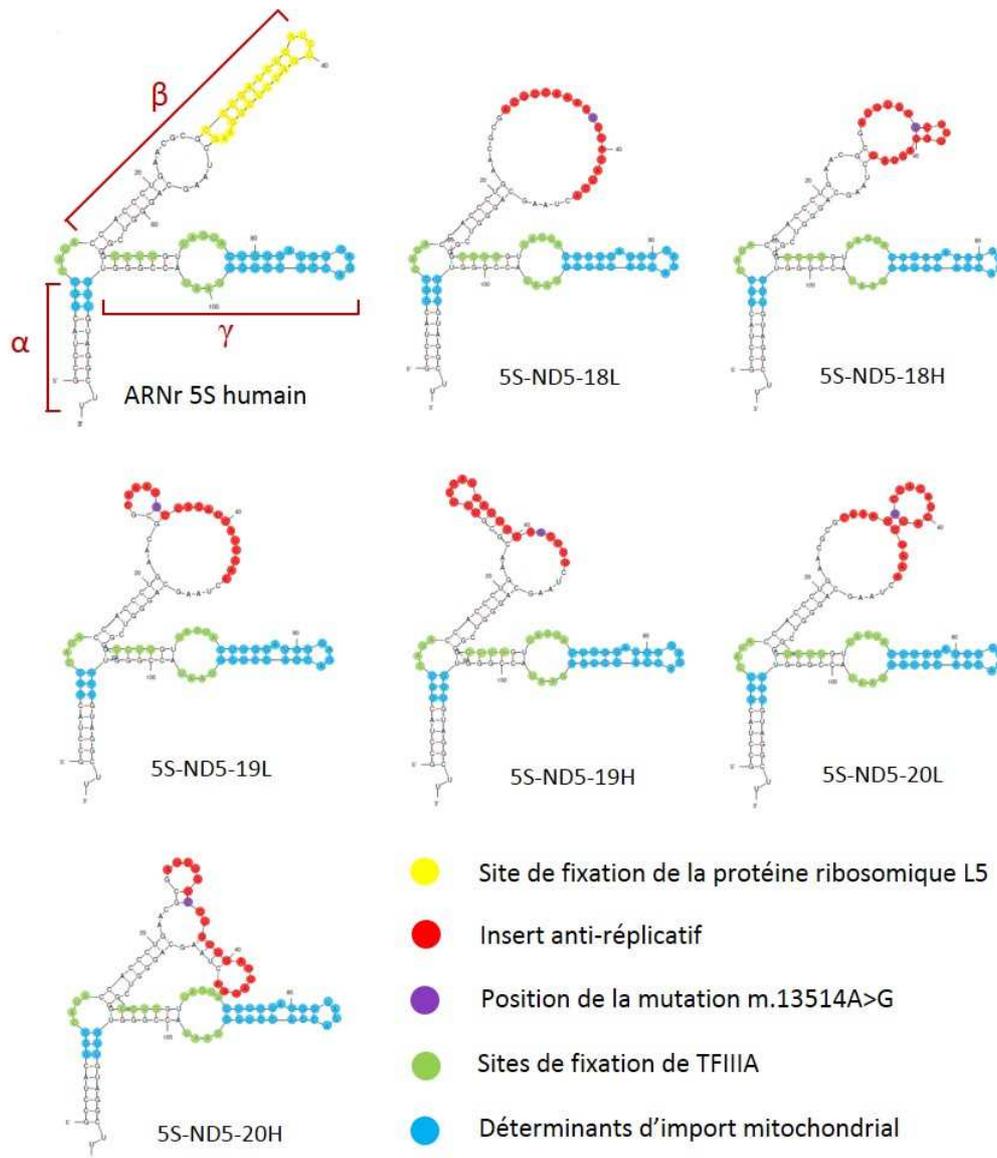


Figure 41. Structures secondaires de l'ARNr 5S humain et des 5Srec ciblant l'ADNmt mutant m.13514A>G (ND5).

Les structures secondaires ont été prédites au moyen du programme *RNA Folding form* du serveur Mfold. Les différents motifs d'interaction, l'insert anti-répliquatif ainsi que la position de la transition m.13514A>G sur l'insert sont indiqués sur les structures obtenues.

J'ai ensuite évalué les capacités de discrimination des différentes molécules recombinantes grâce à un test d'hybridation *in vitro* (**Figure 42A**). Pour cela, j'ai amplifié par

PCR la région de l'ADNmt contenant la mutation m.13514A>G et en parallèle, la même région dépourvue de cette mutation. Après transfert sur membrane, ces fragments ont été mis au contact des différents 5Srec marqués radioactivement au ^{32}P à 37°C. Les signaux radioactifs observés ont ensuite été normalisés par rapport à la quantité de chaque ADN présent sur la membrane. Des six molécules recombinantes sélectionnées, aucune ne permet l'observation d'une hybridation uniquement à l'ADNmt mutant m.13514A>G. Cependant, les molécules 5S-ND5-19H, 5S-ND5-20L et 5S-ND5-19H sont celles qui démontrent les plus fortes capacités de discrimination entre les deux génomes (**Figure 42B**), c'est pourquoi je les ai sélectionnées pour la suite des expériences.

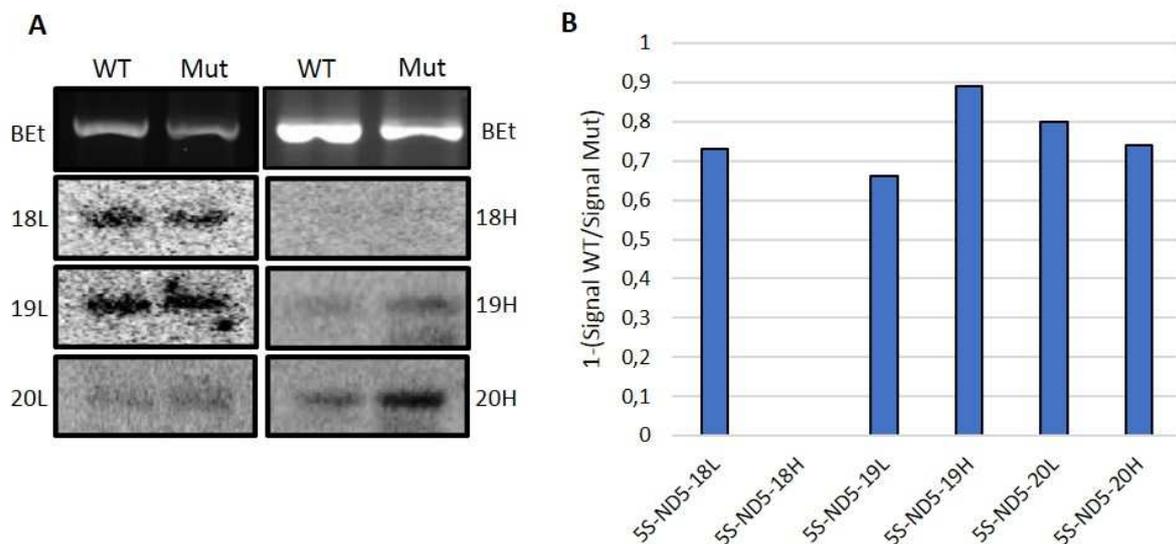


Figure 42. Spécificité d'hybridation *in vitro* des ARNr 5S recombinants ND5.

(A)Hybridation de type Southern des fragments d'ADNmt sauvage (WT) ou mutant m.13514A>G (Mut) avec les 5Srec marqués radioactivement (indiqués à gauche et à droite). Les gels d'agarose colorés au bromure d'éthidium (BET) ayant servi au transfert et à la normalisation des signaux radioactifs sont présentés au-dessus des hybridations. **(B)** Représentation graphique de la spécificité d'hybridation des 5Srec. Celle-ci est calculée grâce à la formule $1 - (\text{Signal WT} / \text{Signal Mut})$. Ainsi, pour une hybridation uniquement à l'ADNmt mutant cette valeur est de 1 alors qu'elle est proche de 0 pour une hybridation similaire aux génomes sauvage et mutant. Les signaux ont à chaque fois été normalisés par le signal observé sur gel d'agarose.

2. Production et sélection d'une lignée cellulaire cybride ND5 Flp-In™

Afin d'exprimer les 5Srec de façon efficace au sein des cellules cybrides ND5, nous avons ensuite construit une lignée cellulaire cybride ND5 Flp-In™. Contrairement aux cellules cybrides KSS, l'intégration du plasmide pFRT/lacZeo a cette fois-ci permis l'obtention d'un

nombre très important de clones cellulaires résistants à la Zéocine. Ceci pourrait notamment trouver son explication dans une plus grande robustesse de ces cellules porteuses de la mutation ponctuelle m.13514A>G vis-à-vis du processus de transfection. J’ai donc analysé les différentes lignées cellulaires obtenues pour déterminer le nombre de sites FRT intégrés au sein de leur génome, leur activité spécifique en β -galactosidase et leur taux d’hétéroplasmie (**Tableau 7**).

Lignée cellulaire ND5 pFRT	Nombre de site FRT	Activité spécifique en β -gal (en nmol d'ONPG hydrolysé/30min/mg de protéines)	Taux d'hétéroplasmie
A	2	33 \pm 8	56 \pm 2%
D	1	54 \pm 12	58 \pm 2%
E	1	8 \pm 1	53 \pm 3%
P	1	24 \pm 5	45 \pm 9%
Q	n.d	35 \pm 2	67 \pm 10%
HEK 293 T-Rex™ Flp-In™	1	125 \pm 6	/

Tableau 7. Tableau comparatif des lignées cellulaires cybrides ND5 pFRT.

Comparaison de cinq des lignées cellulaires cybrides ND5 pFRT obtenues au laboratoire (nommées de A à Q) ainsi que la lignée commerciale sauvage HEK 293 Flp-In™ T-Rex™. (n.d, donnée non déterminée).

Un critère supplémentaire a en revanche pris une importance majeure dans le choix de la lignée ND5 pFRT à utiliser pour la suite des expériences. En effet, contrairement aux trois lignées KSS pFRT qui présentaient des vitesses de croissance comparable, les lignées ND5 pFRT obtenues présentent des vitesses de croissance très variables. Pour le développement des lignées ND5 pFRT-5Srec, j’ai malheureusement été contraint d’utiliser le clone ND5 pFRT « E » qui possède une activité spécifique en β -gal très faible, mais qui est caractérisé par la présence d’un seul site FRT au sein de son génome, et par un taux d’hétéroplasmie ainsi qu’une vitesse de croissance comparables à la lignée cybride initiale ND5.

3. Production et analyse des lignées cellulaires cybrides ND5 pFRT-5Srec

Après avoir sélectionné trois 5Srec qui peuvent s’hybrider préférentiellement à l’ADNmt mutant ND5 et après avoir produit des lignées cellulaires ND5 pFRT, j’ai donc intégré les gènes permettant l’expression des molécules 5S-ND5-19H, 5S- ND5-20H et 5S-ND5-20L dans la lignée cellulaire ND5 pFRT « E ». Les trois lignées cellulaires obtenues en utilisant le

même protocole que pour les lignées cybrides KSS, ont toutes été cultivées en présence et en absence de glucose pendant plusieurs semaines et leur taux d'hétéroplasmie a été mesuré. Après 8 semaines de culture dans le milieu riche en glucose, nous pouvons observer une diminution de l'ordre de 7% du taux d'hétéroplasmie de la lignée ND5 pFRT « E » ($46\pm 2\%$) par rapport au taux d'hétéroplasmie initial ($53\pm 3\%$) (**Figure 43, ND5 pFRT E**). Cette diminution pourrait être expliquée par une dérive progressive de l'hétéroplasmie au sein des cellules cybrides ND5 qui auraient donc une tendance naturelle à diminuer leur proportion d'ADNmt mutant. Les trois lignées exprimant des 5Srec ont permis quant à elles l'obtention d'une diminution plus prononcée de l'hétéroplasmie puisque chacune d'entre elle présente une diminution d'un peu plus de 10%, ce qui pourrait être en partie dû à un effet anti-répliatif des trois 5Srec sélectionnés (**Figure 43, 4,5g/L glucose**). De plus, la culture prolongée de ces lignées dans le milieu dépourvu de glucose entraîne une diminution encore plus importante du taux d'hétéroplasmie, cette fois-ci de l'ordre de 15% par rapport à la lignée initiale ND5 pFRT E (**Figure 43, 0g/L glucose**).

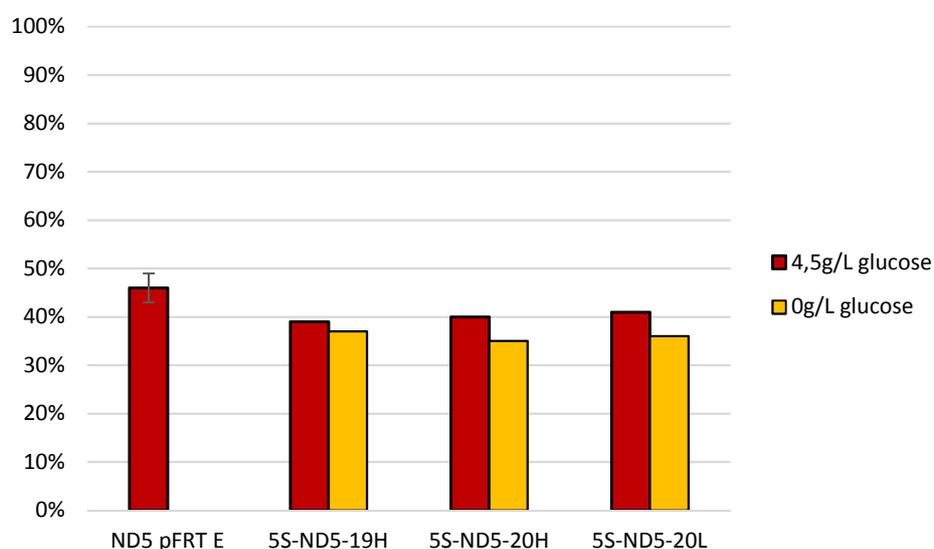


Figure 43. Taux d'hétéroplasmie des lignées cellulaires cybrides ND5 pFRT-5Srec après plusieurs semaines de culture en présence (4,5g/L) ou en absence (0g/L) de glucose.

Taux d'hétéroplasmie déterminé par analyse des fragments de restriction après PCR. L'écart-type pour la lignée ND5 pFRT E cultivée dans 4,5g/L de glucose a été déterminé à partir de trois quantifications indépendantes.

Ces premiers résultats concernant l'expression d'ARNr 5S recombinants dans des cellules cybrides contenant une mutation ponctuelle de l'ADNmt sont néanmoins à relativiser puisqu'ils ne sont issus que d'une expérience. L'impact de ces molécules anti-répliques sur le taux d'hétéroplasmie de cellules cybrides devra donc être confirmé dans de futures expériences.

En conclusion, nous avons déjà démontré que la stratégie anti-réplique utilisant des petits ARN artificiels pouvait être appliquée à une mutation ponctuelle, et en particulier à la mutation m.13514A>G (Tonin et al., 2014). Ces premiers résultats suggèrent que d'une façon similaire, l'utilisation de l'ARNr 5S comme vecteur d'import mitochondrial pourrait permettre le développement d'une stratégie anti-réplique ciblant des mutations ponctuelles. De plus, ici encore, les conditions de culture sélectives semblent avoir un impact positif sur la détection des diminutions d'hétéroplasmie. Ces expériences devront néanmoins être confirmées avant de poursuivre le développement de telles stratégies pour cibler diverses mutations ponctuelles hétéroplasmiques de l'ADNmt.

Partie II

**Développement d'une stratégie anti-génomique
basée sur l'utilisation du système CRISPR/Cas9**

CRISPR/Cas9 est un puissant outil d'édition du génome et ses nombreuses applications sur le génome nucléaire ont démontré sa grande efficacité. Or, jusqu'à présent, ce système n'a jamais été appliqué au génome mitochondrial, en particulier à cause des difficultés rencontrées dans l'adressage mitochondrial des ARNsg. Pourtant, le développement d'un outil CRISPR/Cas9 mitochondrial pourrait permettre un progrès important dans la recherche fondamentale des mécanismes d'expression et de réparation du génome mitochondrial. De plus, son application sur des cellules affectées par des mutations hétéroplasmiques de l'ADNmt pourrait permettre le clivage spécifique des génomes mutants pour mener à leur dégradation et ainsi permettre une diminution du taux d'hétéroplasmie, ce qui constituerait une possible approche thérapeutique.

En m'appuyant sur l'expérience acquise par le laboratoire sur l'import mitochondrial d'ARN au sein des cellules humaines, j'ai consacré la seconde partie de mon doctorat au développement d'un outil CRISPR/Cas9 mitochondrial afin de l'utiliser dans une approche anti-génomique.

I. Développement d'un système CRISPR/Cas9 mitochondrial ciblant spécifiquement un ADNmt mutant affecté par une large délétion

1. Choix du modèle d'étude et identification de la séquence cible

La première étape de ce projet a consisté en l'identification d'une séquence au sein d'un ADNmt mutant qui pourrait être ciblée par le système CRISPR/Cas9 de *Streptococcus pyogenes*. La séquence choisie doit de plus permettre une action spécifique sur l'ADNmt mutant. Le système CRISPR/Cas9 de l'organisme *S.pyogenes* reconnaît une séquence PAM du type 5'-NGG-3' située directement après les 20 nucléotides ciblés par l'ARNsg. De plus, l'expression de l'ARNsg depuis le promoteur humain U6 ou depuis le promoteur du phage T7 nécessite une guanine pour son initiation. Le système que nous utilisons peut donc, en principe, cibler toute séquence génomique du type 5'-GN₂₀GG-3' (Mali *et al.*, 2013).

Au laboratoire, plusieurs lignées cellulaires cybrides *transmitochondriales* hétéroplasmiques sont disponibles. Puisqu'il semble plus simple de cibler de façon spécifique un ADNmt affecté par une délétion, j'ai tout d'abord choisi de voir si cette stratégie pouvait

être appliquée aux cellules cybrides contenant environ 65% d'ADNmt affectés par la large délétion m.8363_15438del (KSS).

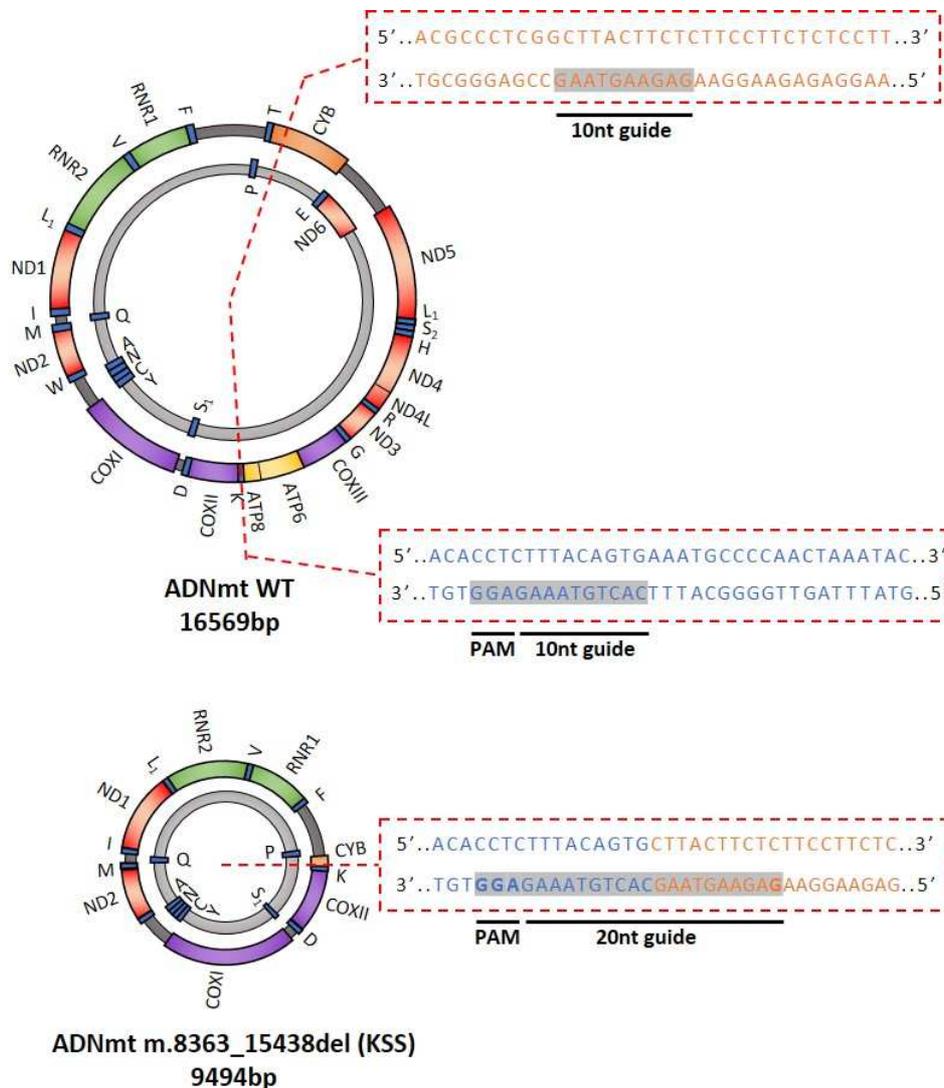


Figure 44. Séquence ciblée par l'ARNsg KSS sur l'ADNmt mutant m.8363_15438del.

Cartes de l'ADNmt de référence et de l'ADNmt mutant m.8363_15438del (KSS). Les séquences situées à la jonction des bornes de la délétion pour l'ADNmt mutant et au niveau des bornes de la délétion pour l'ADNmt sauvage sont indiquées (en bleu, ARNt^{Lys} ; en orange, MT-CYB). Les séquences complémentaires à l'ARNsg KSS sont indiquées en gris. Abréviation : PAM : Protospacer-Adjacent Motif.

L'analyse bio-informatique de la séquence de l'ADNmt mutant KSS a permis la mise en évidence d'une séquence du type 5'-GN₂₀GG-3' qui pourrait permettre le clivage spécifique de ces génomes. Cette séquence 5'-GAGAAGTAAGCACTGTAAAGAGG-3' (coordonnées sur l'ADNmt de référence : 8351-8362 ; 15438-15447), située sur le brin H de l'ADNmt mutant, est

une séquence hybride correspondant pour partie, au gène de l'ARNt lysine mitochondrial (10 nucléotides), et pour le reste, au gène *MT-CYB* (13 nucléotides dont la séquence PAM) (**Figure 44**). Ceci en fait une séquence unique au sein du génome mitochondrial mutant KSS et absente du génome mitochondrial de référence, comme l'a confirmé une analyse *in silico* par recherche de similarité (données non présentées). Un ARNsg ciblant cette séquence pourrait alors permettre le clivage spécifique des molécules mutantes et ainsi entraîner une diminution du taux d'hétéroplasmie.

Après avoir identifié cette séquence sur l'ADNmt mutant, j'ai souhaité évaluer l'efficacité et la spécificité de clivage d'un ARNsg qui la ciblerait et pour cela, j'ai utilisé un test de clivage *in vitro*. Pour cela, j'ai purifié la protéine Cas9 exprimée chez la bactérie grâce à un plasmide commercial. Cette protéine Cas9 recombinante a ensuite été incubée avec l'ARNsg « KSS » (**Figure 45A, à gauche**) produit par T7-transcription et avec un plasmide linéarisé portant soit un fragment d'ADNmt mutant KSS contenant la séquence cible (pMt), soit un fragment d'ADNmt sauvage contenant une partie du gène *MT-CYB* (pWT) (Comte *et al.*, 2013). Les résultats révélés par électrophorèse sur gel d'agarose (**Figure 45B, ARNsg KSS**) permettent ainsi l'observation d'un clivage total de pMt puisque deux fragments de tailles distinctes sont obtenus à partir du plasmide linéarisé. On constate également une absence totale de clivage pour pWT, ce qui confirme donc que la séquence choisie permet un clivage et une discrimination efficace du génome mitochondrial mutant KSS par rapport au génome sauvage.

2. Modification des ARNsg en vue de leur adressage mitochondrial

Après avoir identifié la séquence que nous pouvons cibler pour couper spécifiquement le génome mutant KSS, je me suis penché sur la modification de cet ARNsg KSS afin de l'adresser vers les mitochondries de cellules humaines. Différents motifs structuraux permettant l'adressage mitochondrial de petits ARN au sein de cellules humaines ont été décrits. Ainsi, plusieurs études font état de l'utilisation de structures en tige-boucle issues de l'ARN de la RNase P ou de celui de la RNase MRP pour importer différents ARN (Wang *et al.*, 2012).

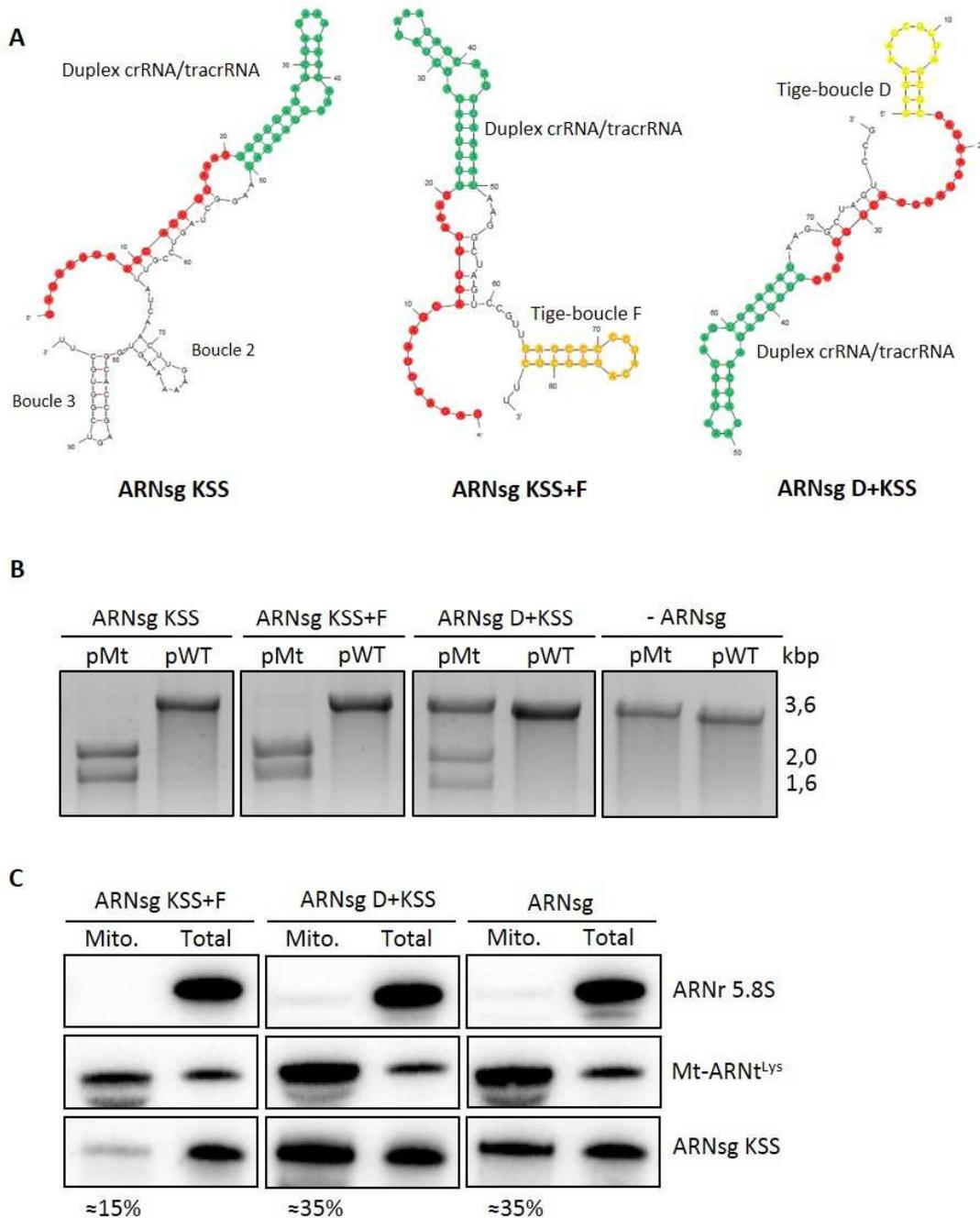


Figure 45. Les modifications de l'ARNs KSS permettent leur adressage mitochondrial sans altérer le clivage spécifique des complexes Cas9-ARNs.

(A). Structures secondaires de l'ARNs KSS et des ARNs modifiés KSS+F et D+KSS, prédites au moyen du programme *RNA Folding form* du serveur Mfold. Les 20 nucléotides guides sont indiqués en rouge, le duplex ARNcr/ARNtracr en vert, la tige-boucle F en orange et la tige-boucle D en jaune. **(B)** Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose des tests de clivage *in vitro* des différents ARNs en présence d'un plasmide contenant un fragment d'ADNmt mutant KSS (pMt) ou sauvage (pWT). La taille des fragments est indiquée sur le côté. -ARNs, contrôle sans ARNs. **(C)** Hybridations de type northern des ARN totaux (Total) ou extraits de mitochondries purifiées (Mito.) 48h après transfection. La sonde ARNr 5.8S permet de vérifier l'absence de contamination cytosolique. La sonde Mt-ARNt^{Lys} permet la détection de l'ARNt^{Lys} mitochondrial. La proportion d'ARNs cellulaire présent dans la fraction mitochondriale est indiquée en %.

Notre équipe a quant à elle identifié les déterminants structuraux d'import mitochondrial de l'ARNt^{Lys(CUU)} qui est en partie retrouvé dans la fraction mitochondriale chez la levure *S.cerevisiae* : ce sont les structures en tige-boucle nommées F et D (Kolesnikova et al., 2010). Il a de plus été décrit que la seule présence d'une des deux structures en tige-boucle (F ou D) peut permettre l'adressage de petits ARN dans les mitochondries de cellules humaines *in vivo* (Gowher et al., 2013). Pour adresser les ARNsg vers les mitochondries, j'ai donc choisi d'utiliser ces structures en tige-boucle décrites au laboratoire. En effet, la petite taille de ces motifs devrait permettre de minimiser la taille des ARNsg et ainsi faciliter leur pénétration dans les mitochondries. De plus, ces petits motifs ne devraient pas altérer la structure globale de l'ARNsg et notamment celles qui sont impliquées dans son interaction avec la nucléase Cas9. Toujours en ayant dans l'esprit de minimiser la taille de l'ARNsg en vue de son import, nous avons d'abord choisi d'ajouter les structures en tige-boucle à la version minimale de l'ARNsg (ARNsg⁽⁺⁴⁸⁾), qui a été montrée comme permettant un clivage efficace *in vitro* (Jinek et al., 2012). J'ai donc modélisé deux ARNsg : un ARNsg contenant la structure en tige-boucle « F » à son extrémité 3' (ARNsg KSS+F), et un ARNsg contenant la structure en tige-boucle « D » à son extrémité 5' (ARNsg D+KSS) (**Figure 45A**).

Les modifications apportées aux ARNsg ont pour but de permettre leur import mitochondrial. En revanche, celles-ci ne doivent pas empêcher l'interaction des ARNsg avec l'endonucléase Cas9, ni altérer l'efficacité de clivage. Pour évaluer l'effet des modifications sur la capacité de clivage spécifique des complexes ARNsg/Cas9, j'ai une nouvelle fois utilisé un test de clivage *in vitro*. L'incubation de la protéine Cas9 recombinante avec l'ARNsg KSS+F entraîne un clivage complet et spécifique de pMt, ce qui suggère que l'ajout de la tige-boucle F à l'extrémité 3' de l'ARNsg n'empêche pas son interaction avec la nucléase Cas9 et n'altère par sa capacité d'hybridation spécifique à l'ADN (**Figure 45B, ARNsg KSS+F**). Au contraire, l'incubation de l'ARNsg D+KSS avec la protéine Cas9 ne permet que l'obtention d'un clivage partiel, mais en revanche spécifique, de l'ADN cible. La présence de la tige-boucle D à l'extrémité 5' de l'ARNsg semble donc diminuer, soit sa capacité d'interaction avec Cas9, soit l'association du complexe ARNsg/Cas9 à l'ADN (**Figure 45B, ARNsg D+KSS**).

Puisque les ARNsg modifiés peuvent mener à un clivage spécifique de l'ADN, j'ai ensuite voulu déterminer si ces modifications permettent leur import dans les mitochondries

de cellules humaines. Pour cela, j'ai utilisé les protocoles de transfection et d'isolation des ARN mitochondriaux développés au sein du laboratoire (Dovydenko *et al.*, 2015). Les cellules cybrides KSS ont donc été transfectées avec les différents ARNsg synthétisés *in vitro* en utilisant l'agent de transfection Lipofectamine 2000 (*Invitrogen*). Quarante-huit heures après transfection, j'ai isolé la fraction mitochondriale par centrifugation différentielle et je l'ai traitée à la RNase A afin d'éliminer les ARN situés en dehors des mitochondries et à la digitonine pour éliminer la membrane mitochondriale externe. Les ARN extraits de ces mitoplastes ont ensuite été analysés par hybridation de type northern. Les résultats obtenus suggèrent que les ARNsg KSS+F et D+KSS sont tous deux importés dans les mitochondries de cellules cybrides puisqu'environ 15% de l'ARNsg KSS+F cellulaire et 35% de l'ARNsg D+KSS sont retrouvés dans la fraction mitochondrial purifiée (**Figure 45C, ARNsg KSS+F et D+KSS**). Nous possédons donc deux ARNsg modifiés qui sont importés dans les mitochondries de cellules humaines et qui peuvent mener à un clivage spécifique de l'ADN.

De façon surprenante, l'ARNsg KSS auquel nous n'avons pas ajouté de motif d'import mitochondrial est lui aussi retrouvé dans la fraction mitochondriale purifiée et en proportion comparable à l'ARNsg D+KSS ($\approx 35\%$). Deux éléments pourraient expliquer cet import mitochondrial apparent. Le premier de ces éléments concerne la localisation subcellulaire des ARNsg KSS. En effet, habituellement le système CRISPR/Cas9 est utilisé pour une manipulation du génome nucléaire et la production des ARNsg y est la plupart du temps obtenue grâce à un vecteur d'expression contenant la séquence de l'ARNsg sous le contrôle d'un promoteur de l'ARN polymérase III. Les ARNsg, transcrits dans le noyau, ont donc vocation à rester principalement au sein de celui-ci pour s'associer à la nucléase Cas9. De ce fait, ils ne comportent pas de signaux d'export nucléaire. Une publication fait d'ailleurs mention de cette problématique d'export nucléaire des ARNsg et confirme que les ARNsg sont principalement localisés dans le noyau (Nelles *et al.*, 2016). Or, pour qu'un ARN soit importé dans les mitochondries de cellules humaines, il faut certainement qu'il soit dans un premier temps exporté du noyau pour interagir avec des partenaires protéiques le dirigeant vers ces organites. Dans nos expériences, nous introduisons les ARNsg synthétisés *in vitro* dans les cellules grâce à un agent de transfection. Nous pouvons alors imaginer que les ARNsg sont libérés au sein du cytoplasme et peuvent donc interagir avec des facteurs permettant leur adressage mitochondrial. Le second élément concerne d'ailleurs la structure des ARNsg. En

effet, ceux-ci comprennent plusieurs petites structures en tige-boucle similaires aux motifs d'import F et D et nous pouvons donc émettre l'hypothèse que celles-ci puissent permettre leur interaction avec des partenaires protéiques les dirigeant vers les mitochondries des cellules humaines. La combinaison de ces deux éléments pourrait ainsi expliquer la présence de l'ARNsg KSS dans la fraction mitochondriale des cellules cybrides.

Ces expériences suggèrent donc que des ARNsg capables de mener à un clivage spécifique de l'ADNmt mutant KSS peuvent être importés dans les mitochondries de cellules humaines. De plus, alors que l'ajout de la tige-boucle F à l'extrémité 3' de l'ARNsg n'altère pas le clivage des complexes Cas9/ARNsg, l'ajout de la tige-boucle D à l'extrémité 5' semble avoir un impact négatif sur le clivage.

3. Modifications de l'endonucléase Cas9 en vue de son adressage mitochondrial

Je me suis ensuite tourné vers l'adressage mitochondrial du second composant du système CRISPR/Cas9 de *S.pyogenes*, l'endonucléase Cas9.

Pour exprimer cette protéine, nous avons choisi d'utiliser un plasmide commercial contenant la séquence humanisée de la nucléase Cas9 qui comporte un signal d'adressage nucléaire (NLS) à son extrémité C-terminale (hCas9-NLS). Afin d'adresser cette nucléase vers les mitochondries, j'ai donc tout d'abord supprimé ce NLS pour empêcher sa relocalisation au sein du noyau. Puis, pour diriger cette protéine dans les mitochondries humaines, j'ai ajouté une préséquence d'adressage mitochondrial à l'extrémité N-terminale de hCas9. La préséquence d'adressage mitochondrial de la sous-unité transmembranaire COX8A (MTS^{COX8A}, **Mitochondrial Targeting Sequence de COX8A**) a été très largement utilisée pour entraîner l'import mitochondrial de protéines diverses (Bacman *et al.*, 2013; Hashimoto *et al.*, 2015). J'ai ainsi choisi d'ajouter cette préséquence à l'extrémité N-terminale de hCas9 pour la diriger vers les mitochondries (**Figure 46A**).

Pour observer si la protéine MTS^{COX8A}-hCas9 est exprimée et importée dans les mitochondries de cellules humaines, j'ai utilisé deux méthodes différentes.

Dans un premier temps, des cellules Hep G2 ont été transfectées avec le plasmide permettant l'expression de la protéine d'intérêt. Vingt-quatre heures après transfection, les

cellules ont été observées par microscopie confocale après immunomarquages avec un anticorps dirigé contre hCas9 et un anticorps ciblant la protéine de la membrane mitochondriale externe TOM20. Deux populations de cellules ont alors pu être décrites (**Figure 46B**) : une première population de cellules (<10%) où l'on peut observer une localisation principalement cytosolique de hCas9 formant de larges agrégats (**Figure 46B, en bas**), et une seconde population de cellules où l'on voit une colocalisation de la protéine MTS^{COX8A}-hCas9 avec le signal TOM20 (**Figure 46B, en haut**).

La nucléase MTS^{COX8A}-hCas9 est donc bien exprimée au sein des cellules transfectées, et dans la plupart des cellules, elle est également adressée vers les mitochondries. La localisation cytosolique de la protéine observée dans une partie des cellules pourrait quant à elle être le résultat d'une surexpression de celle-ci. Dans ce cas, la quantité de chaperonnes permettant le repliement correct et l'import mitochondrial de MTS^{COX8A}-hCas9 ne serait pas suffisant, entraînant alors cette localisation cytosolique avec de larges agrégats de protéines.

Dans un second temps, pour confirmer l'import mitochondrial de MTS^{COX8A}-hCas9, j'ai analysé par western blot les fractions protéiques totales et mitochondriales purifiées (traitées à la protéinase K) de cellules cybrides KSS transfectées (**Figure 46C**). En parallèle, j'ai aussi analysé les fractions totales et mitochondriales des cellules transfectées avec le vecteur permettant l'expression de la protéine hCas9-NLS. Les niveaux d'expression des protéines hCas9-NLS et MTS^{COX8A}-hCas9 sont tout à fait comparables. Comme prévu, alors qu'aucun signal ne peut être observé dans la fraction mitochondriale traitée à la protéinase K pour hCas9-NLS, un signal persiste dans cette même fraction pour les cellules transfectées avec le plasmide « MTS^{COX8A}-hCas9 ». Ceci confirme donc qu'une partie de l'endonucléase MTS^{COX8A}-hCas9 est bien localisée dans les mitochondries de cellules cybrides KSS.

Pour analyser de façon plus précise la localisation subcellulaire de la protéine d'intérêt, des cellules Hep G2 ont par la suite été co-transfectées avec le plasmide MTS^{COX8}-hCas9 et un plasmide permettant l'expression de l'hélicase TWINKLE couplée à la protéine fluorescente mEOS2, puis analysée grâce aux techniques de microscopie super-résolutive PALM (**PhotoActivated Localization Microscopy**) et STORM (**STochastic Optical Reconstruction Microscopy**). Ces analyses ont été réalisées grâce à une collaboration entre notre équipe, et plus particulièrement le docteur Anna Smirnova, et l'équipe « Biophotonique des interactions moléculaires et cellulaires » dirigée par le Dr.Yves Mély au Laboratoire de Biophotonique et de Pharmacologie (Faculté de Pharmacie, Université de Strasbourg). Ces technologies permettent de dépasser la limite de diffraction en microscopie à fluorescence et permettent d'atteindre des résolutions beaucoup plus fines de l'ordre de 100nm. Les premières analyses réalisées ont ainsi montré que l'endonucléase MTS^{COX8}-hCas9 (en rose) peut être retrouvée en partie à proximité de l'hélicase TWINKLE-mEOS2 (en vert) (**Figure 47**). Ces résultats suggèrent donc que la protéine MTS^{COX8}-hCas9 est bien relocalisée dans la matrice mitochondriale et semble proche de TWINKLE, donc par extension de l'ADNmt, ce qui représente une localisation sub-mitochondriale optimale pour l'activité de cette protéine.

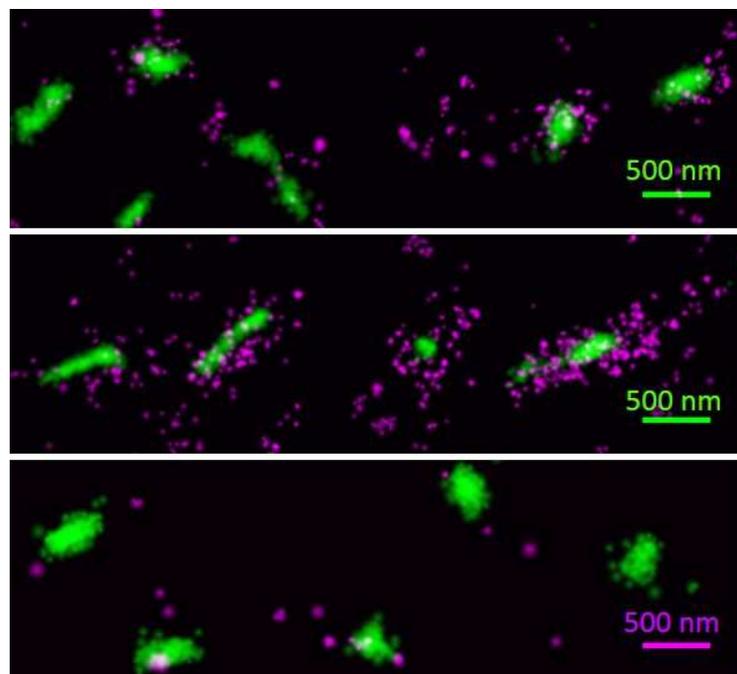


Figure 47. Localisation sub-mitochondriale de la protéine MTS^{COX8}-hCas9.

Images de microscopie super-résolutive des protéines MTS^{COX8}-hCas9 (en rose) et TWINKLE-mEOS2 (en vert). Trois images sont présentées à partir d'une même expérience. L'échelle est indiquée en bas à droite. La microscopie a été réalisée par le Dr. Anna Smirnova.

4. Application du système CRISPR/Cas9 mitochondrial sur les cellules cybrides KSS

Les résultats obtenus précédemment suggèrent que nous pouvons adresser un système CRISPR/Cas9 fonctionnel dans les mitochondries de cellules humaines. Pour confirmer cela, j'ai donc appliqué cet outil sur les cellules cybrides KSS afin de voir si celui-ci peut cliver spécifiquement l'ADNmt mutant et induire un changement d'hétéroplasmie suite à ce clivage.

Les cellules cybrides ont alors été co-transfectées avec le plasmide MTS^{COX8A}-hCas9 et soit l'ARNsg KSS, soit l'ARNsg KSS+F. L'hétéroplasmie des cellules transfectées a ensuite été mesuré 24h et une semaine après introduction du système CRISPR/Cas9 mitochondrial. Malheureusement, malgré l'import mitochondrial des différents composants de cet outil, aucune variation significative du taux d'hétéroplasmie n'a pu être obtenu, ni après 24h, ni après une semaine (**Figure 48**).

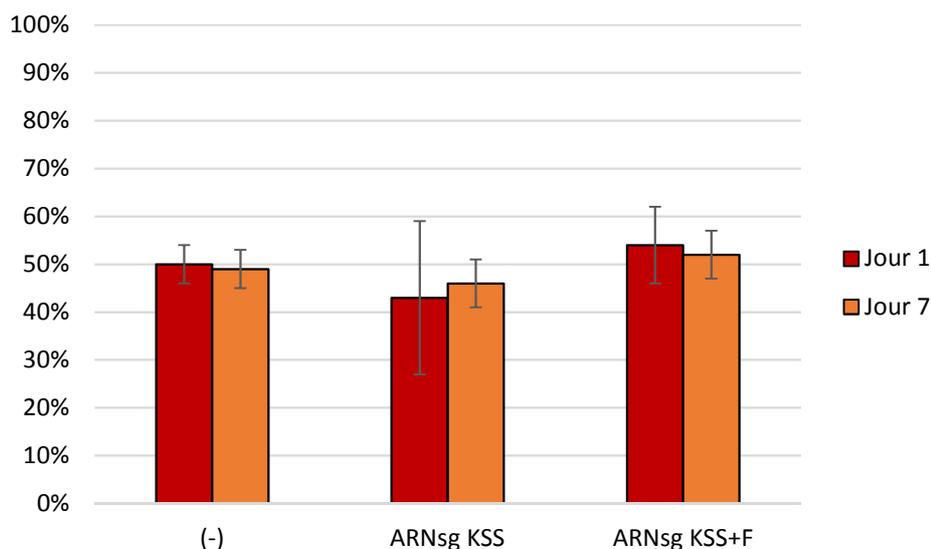


Figure 48. Taux d'hétéroplasmie des cellules cybrides KSS après application de l'outil CRISPR/Cas9 mitochondrial.

Analyse de l'hétéroplasmie des cellules cybrides KSS par qPCR, 24h (Jour 1) et 7 jours (Jour 7) après co-transfection. Toutes les cellules ont été transfectées avec le plasmide MTS^{COX8A}-hCas9. (-) désigne des cellules qui n'ont pas été transfectées avec un ARNsg. Les écart-types ont été déterminés à partir de trois expériences indépendantes.

J'ai alors émis plusieurs hypothèses pour expliquer l'absence d'effet sur l'hétéroplasmie des cellules cybrides après application de ce système CRISPR/Cas9

mitochondrial. Tout d'abord, nous pouvons imaginer que bien qu'il ait été démontré *in vitro* que les ARNsg utilisés dans cette expérience mènent à un clivage spécifique de l'ADNmt mutant KSS, les complexes Cas9/ARNsg pourraient couper l'ADNmt de façon non spécifique *in vivo*, ce qui ne permettrait pas l'obtention d'une diminution de l'hétéroplasmie. C'est une seconde hypothèse qui a été privilégiée à ce moment, qui explique l'absence d'effet sur l'hétéroplasmie par une très faible efficacité de co-transfection des cellules cybrides avec les ARNsg et le plasmide MTS^{COX8A}-hCas9. En effet, les cellules cybrides KSS sont relativement fragiles car elles contiennent une proportion importante d'ADNmt mutant. La transfection de ces cellules au moyen d'un agent comme la Lipofectamine 2000 que nous utilisons au laboratoire a souvent un impact négatif non négligeable sur les cellules avec une forte mortalité cellulaire. A cause de cette forte toxicité, la proportion de cellules cybrides KSS ayant intégré à la fois le plasmide MTS^{COX8A}-hCas9 et un ARNsg pourrait être très faible, ce qui expliquerait l'absence d'effet significatif sur le taux d'hétéroplasmie.

Cette hypothèse a notamment été soutenue par un échange avec Masami Hashimoto au sujet des mitoTALEN lors du congrès *Targeting Mitochondria* qui a eu lieu à la fin du mois d'octobre 2015 à Berlin. Au cours de leurs expériences visant à utiliser les mitoTALEN sur des cellules cybrides porteuses de la mutation ponctuelle m.8344A>G dans le gène de l'ARNt^{Lys}, la population de cellules co-transfectées avec les deux plasmides exprimant chacun un monomère de mitoTALEN est sélectionnée par cytométrie en flux (Hashimoto *et al.*, 2015). Les cellules co-transfectées ne représentent ainsi qu'une très faible proportion de la population initiale (1 à 5%) et les variations d'hétéroplasmie ne sont observées qu'après sélection et non dans la population initiale.

Afin d'optimiser le système CRISPR/Cas9 mitochondrial, j'ai donc tenté par la suite d'augmenter le nombre de cellules contenant à la fois l'endonucléase MTS^{COX8A}-hCas9 et un ARNsg ciblant l'ADNmt.

II. Application du système CRISPR/Cas9 mitochondrial à une lignée cellulaire sauvage

L'application du système CRISPR/Cas9 mitochondrial sur les cellules cybrides KSS par co-transfection avec le plasmide MTS^{COX8A}-hCas9 et les ARNsg synthétisés *in vitro* n'a pas permis l'observation d'un effet significatif sur leur taux d'hétéroplasmie. Pour observer un effet du système CRISPR/Cas9 mitochondrial, j'ai donc choisi de l'appliquer sur une lignée cellulaire sauvage, plus robuste à la transfection. De plus, afin de contrôler l'expression de la protéine MTS^{COX8A}-hCas9 et supprimer une étape de transfection, j'ai pris l'initiative de créer une lignée cellulaire stable d'expression inductible grâce au système HEK 293 Flp-InTM T-RexTM (Invitrogen). Grâce à cette lignée stable, nous devrions en théorie obtenir une population homogène de cellules contenant le gène de l'endonucléase MTS^{COX8A}-hCas9 sous le contrôle d'un promoteur inductible à la tétracycline. Pour introduire le système CRISPR/Cas9 mitochondrial dans ces cellules, il n'y a donc plus qu'à transfecter ces cellules avec les différents ARNsg modifiés.

Pour commencer, j'ai tout d'abord développé une nouvelle série d'ARNsg, ciblant non plus l'ADNmt mutant KSS, mais l'ADNmt sauvage (WT).

1. Production et modification d'ARNsg ciblant l'ADNmt sauvage

Afin de pouvoir également appliquer cette série d'ARNsg WT à la lignée cellulaire cybride KSS, et donc permettre une augmentation du taux d'hétéroplasmie au sein de cette lignée, j'ai recherché une séquence sur l'ADNmt sauvage qui pourrait permettre sa distinction de l'ADNmt mutant KSS et donc son clivage spécifique. En théorie, pour atteindre cet objectif, toute séquence du type 5'-GN₂₀GG-3' présente au sein de la région délétée de l'ADNmt mutant KSS pourrait être ciblée par l'outil CRISPR/Cas9.

Plusieurs séquences correspondant à ces critères ont pu être identifiées au sein du génome mitochondrial de référence. Néanmoins, afin d'éprouver la spécificité du système CRISPR/Cas9, mais aussi et surtout, par souci pratique de disponibilité en matériel, j'ai choisi la séquence 5'-GAAGGAAGAGAAGTAAGCCGAGG-3' (coordonnées sur l'ADNmt de référence : 15433-15455), située sur le brin H du gène *MT-CYB* (**Figure 49**). Cette séquence contient une partie commune avec le génome mitochondrial mutant KSS (17 nucléotides) et une partie

spécifique au génome mitochondrial de référence (6 nucléotides) contenant notamment la séquence PAM 5'-AGG-3'. Cette séquence de 23 nucléotides est unique au sein du génome mitochondrial de référence et absente du génome mitochondrial mutant KSS suggérant ainsi qu'elle pourrait permettre une bonne discrimination entre les ADNmt sauvage et mutant KSS et un clivage spécifique.

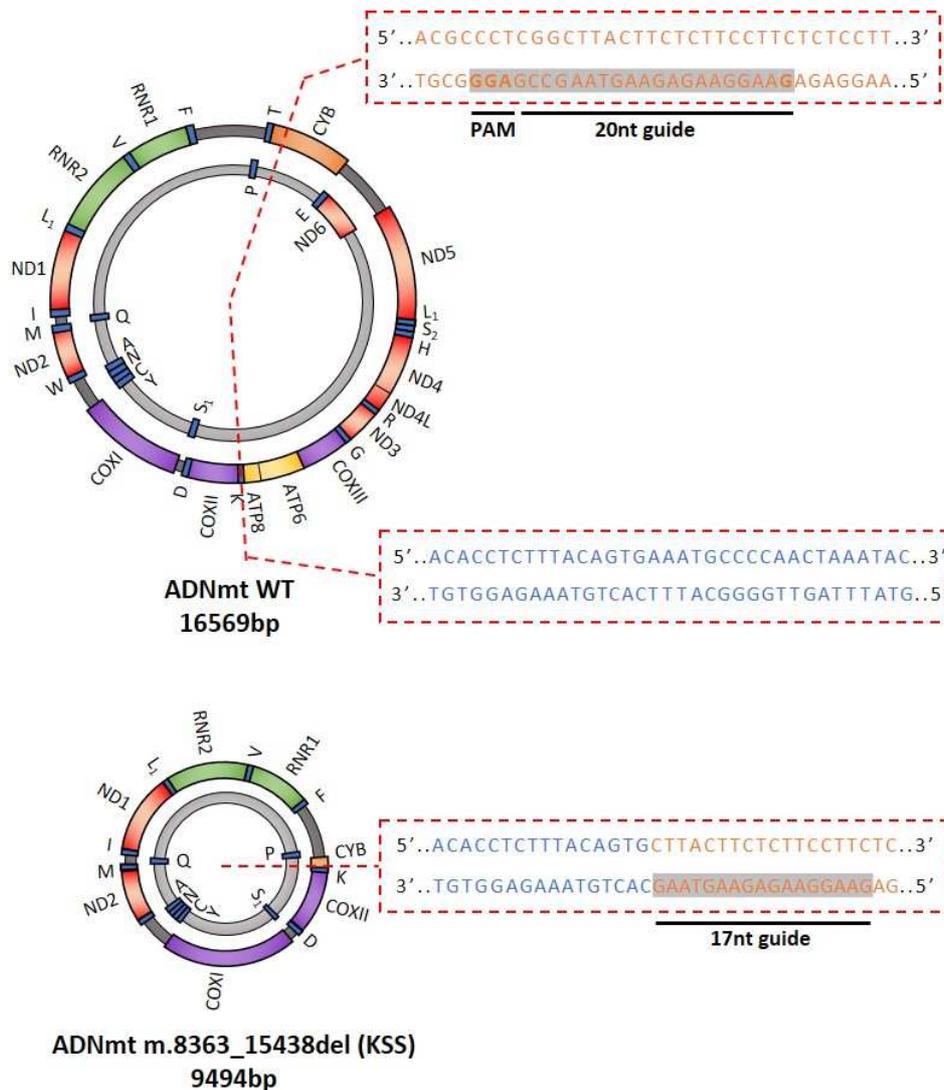


Figure 49. Séquence ciblée par l'ARNsg WT sur l'ADNmt de référence.

Cartes de l'ADNmt de référence et de l'ADNmt mutant m.8363_15438del (KSS). Les séquences situées à la jonction des bornes de la délétion pour l'ADNmt mutant et au niveau des bornes de la délétion pour l'ADNmt sauvage sont indiquées (en bleu, ARNt^{Lys} ; en orange, MT-CYB). Les séquences complémentaires à l'ARNsg WT sont indiquées en gris. Abréviation : PAM : Protospacer-Adjacent Motif.

Pour appuyer cette analyse *in silico* et voir si l'ARNsg WT peut couper l'ADNmt sauvage de façon efficace et spécifique, un test de clivage *in vitro* a une nouvelle fois été réalisé (**Figure 50B, ARNsg WT**). Cette fois-ci, une grande partie du pWT est clivé alors qu'aucun clivage spécifique ne peut être observé pour le plasmide pMt. Ces résultats confirment donc que la séquence choisie pourrait permettre un clivage efficace et spécifique de l'ADNmt sauvage par rapport à l'ADNmt mutant KSS.

Après avoir identifié la séquence que l'on peut cibler sur l'ADNmt sauvage pour mener à un clivage spécifique de cet ADN, j'ai modifié l'ARNsg WT (**Figure 50A, à gauche**) pour permettre leur adressage mitochondrial. Dans un premier temps, de façon tout à fait similaire aux ARNsg KSS, j'ai ajouté la tige-boucle F à l'extrémité 3', ou la tige-boucle D à l'extrémité 5', de l'ARNsg WT dans sa version minimale (ARNsg⁽⁺⁴⁸⁾). J'ai ensuite effectué un test de clivage *in vitro* afin d'évaluer leur capacité à mener à un clivage spécifique de l'ADN. Malheureusement, aucun clivage n'a pu être détecté pour ces deux ARNsg modifiés (données non présentées). Comme nous l'avons évoqué dans l'introduction, il a par la suite été démontré que la présence des boucles 2 et 3 de l'ARNsg augmentent de façon importante l'activité de clivage de l'endonucléase Cas9 *in vivo*. J'ai alors essayé d'ajouter les motifs structuraux d'import mitochondrial aux versions complètes des ARNsg (ARNsg WT+F; ARNsg D+WT) (**Figure 50A, ARNsg WT+F et ARNsg D+WT**) et j'ai une nouvelle fois testé leur capacité à mener à un clivage *in vitro*. Cette fois-ci, nous pouvons constater que, d'une manière comparable à ce qui a été obtenu pour les ARNsg KSS, l'ARNsg WT+F permet l'obtention d'un clivage total de pWT (**Figure 50B, ARNsg WT+F**) sans affecter pMt. En revanche, le clivage de pWT en présence de l'ARNsg D+WT n'est que partiel bien que spécifique (**Figure 50B, ARNsg D+WT**). Ces résultats suggèrent ainsi que la présence de la tige-boucle D en 5' de l'ARNsg altère l'efficacité de clivage des complexes CRISPR/Cas9 résultants, alors que la présence de la tige-boucle F en 3' de l'ARNsg ne semble pas gêner ce clivage qui reste très efficace et spécifique. J'ai ainsi ici choisi de poursuivre les expériences uniquement avec l'ARNsg WT+F et l'ARNsg WT.

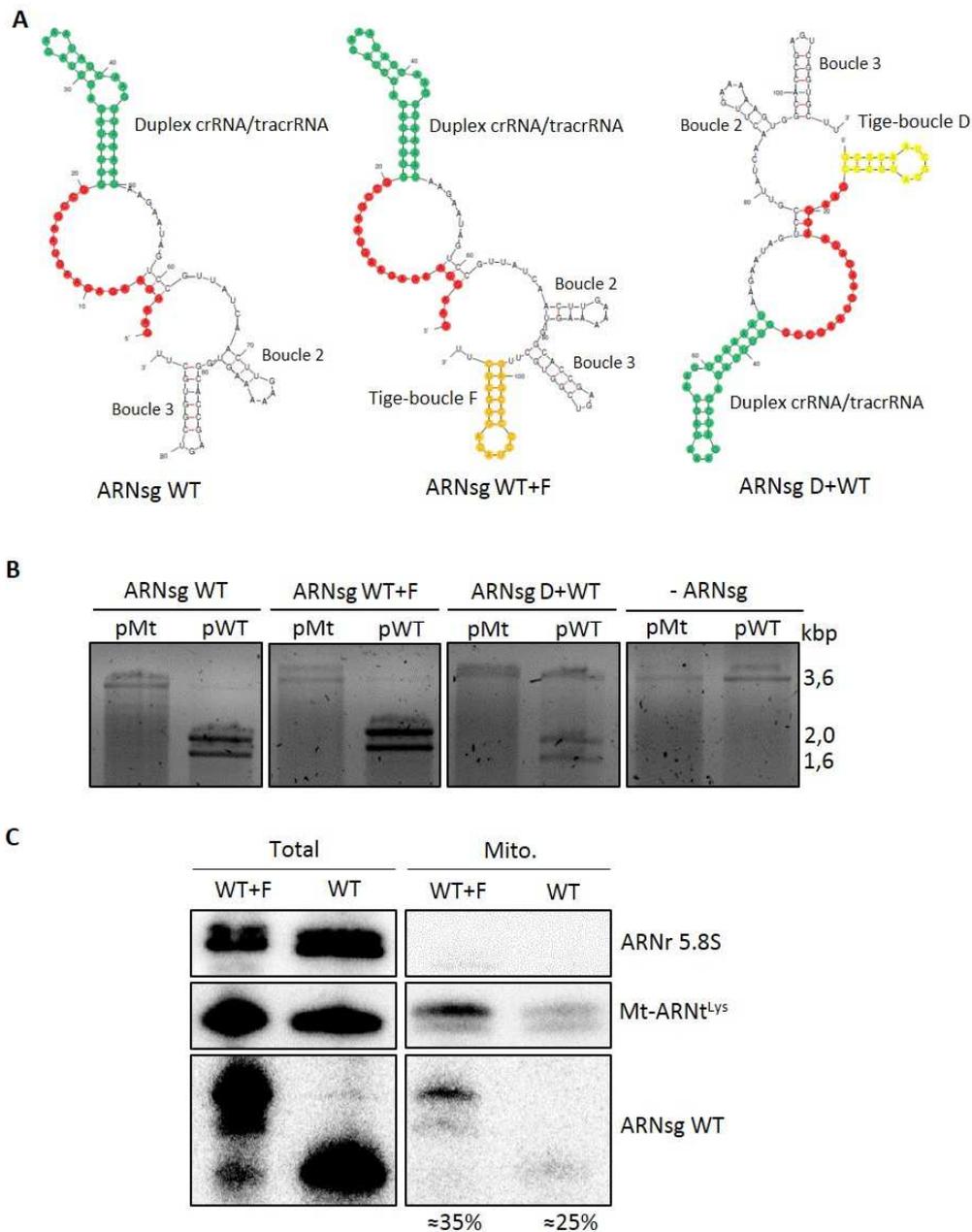


Figure 50. Les modifications de l'ARNsg WT permettent leur adressage mitochondrial sans altérer le clivage spécifique des complexes Cas9-ARNsg.

(A) Structures secondaires de l'ARNsg WT et des ARNsg modifiés WT+F et D+WT. Les 20 nucléotides guide sont en rouge, le duplex ARNcr/ARNtracr en vert, la tige-boucle F en orange et la tige-boucle D en jaune. **(B)** Tests de clivage *in vitro* des différents ARNsg en présence d'un plasmide contenant un fragment d'ADNmt sauvage (pWT) ou mutant KSS (pMt). La taille des fragments est indiquée sur le côté. -ARNsg, contrôle sans ARNsg. **(C)** Hybridations de type northern des ARN totaux (Total) ou extraits de mitochondries purifiées (Mito.) 48h après transfection. La sonde ARNr 5.8S permet de vérifier l'absence de contamination cytosolique. La sonde Mt-ARNt^{Lys} permet la détection de l'ARNt^{Lys} mitochondrial. La proportion d'ARNsg cellulaire présent dans la fraction mitochondriale est indiquée en %.

J'ai ensuite analysé la capacité de ces deux ARNsg à être importés dans les mitochondries de cellules humaines. En utilisant le même protocole que pour les ARNsg KSS, les ARN extraits des fractions totales et mitochondriales de cellules Hep G2 transfectées avec les différents ARNsg WT ont été analysées par hybridation de type northern. Nous avons ainsi pu déterminer qu'environ 35% des ARNsg WT+F au sein des cellules, sont situés dans la fraction mitochondriale (**Figure 50C, ARNsg WT+F**). Environ 25% des ARNsg WT cellulaires sont également retrouvés dans la fraction mitochondriale purifiée (**Figure 50C, ARNsg WT**), ce qui est en accord avec les résultats obtenus précédemment pour l'ARNsg KSS.

2. Construction d'une lignée cellulaire sauvage d'expression inductible de l'endonucléase MTS^{COX8A}-hCas9

Après avoir produit des ARNsg pouvant cibler l'ADNmt sauvage, j'ai produit une lignée cellulaire sauvage d'expression inductible de l'endonucléase MTS^{COX8A}-hCas9. Pour cela, j'ai tout d'abord intégré le gène permettant son expression dans le plasmide pcDNA5TM/FRT/TO, puis utilisé le système Flp-InTM T-RexTM (*Invitrogen*) pour insérer ce plasmide dans la lignée cellulaire commerciale HEK 293 Flp-InTM T-RexTM. Afin de vérifier si les cellules obtenues permettent l'expression de la nucléase MTS^{COX8A}-hCas9 et son import, j'ai ajouté 1µg/mL de tétracycline au milieu de culture et j'ai analysé par western blot les fractions protéiques totales, mitochondriales, et mitochondriales purifiées à la protéinase K ainsi que les mitoplastes obtenus par traitement à la digitonine (**Figure 51**).

Après induction à la tétracycline, un signal dont la taille correspond à la protéine MTS^{COX8A}-hCas9 peut être observé. En revanche, ce signal peut également être constaté en absence d'induction à la tétracycline (**Figure 51, Total (-)**), ce qui pourrait s'expliquer par une « fuite » de l'expression depuis le promoteur CMV inductible à la tétracycline. Cependant, alors que ce signal peut encore être vu dans la fraction mitochondriale (**Figure 51, Mito. (-)**), il disparaît après purification (**Figure 51, Mito.+PK**) et traitement à la digitonine (**Figure 51, Mito.+PK+D**). Le signal hCas9 observé après induction persiste quant à lui dans ces deux fractions après induction à la tétracycline. Ces résultats confirment donc que la protéine MTS^{COX8A}-hCas9 est exprimée dans la lignée stable et importée dans les mitochondries pour être retrouvée en partie dans la matrice mitochondriale. Il est également possible que le signal observé sans induction à la tétracycline soit un signal aspécifique qui correspond à une protéine d'une taille similaire.

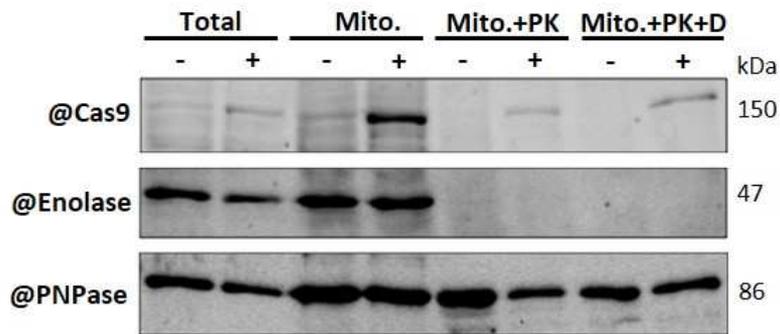


Figure 51. Analyse de la localisation subcellulaire de la protéine MTS^{COX8A}-hCas9 au sein des cellules HEK293-T-Rex-MTS^{COX8A}-hCas9.

Analyse par western-blot des extraits protéiques total (total), mitochondrial (Mito.), mitochondrial traité à la protéinase K (Mito.+PK) et de mitoplastes (Mito.+PK+D) de cellules HEK293-T-Rex-MTS^{COX8A}-hCas9 24h après induction (+) avec 1µg/mL de tétracycline ou sans induction (-). L'énolase est utilisée comme marqueur de contamination cytosolique et la PNPase est un marqueur de la mitochondrie. La taille des protéines analysées est indiquée à droite en kDa.

Par la suite, j'ai essayé de déterminer les conditions d'induction à la tétracycline qui pourraient permettre une expression et une localisation subcellulaire correcte de la protéine MTS^{COX8}-hCas9 dans un nombre maximal de cellules, et ceci grâce à des analyses par microscopie confocale.

Tout d'abord, j'ai analysé la concentration optimale de tétracycline à utiliser dans nos expériences (**Figure 52**). Pour cela, différentes concentrations de tétracycline ont été ajoutées au milieu de culture. Les cellules ont ensuite été observées par microscopie confocale 24h après induction, après immunomarquage avec un anticorps dirigé contre la nucléase hCas9 et un anticorps dirigé contre la protéine de la membrane mitochondriale externe TOM20. Nous avons pu ainsi observer qu'une concentration de 2µg/mL ou de 1µg/mL de tétracycline permet une forte expression de la nucléase MTS^{COX8A}-hCas9 au sein d'un grand nombre de cellules. Cependant, cette très forte expression semble engendrer une localisation anormale de la protéine d'intérêt. En effet, une grande proportion de cellules présente une localisation cytosolique diffuse avec de larges agrégats de protéine MTS^{COX8A}-hCas9. L'utilisation de concentrations plus faibles en tétracycline (0,05µg/mL) permet de diminuer ce phénomène puisque l'on retrouve une plus grande proportion de cellules où la nucléase MTS^{COX8A}-hCas9 co-localise avec le réseau mitochondrial, sans agrégats de protéine.

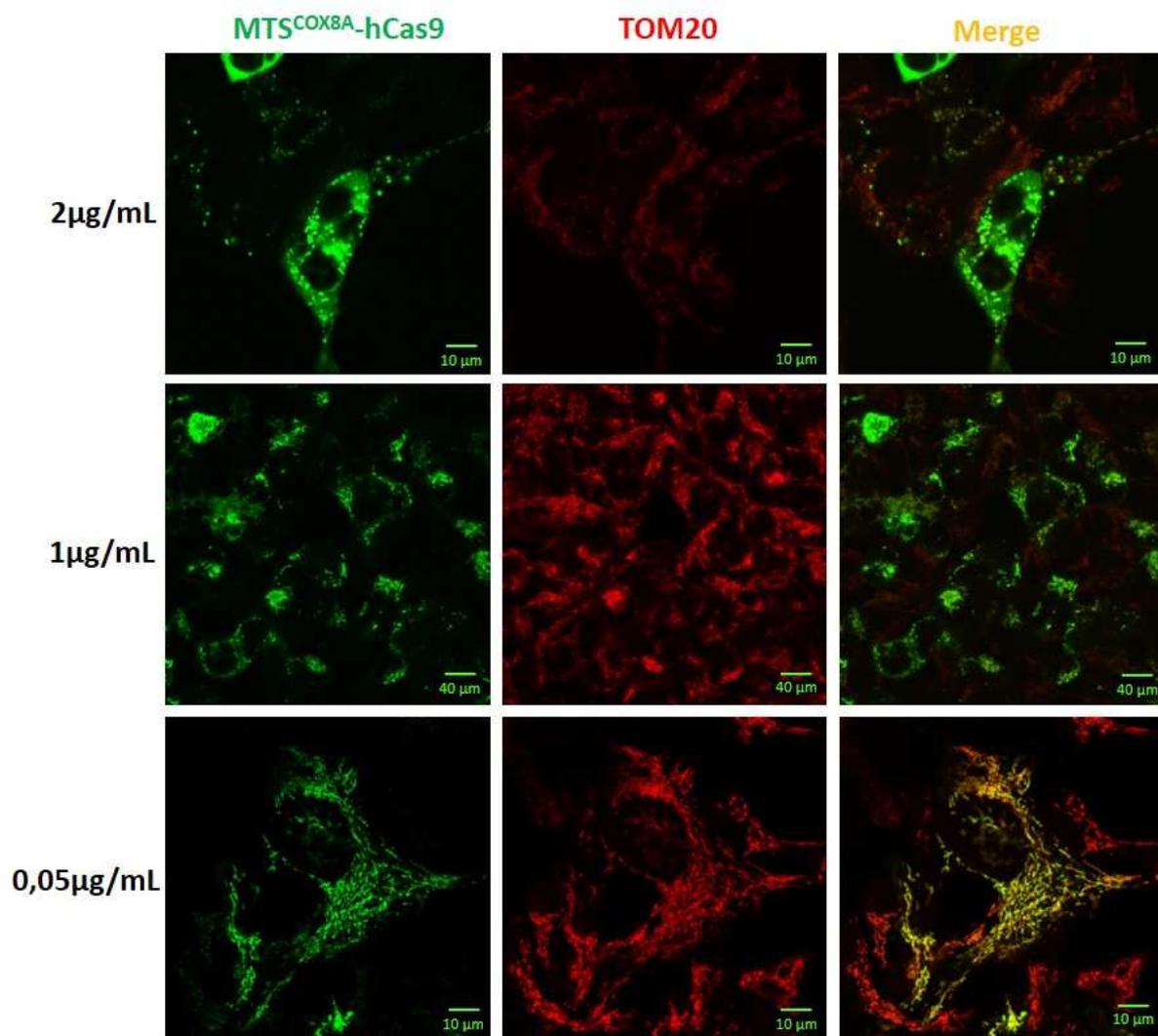


Figure 52. Expression et import de la protéine MTS^{COX8A}-hCas9 en fonction de la concentration en tétracycline.

Analyse par microscopie confocale de cellules HEK293-T-Rex-MTS^{COX8A}-hCas9 après induction avec différentes concentrations de tétracycline (indiquées à gauche). TOM20 est utilisée comme marqueur intrinsèque de la mitochondrie. Les protéines MTS^{COX8A}-hCas9 et TOM20 sont visualisées par immunofluorescence respectivement en vert et en rouge. La superposition des deux images est présentée à droite (Merge).

Puis, j'ai analysé l'expression et l'import de la protéine d'intérêt après différents temps d'induction à la tétracycline (2h, 6h et 24h) en utilisant la concentration déterminée précédemment de 0,05μg/mL (**Figure 53**). Après 2h d'induction à la tétracycline, seulement 10% environ de la population cellulaire semble exprimer la nucléase MTS^{COX8A}-hCas9. Néanmoins, au sein de ces cellules, la protéine d'intérêt démontre d'ores et déjà une co-localisation avec le réseau mitochondrial, suggérant que son import mitochondrial est un phénomène rapide. Après 6h d'induction à la tétracycline, environ 40% des cellules observées

démontrent une expression et un adressage mitochondrial de la nucléase. Cette proportion est stable après 24h d'induction à la tétracycline.

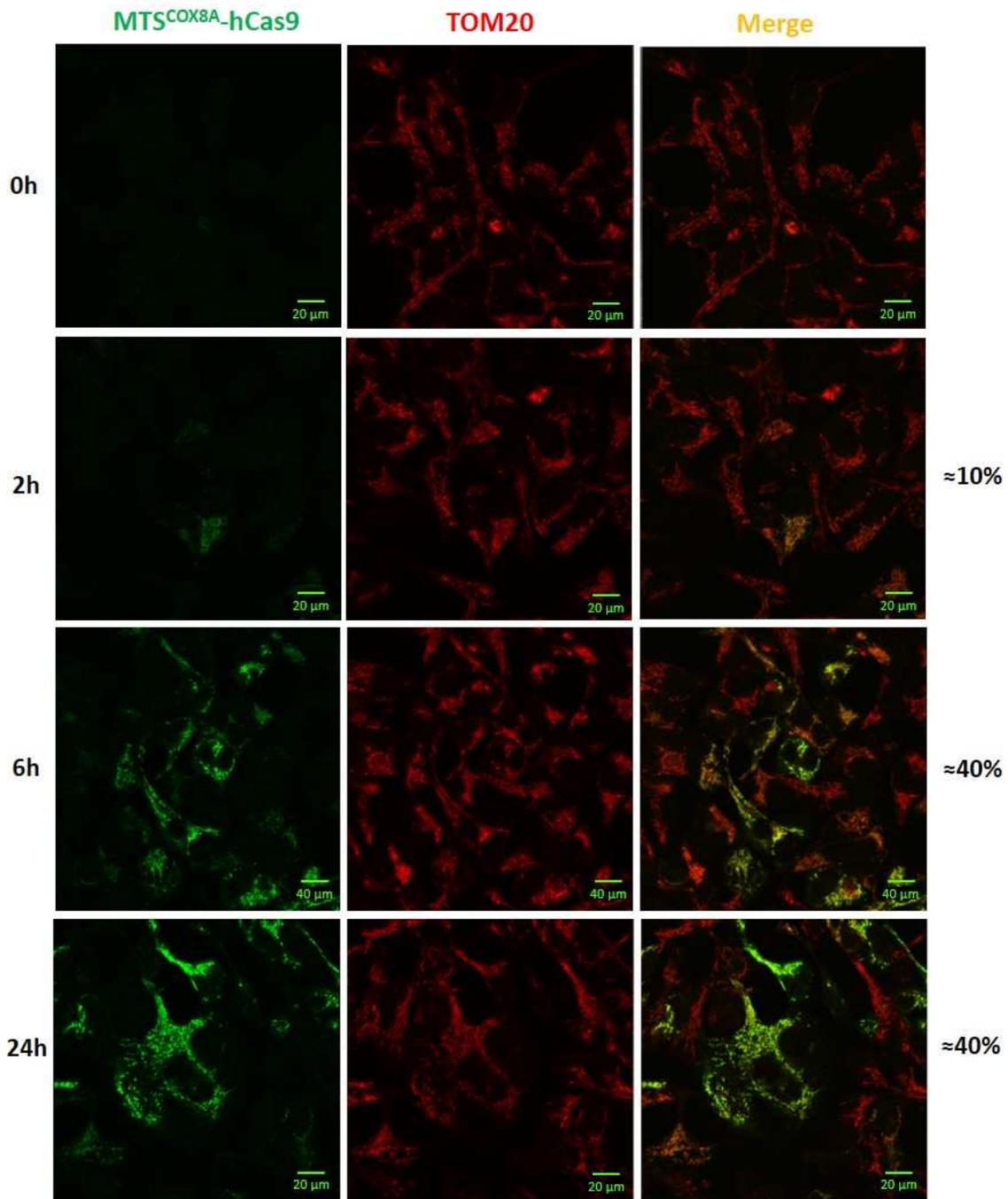


Figure 53. Expression et import de la protéine MTS^{COX8A}-hCas9 en fonction du temps d'induction.

Analyse par microscopie confocale de cellules HEK293-T-Rex-MTS^{COX8A}-hCas9 après différents temps d'induction avec 0,05 μg/mL de tétracycline (indiqués à gauche). Le pourcentage de cellules présentant une fluorescence verte correspondant à la protéine MTS^{COX8A}-hCas9 est indiqué à droite. TOM20 est utilisée comme marqueur intrinsèque de la mitochondrie.

Ainsi, il semble que l'ajout de 0,05µg/mL de tétracycline dans le milieu de culture de la lignée stable ne permette l'expression simultanée de la protéine que dans environ 40% des cellules. Ceci pourrait peut-être s'expliquer par la faible concentration de tétracycline utilisée lors de cette expérience qui ne permettrait pas d'induire simultanément la production de la protéine au sein de toute la population cellulaire. Une autre explication reposerait sur la présence d'une population hétérogène de cellules où certaines cellules contiennent le gène permettant l'expression de MTS^{COX8A}-hCas9 et d'autres non.

3. Etude de l'activité mitochondriale de la nucléase MTS^{COX8}-hCas9

Puisque l'endonucléase MTS^{COX8A}-hCas9 est bien relocalisée dans la matrice mitochondriale grâce à l'ajout de la préséquence N-terminale de la protéine COX8A, j'ai ensuite voulu vérifier si celle-ci conserve son activité nucléasique après import mitochondrial.

En effet, les conditions physico-chimiques qui règnent au sein de la mitochondrie ne sont pas les mêmes qu'au sein du noyau, ce qui pourrait empêcher ou affecter l'activité de clivage spécifique de ce système CRISPR/Cas9. De plus, la maturation de la protéine précurseur au niveau de la préséquence pourrait altérer la structure de hCas9 en clivant une partie de la nucléase elle-même. Ceci est d'autant plus à envisager que le premier résidu catalytique essentiel de la nucléase est situé en tout début de chaîne polypeptidique (D₁₀, Acide aspartique en position 10) (**Figure 46A**).

Pour étudier cela, j'ai induit la production de la protéine MTS^{COX8A}-hCas9 au sein de la lignée cellulaire stable et j'ai isolé les mitochondries de ces cellules. Les mitochondries ont ensuite été lysées et ces lysats mitochondriaux ont été utilisés pour réalisés des tests de clivage *in vitro*. J'ai ainsi placé ces lysats en présence de l'ARNsg WT+F et du plasmide pWT linéarisé présentant la région de l'ADN mitochondrial ciblée par cet ARNsg. Après 30 minutes d'incubation à 37°C, le produit de cette réaction a été purifié et déposé sur gel d'agarose. Après transfert de type Southern et hybridation, j'ai alors pu visualiser si le plasmide cible est clivé ou non par l'ajout des lysats mitochondriaux contenant la protéine MTS^{COX8A}-hCas9 (**Figure 54**).

L'incubation du plasmide avec la protéine Cas9 recombinante et l'ARNsg WT est utilisé ici comme contrôle positif et nous pouvons en effet observer dans ces conditions que le plasmide pWT est presque entièrement retrouvé sous sa forme clivée. L'utilisation de 5µg de lysat mitochondrial combiné à l'ARNsg WT+F permet aussi l'observation d'une petite

proportion de pWT clivé ce qui indique que la nucléase hCas9 associée à la fraction mitochondriale conserve son activité de clivage spécifique de l'ADN.

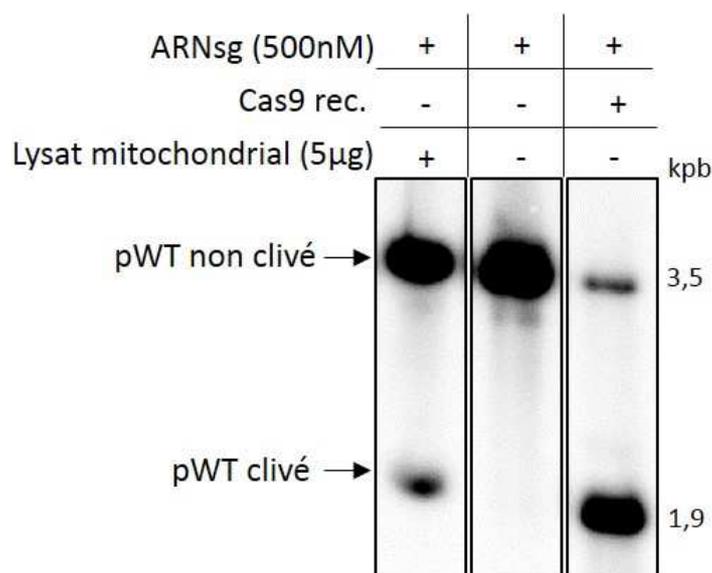


Figure 54. Activité de l'endonuclease MTS^{COX8A}-hCas9 au sein des mitochondries.

Analyse par Southern blot des produits de test de clivage *in vitro* réalisés en présence de 500nM d'ARNsg et soit 500nM de protéine Cas9 recombinante, soit 5µg le lysat de mitochondries isolées des cellules HEK293-T-Rex-MTS^{COX8A}-hCas9 24h après induction avec 0,1µg/mL de tétracycline. Les signaux correspondant au pWT non clivé et au pWT clivé sont indiqués par des flèches. La taille des fragments d'intérêt est indiquée à droite en kpb (kilopaires de base).

4. Application du système CRISPR/Cas9 mitochondrial sur les cellules sauvages HEK293-T-Rex-MTS^{COX8A}-hCas9

Après avoir identifié les conditions optimales que nous pouvons utiliser pour induire la production de la protéine MTS^{COX8A}-Cas9, et démontré que cette protéine conserve son activité nucléasique après import, j'ai transfecté la lignée cellulaire HEK293-T-Rex-MTS^{COX8A}-hCas9 avec les ARNsg ciblant l'ADNmt sauvage. Pour analyser l'effet de ce système CRISPR-Cas9 mitochondrial sur l'ADNmt, j'ai alors extrait l'ADN total des cellules transfectées 24, 48 et 72h après transfection.

La quantité relative d'ADNmt au sein des cellules transfectées a été évaluée par qPCR en temps réel en utilisant deux paires d'amorces : une première paire d'amorces permet l'amplification d'une partie du gène situé sur l'ADNmt *MT-RNR1* ; pour normaliser le nombre

de gènes *MT-RNR1*, une seconde paire d'amorces a été utilisée ciblant un gène unique au sein du génome nucléaire, celui de la rhodanèse (TST, Thiosulfate SulfurTransferase). L'amplification d'ADN avec ces deux paires d'amorces permet ainsi de déterminer une quantité relative d'ADNmt au sein des cellules en divisant le nombre de gènes *MT-RNR1* par le nombre de gènes *TST*. Cependant, à ce moment, nous n'étions pas en capacité de déterminer la quantité absolue de gènes à l'aide de courbes de calibration. Nous avons donc réalisé une quantification relative. La quantité d'ADNmt, exprimée par comparaison avec l'échantillon initial non traité est donc présentée en « fold-change » c'est-à-dire en quantité relative par rapport à une valeur initiale défini comme référence (quantité relative de gène *MT-RNR1* = 1) (**Figure 55**).

De façon surprenante, après transfection des cellules avec l'ARNsg WT+F ou avec l'ARNsg WT, aucune variation significative de la quantité relative d'ADNmt n'a pu être observée dans la période de temps analysée (**Figure 55, ARNsg WT+F et ARNsg WT**). En effet, les cellules transfectées avec les ARNsg WT présentent le même profil que les cellules induites à la tétracycline mais non transfectées avec un ARNsg (**Figure 55, (-)**), avec une quantité relative de gène *MT-RNR1* stable au cours du temps.

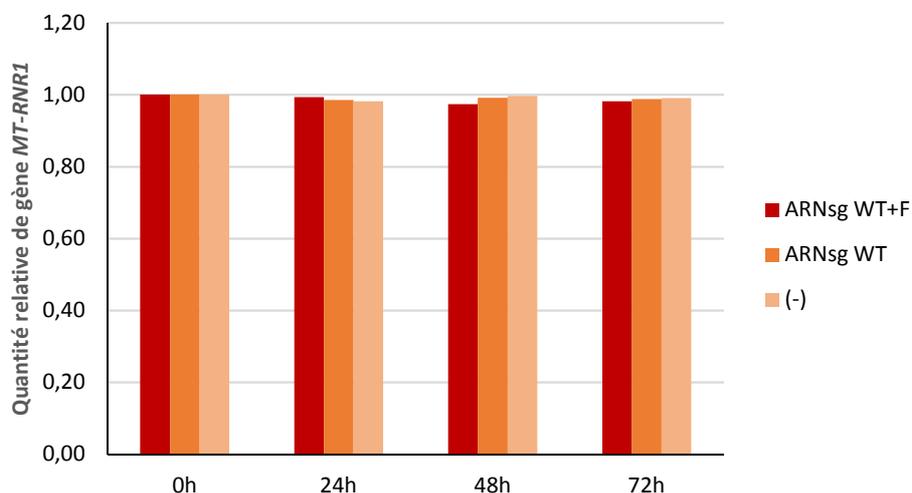


Figure 55. Evolution de la quantité relative de gène *MT-RNR1* en fonction du temps après application du système CRISPR/Cas9 mitochondrial.

Analyse par qPCR en temps réel de la quantité relative du gène mitochondrial *MT-RNR1* normalisée par la quantité de gène nucléaire TST (rhodanèse).

Ainsi, malgré l'adressage mitochondrial des deux composants du système CRISPR/Cas9 qui semblent conserver leur activité au sein des mitochondries, nous n'avons toujours pas pu observer d'effet sur l'ADN mitochondrial. Une des hypothèses qui pourrait expliquer cela consisterait en une trop faible efficacité de coupure de l'ADNmt qui serait de plus compensée par les systèmes de réparation de l'ADN double brin qui existent au sein de la mitochondrie. Suivant cette hypothèse, nous avons alors tenté de développer plusieurs stratégies d'introduction des ARNsg, et parmi celles-ci, une stratégie visant à introduire deux ARNsg ciblant deux régions distinctes de l'ADNmt en même temps.

III. Introduction d'ARNsg ciblant deux régions distinctes de l'ADNmt

Puisque la transfection des cellules avec un ARNsg dirigé contre le génome mitochondrial ne permet pas l'obtention de diminutions de la quantité d'ADNmt, nous avons souhaité observer l'effet que pourrait avoir la co-transfection des cellules avec deux ARNsg ciblant chacun une région distincte de l'ADNmt. Cette co-transfection engendrerait deux coupures de l'ADNmt que les systèmes de réparation de l'ADN double brin mitochondriaux ne pourraient pas réparer, entraînant alors une déplétion d'ADNmt.

1. Production et modification d'ARNsg ciblant la région NCR

J'ai donc recherché une troisième séquence pouvant être ciblée par l'outil CRISPR/Cas9, mais cette fois-ci située à la fois sur le génome mitochondrial sauvage et le génome mitochondrial mutant KSS. Théoriquement, toute séquence nucléotidique du type 5'-GN₂₀GG-3' située en dehors de la région de 7075 bases supprimée sur le génome mutant pourrait être ciblée. Cependant, afin d'obtenir l'effet le plus important sur la quantité de molécules d'ADNmt, nous avons décidé de cibler la région non-codante majeure (NCR), essentielle pour la réplication et l'expression de ce génome. De nombreuses séquences permettant de cibler cette région ont été révélées par une recherche bio-informatique. Une analyse des prédictions de structure secondaire des ARNsg obtenus a permis de choisir deux ARNsg (**Figure 56**) dont la structure présente la boucle ARNcr-ARNtracr et dont la partie guide n'est que très peu structurée. Les deux séquences sélectionnées sont des séquences uniques sur les génomes mitochondriaux de référence et mutant KSS.

En m'appuyant sur les données acquises dans le développement des deux premières séries d'ARNsg, j'ai modifié les ARNsg ciblant la région de contrôle. J'ai ainsi ajouté la tige-boucle F en 3' des versions complètes de l'ARNsg (ARNsg NCR¹+F ; ARNsg NCR²+F). Afin d'évaluer les capacités de clivage des deux ARNsg sélectionnés, j'ai réalisé des tests de clivage *in vitro* en présence ou en absence de protéine recombinante Cas9, sur des fragments PCR contenant la NCR.

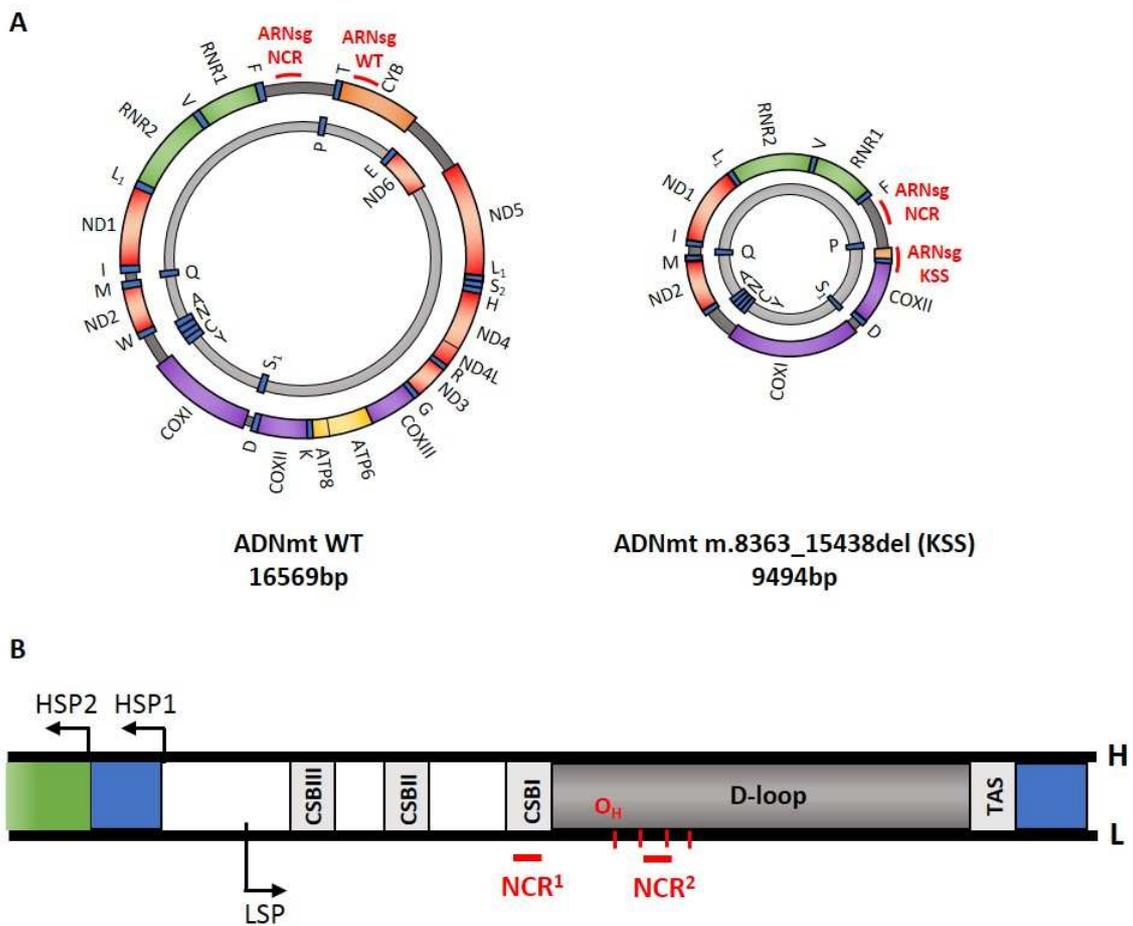


Figure 56. Séquences ciblées par les ARNsg NCR¹ et NCR² sur l'ADNmt de référence.

(A). Cartes de l'ADNmt de référence (à gauche) et de l'ADNmt m.8363_15438del (KSS) (à droite). La position des ARNsg WT, ARNsg KSS et ARNsg NCR sont indiquées en rouge. (B). Carte de la région non-codante majeure NCR et ses principaux éléments régulateurs. Les positions des ARNsg NCR¹ et NCR² sont indiqués par un trait rouge.

L'incubation des ARNsg NCR avec la protéine recombinante Cas9 permet dans les deux cas l'obtention d'une coupure des fragments PCR qui ne peut être observée en l'absence de la nucléase Cas9 (Figure 57A). Pour les deux ARNsg NCR+F, la présence de la tige-boucle en 3' de l'ARNsg semble altérer l'efficacité de clivage des complexes Cas9/ARNsg résultants. En revanche, par comparaison, l'ARNsg NCR¹+F permet l'obtention de davantage de produits de clivage que l'ARNsg NCR²+F, il semble donc plus adapté au développement de cette stratégie anti-génomique.

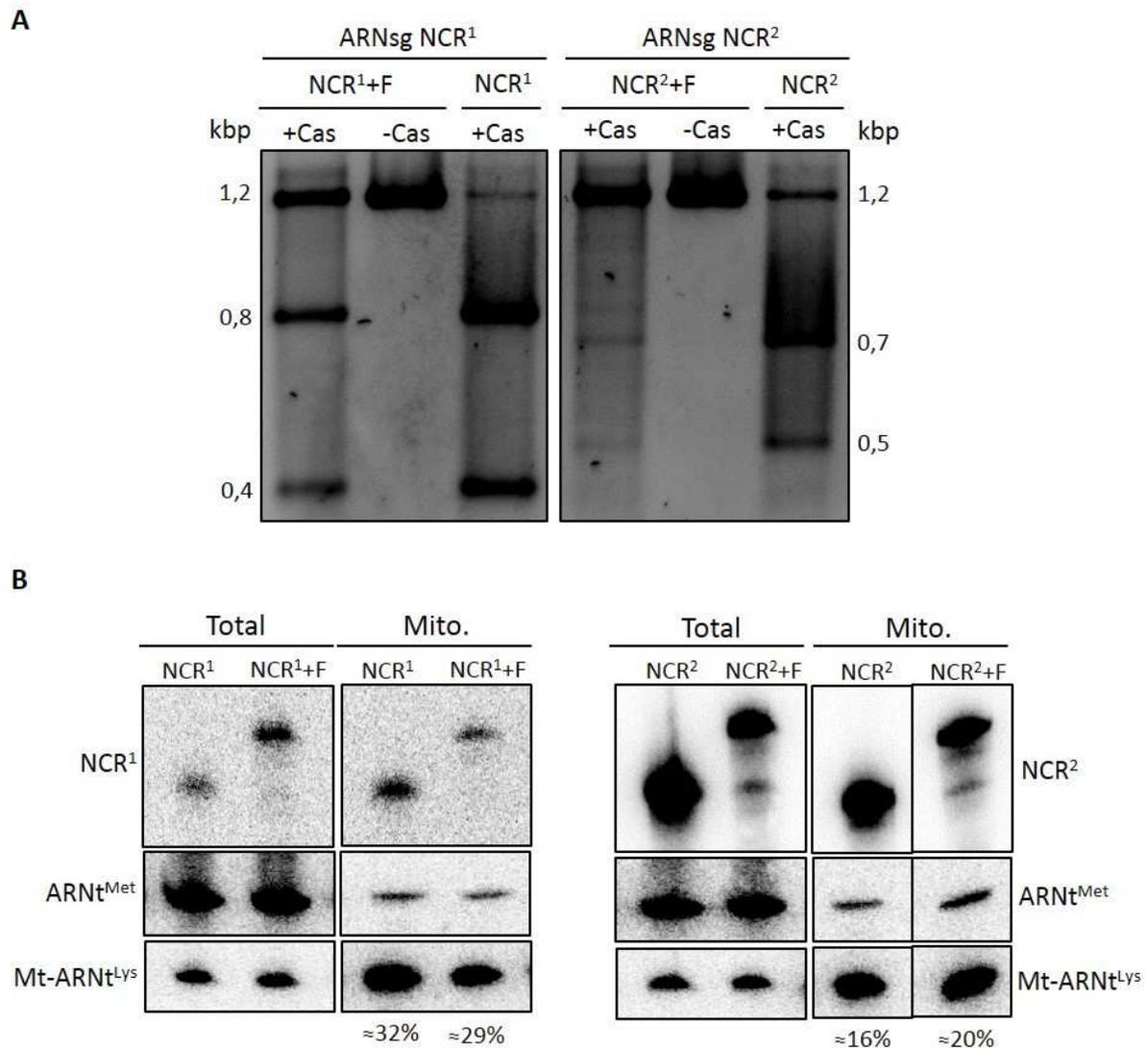


Figure 57. Les ARNsg NCR modifiés sont importés dans les mitochondries et permettent un clivage de l'ADN.

(A). Tests de clivage *in vitro* des ARNsg NCR en présence d'un fragment PCR contenant la séquence de la région non-codante majeure de l'ADNmt. La taille des fragments est indiquée sur le côté. -Cas, contrôle sans protéine recombinante Cas9. (B). Hybridations de type northern des ARN totaux (Total) ou extraits de mitochondries purifiées (Mito.) 48h après transfection. La sonde ARNt^{Met} permet de vérifier l'absence de contamination cytosolique. La sonde Mt-ARNt^{Lys} permet la détection de l'ARNt^{Lys} mitochondrial. La proportion d'ARNsg cellulaire présent dans la fraction mitochondriale est indiquée en %.

J'ai ensuite analysé la capacité de ces quatre ARNsg à être importés dans les mitochondries de cellules humaines en suivant le même protocole que précédemment (Figure 57B). Ces quatre ARNsg synthétisés *in vitro* peuvent ainsi être retrouvés en proportions variables dans la fraction mitochondriale traitée à la RNase A. Les résultats obtenus indiquent que les ARNsg NCR¹ et NCR¹+F peuvent être retrouvés en proportion plus importante dans la

fraction mitochondriale que les ARNsg NCR² et NCR²+F. J'ai donc choisi de poursuivre les expériences avec la série d'ARNsg NCR¹.

2. Activité du système CRISPR/Cas9 mitochondrial sur l'ADNmt et sur le nucléoïde

Au sein de la mitochondrie, l'ADNmt est retrouvé sous forme de nucléoïde. La présence des nombreuses protéines sur l'ADNmt pourrait alors compromettre l'accès des complexes CRISPR/Cas9 aux sites ciblés sur l'ADNmt et ainsi altérer l'efficacité et la spécificité de coupure. Afin d'étudier l'accessibilité du nucléoïde aux complexes CRISPR/Cas9, j'ai développé un test de clivage sur l'ADNmt présent au sein de lysats de mitochondries. En parallèle de l'ADNmt purifié et déprotéinisé est utilisé comme contrôle d'accès à l'ADNmt.

Pour cela, j'ai donc tout d'abord isolé des mitochondries de cellules HEK 293 et je les ai lysées. Ces lysats ont ensuite été incubés pendant 30min à 37°C avec la protéine recombinante Cas9 et les ARNsg WT+F et NCR¹+F. Après extraction et digestion par l'enzyme de restriction BlnI, l'ADNmt a été analysé par hybridation de type Southern grâce à une sonde située entre les deux sites de coupure des ARNsg.

L'hybridation révèle que l'ADNmt déprotéinisé est clivé très efficacement par l'ARNsg WT+F puisque la forme non clivée de l'ADN ne peut plus être observée (**Figure 58, piste 1**). L'ARNsg NCR¹+F ne permet en revanche pas l'obtention d'un clivage total de cet ADN. En effet, le clivage de l'ADNmt déprotéinisé génère deux fragments détectables grâce à la sonde : un fragment d'1,9kpb qui correspond à la coupure par l'ARNsg WT+F uniquement ; et un fragment d'1,3kpb produit par les coupures simultanées de l'ARNsg WT+F et de l'ARNsg NCR¹+F. Il y a donc une proportion non négligeable de l'ADNmt qui n'est pas coupé par l'ARNsg NCR¹+F.

Nous pouvons également observer un fragment de clivage de l'ADNmt sous forme de nucléoïde, qui correspond à la coupure par l'ARNsg WT+F (**Figure 58, pistes 2 et 4**), ce qui confirme que les complexes ARNsg/Cas9 peuvent bien accéder à l'ADNmt lorsque celui-ci est sous cette forme. Aucun clivage ne peut en revanche être observé pour l'ARNsg NCR¹+F quand l'ADNmt est sous cette forme (**Figure 58, pistes 3 et 4**). Ceci pourrait être notamment expliqué par les nombreuses interactions de la NCR avec des protéines jouant un rôle dans l'expression et la réplication de l'ADNmt, mais également par la structure particulière qu'adopte l'ADNmt dans cette région.

Ces résultats confirment néanmoins que le système CRISPR/Cas9 mitochondrial peut bien avoir accès à l'ADNmt pour le couper, même lorsque celui-ci est au sein du nucléoïde, interagissant avec de nombreuses protéines permettant sa compaction, son expression ou encore sa réplication.

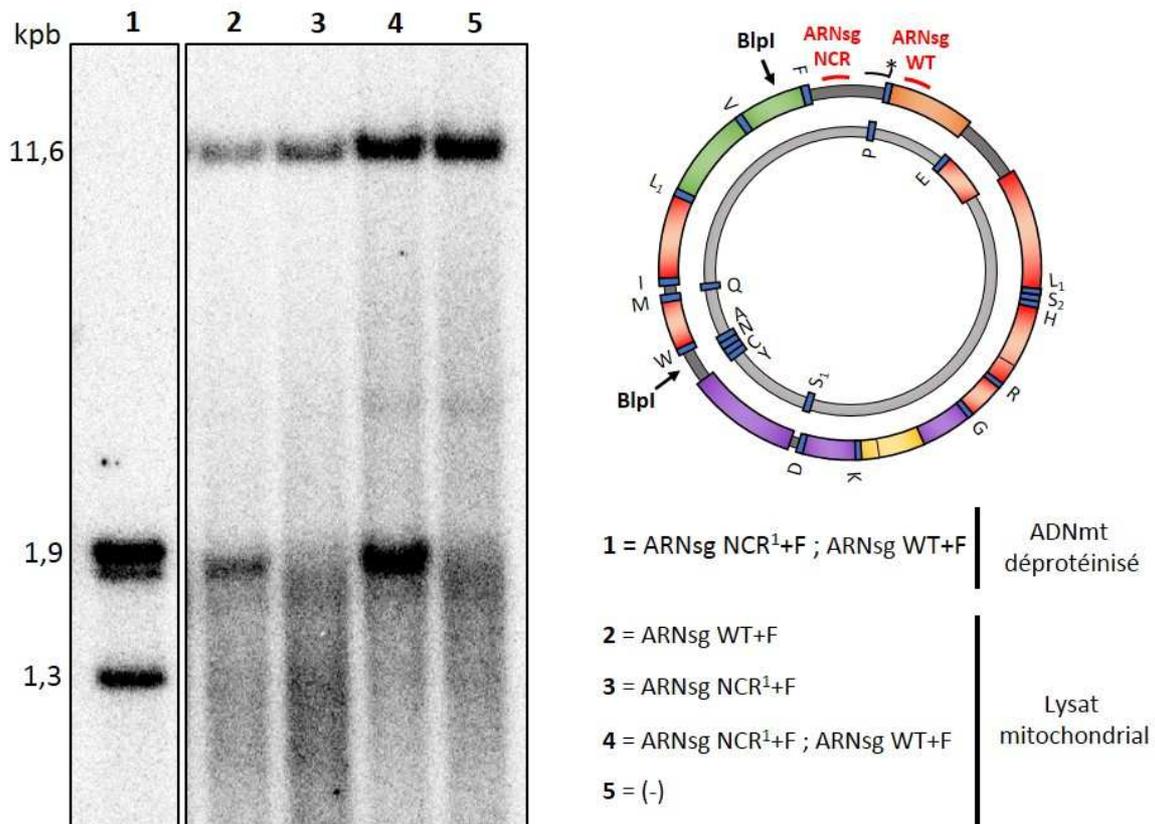


Figure 58. Les complexes ARNs/Cas9 peuvent cliver l'ADNmt au sein du nucléoïde.

Analyse par hybridation de type Southern des tests de clivage *in vitro* réalisés avec les complexes ARNs/Cas9 sur de l'ADNmt déprotéinisé (1) ou au sein de lysats mitochondriaux (2 à 5). La carte de l'ADNmt de référence est présentée en haut à droite. La position des ARNs WT et NCR sont indiqués en rouge, la position des sites BlnI par des flèches noires et la sonde utilisée pour détecter les fragments d'ADNmt est représentée par une étoile noire.

3. Application du système CRISPR/Cas9 mitochondrial avec deux ARNs

J'ai ensuite essayé d'appliquer cette stratégie de transfection avec deux ARNs sur des cellules humaines en culture.

Pour commencer, j'ai appliqué cette stratégie de transfection aux cellules sauvages Hep G2. En ce qui concerne ces cellules, plusieurs combinaisons de co-transfections ont été réalisées afin de comparer l'effet d'un seul ARNsg ou de deux ARNsg sur la quantité d'ADNmt au sein de ces cellules. Cette fois-ci, une quantification absolue de l'ADNmt a été effectuée grâce à des courbes de calibration produites pour chaque gène à partir de quantités connues de plasmides contenant soit un fragment du gène *MT-RNR1*, soit le gène *TST*. A chaque fois, la quantité d'ADNmt est déterminée en calculant le ratio du nombre de gène *MT-RNR1* par rapport au gène *TST*.

Ainsi, nous avons pu observer que l'introduction des deux ARNsg ciblant deux régions distinctes de l'ADNmt permet l'obtention de diminutions significatives de la quantité absolue d'ADNmt. En effet, lorsque les ARNsg WT+F et NCR¹+F ou les ARNsg WT et NCR¹+F sont introduits simultanément dans les cellules, une diminution statistiquement significative de la quantité d'ADNmt d'environ 60% peut être observée par rapport aux cellules non transfectées (**Figure 59**).

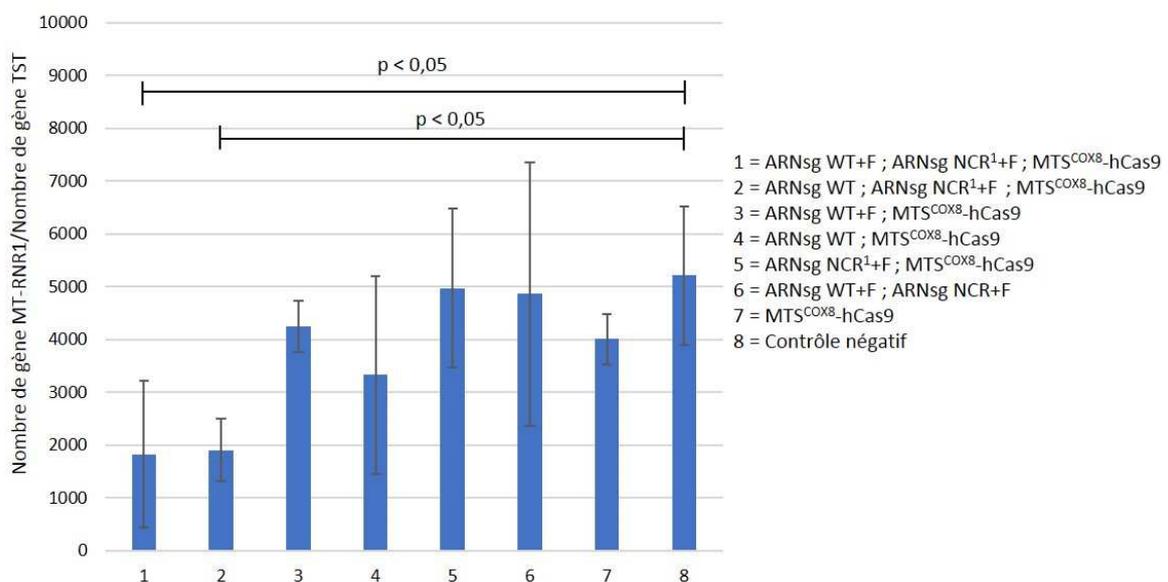


Figure 59. Quantité absolue d'ADNmt au sein de cellules Hep G2 après application du système CRISPR/Cas9 mitochondrial.

Analyse par qPCR en temps réel de la quantité absolue de gènes MT-RNR1 normalisée par la quantité de gènes TST au sein de cellules Hep G2 transfectées dans les conditions décrites à droite. Les valeurs moyennes et les écarts-types sont le résultat de trois expériences indépendantes. Les différences statistiques ont été déterminées grâce à test t de Student non-apparié.

J'ai ensuite appliqué cette stratégie de transfection avec deux ARNsg sur les cellules HEK293-T-Rex-MTS^{COX8A}-hCas9. Dans cette expérience, les cellules ont alors été transfectées avec deux ARNsg simultanément et induites ou non à la tétracycline afin de permettre la production de la protéine MTS^{COX8A}-hCas9. Pour chaque combinaison de deux ARNsg, nous pouvons observer une diminution significative de la quantité d'ADNmt par rapport aux cellules non transfectées et ceci uniquement lorsque l'expression de la protéine est induite grâce à l'ajout de tétracycline (**Figure 60**). De façon surprenante, nous pouvons également observer des diminutions de la quantité absolue d'ADNmt sans ajout de tétracycline. Ce phénomène pourrait notamment s'expliquer par une fuite de l'expression de l'endonucléase MTS^{COX8A}-hCas9 depuis le promoteur inductible à la tétracycline, mais aussi par la présence de traces de tétracycline présentes dans le sérum de veau fœtal et donc dans le milieu de culture.

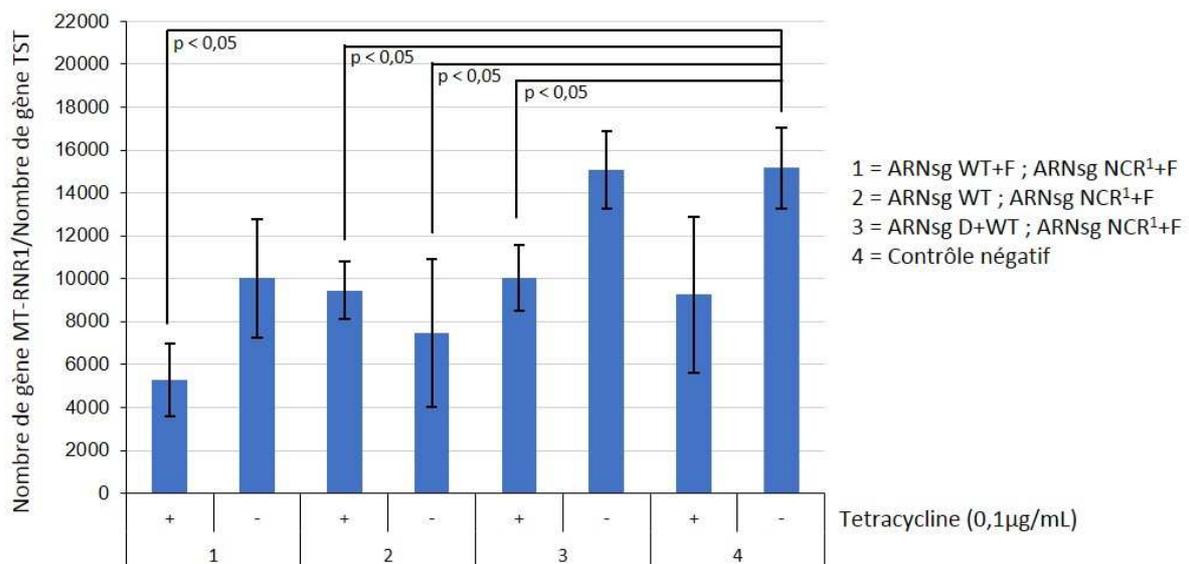


Figure 60. Quantité absolue d'ADNmt au sein de cellules HEK293-T-Rex-MTS^{COX8A}-hCas9 après application du système CRISPR/Cas9 mitochondrial.

Analyse par qPCR en temps réel de la quantité absolue de gènes *MT-RNR1* normalisée par la quantité de gènes *TST* au sein de cellules HEK293-T-Rex-MTS^{COX8A}-hCas9 transfectées dans les conditions décrites à droite et en présence (+) ou en absence (-) de 0,1µg/mL de tétracycline. Les valeurs moyennes et les écarts-types sont le résultat de trois expériences indépendantes. Les différences statistiques ont été déterminées grâce à test t de Student pour des échantillons non-apparié.

En conclusion, la transfection de ces deux types cellulaires avec deux ARNsg ciblant deux régions distinctes du génome mitochondrial en présence de la protéine MTS^{COX8A}-hCas9 a, dans chaque cas, permis l'observation de diminutions significatives de la quantité absolue d'ADNmt. Ces déplétions d'ADNmt pourraient être le résultat de clivages de l'ADNmt par les complexes CRISPR/Cas9 mitochondriaux. De futures expériences devront confirmer cela, notamment en essayant de détecter de façon directe les coupures de l'ADNmt ou les fragments de clivage résultant de ces coupures.

Au cours de cette deuxième partie, j'ai donc démontré que l'endonucléase Cas9 peut être efficacement relocalisée au sein des mitochondries de cellules humaines et qu'elle est retrouvée au sein de la matrice mitochondriale à proximité de l'ADNmt. Après import mitochondrial cette protéine conserve son activité nucléasique pouvant mener à un clivage de l'ADN double brin. Ensuite, j'ai modifié des ARNsg en ajoutant des motifs structuraux qui ont été démontrés comme permettant l'import mitochondrial de petits ARN. L'ajout de ces motifs, combiné à la méthode de transfection utilisée dans nos expériences a permis d'observer qu'une proportion des ARNsg sont localisés dans la fraction mitochondriale. L'ajout de ces déterminants d'import mitochondrial n'empêche en revanche pas leur interaction avec la nucléase Cas9 et les complexes Cas9-ARNsg résultants peuvent mener à un clivage spécifique de l'ADN *in vitro*. De plus, ce système CRISPR/Cas9 mitochondrial peut également mener à un clivage spécifique de l'ADNmt sous sa forme de nucléoïde. Malheureusement, l'application de ce système sur des cellules cybrides n'a pas permis de modifier leur taux d'hétéroplasmie. En revanche, la transfection de cellules avec des ARNsg ciblant deux régions distinctes du génome mitochondrial permet de diminuer la quantité d'ADNmt au sein de celles-ci. Ce résultat pourrait être dû à un clivage de l'ADNmt par le système CRISPR/Cas9 mitochondrial, mais cela devra être confirmé dans de futures expériences.

Conclusions & Perspectives

La plupart des mutations pathogènes de l'ADNmt sont hétéroplasmiques et l'apparition des symptômes de la maladie associée ne sera observée que lorsque la proportion de génomes mutants dépasse un certain seuil qui compromet les fonctions mitochondriales. L'hétéroplasmie offre ainsi une opportunité thérapeutique à saisir puisque diminuer la proportion d'ADNmt affecté par une mutation donnée au-dessous du seuil pathogénique pourrait suffire pour empêcher l'apparition de nombreux syndromes neuromusculaires. Ce projet de thèse a été consacré au développement de deux stratégies qui visent à atteindre cet objectif en utilisant les voies naturelles d'import mitochondrial d'ARN.

Développement d'une stratégie anti-répllicative exploitant la voie d'adressage mitochondriale de l'ARNr 5S

Dans une première partie de mon projet, j'ai poursuivi les travaux du laboratoire dans le développement d'une stratégie anti-répllicative qui utilise l'ARNr 5S comme vecteur d'import mitochondrial. Les résultats obtenus auparavant suggéraient que des ARNr 5S recombinants contenant des inserts ciblant spécifiquement un ADNmt mutant affecté par une large délétion sont importés dans les mitochondries de cellules humaines et permettent l'obtention de diminutions significatives du taux d'hétéroplasmie de cellules cybrides (Comte et al., 2013). Ces résultats n'ont en revanche été observés que sur un nombre très limité de clones cellulaires ayant intégré un gène d'ARNr 5S recombinant, ce qui a été justifié par une insertion aléatoire de ces gènes au sein du génome nucléaire des cellules cybrides et donc une expression très variable de ceux-ci. Cependant, la diminution la plus importante de l'hétéroplasmie a été obtenue malgré une expression très faible des molécules anti-répliquatives au sein des cellules cybrides ($\approx 30 \pm 5$ molécules/cellule). Ces résultats n'ont pu être confirmés car les clones cellulaires les plus intéressants étaient caractérisés par une fragilité importante et ont été perdus après plusieurs semaines de culture. Tous ces éléments nous ont ainsi mené à définir plusieurs objectifs qui devaient permettre d'augmenter les effets des ARNr 5S recombinants sur l'hétéroplasmie ainsi que la reproductibilité des expériences.

Sélection des ARNr 5S recombinants

Mon projet avait pour premier objectif de modéliser et sélectionner de nouveaux ARNr 5S recombinants dont les capacités d'hybridation spécifique au génome mutant seraient plus importantes afin d'augmenter l'effet anti-réplicatif au sein des cellules cybrides. Pour cela, j'ai créé une banque de molécules recombinantes *in silico* et j'ai analysé chaque molécule grâce à des programmes de prédiction de structure secondaire et de température de fusion vis-à-vis des génomes mitochondriaux mutants et sauvages. Ces analyses ont permis la sélection de plusieurs ARNr 5S recombinants qui semblaient les plus appropriés pour l'optimisation de la stratégie anti-répllicative. Cependant, nous avons pu voir par la suite que les résultats d'hybridation *in vitro* ainsi que ceux obtenus *in vivo* sur le niveau d'hétéroplasmie ne sont pas totalement en accord avec les prédictions réalisées *in silico*. En effet, alors que les molécules 5S-KSS-20H, 5S-KSS-21L, 5S-KSS-23H et 5S-KSS-24L ont été sélectionnées car présentant des températures de fusion vis-à-vis de l'ADNmt mutant très élevées, aucune d'entre-elles ne permet l'obtention d'un effet significatif sur le taux d'hétéroplasmie des cellules cybrides. Ce sont en revanche des molécules qui contiennent des inserts anti-réplicatifs plus courts qui ont permis l'observation de diminutions significatives du taux d'hétéroplasmie. Deux phénomènes peuvent être à l'origine de cette observation. Tout d'abord, un insert anti-réplicatif plus long pourrait engendrer une plus grande déstabilisation de la structure de l'ARNr 5S recombinant *in vivo* altérant sa capacité à être importé dans les mitochondries. Une seconde explication pourrait provenir de données qui ont récemment été publiées suggérant que la mitochondrie est maintenue à une température physiologique de 50°C (Chretien *et al.*, 2017). En effet, les deux molécules 5S-KSS-15H et 5S-KSS-13H, qui permettent l'obtention de diminutions de l'hétéroplasmie, présentent des températures de fusion vis-à-vis du génome mitochondrial mutant supérieures à cette température de 50°C, alors qu'elles sont très inférieures à cette température vis-à-vis du génome mitochondrial sauvage. L'ensemble des autres molécules présentent quant à elles, soit une température de fusion vis-à-vis de l'ADNmt mutant inférieure à 50°C, soit une température de fusion vis-à-vis de l'ADNmt sauvage relativement proche de cette température (**Tableau 3**). Ce type de résultats a déjà été observé dans le développement de la stratégie anti-répllicative utilisant les petits ARN artificiels et ciblant la mutation ponctuelle m.13514A>G (Tonin *et al.*, 2014). En effet, dans cette étude, la molécule « FD20H » qui entraîne une diminution importante du taux d'hétéroplasmie présente une température de fusion prédite vis-à-vis du génome mutant

supérieure à 50°C alors qu'elle est inférieure à cette température vis-à-vis du génome sauvage. Bien évidemment, ces données concernant la température de la mitochondrie devront être confirmées, mais les résultats que nous obtenons suggèrent qu'elles pourraient être prises en compte pour sélectionner des molécules anti-répliquatives qui ciblent l'ADNmt.

Augmentation du nombre de molécules d'ARNr 5S recombinants

Le second objectif de ce projet consistait à augmenter le nombre de molécules d'ARNr 5S recombinants au sein des cellules cybrides afin d'obtenir un effet plus important sur l'hétéroplasmie de ces cellules. Pour cela, j'ai utilisé le système Flp-In™ T-Rex™ (*Invitrogen*) qui permet de générer des lignées cellulaires stables dont le gène d'intérêt est localisé dans une région transcriptionnellement active. Ce système est cependant plus particulièrement adapté à l'intégration de gènes transcrits par l'ARN polymérase II et la sélection des clones cellulaires permettant l'expression la plus efficace est d'ailleurs réalisée par comparaison d'une activité β -galactosidase qui est elle-même issue d'une transcription par cette ARN polymérase. On peut alors se demander si l'activité spécifique en β -galactosidase est représentative de l'expression attendue depuis le promoteur interne de l'ARNr 5S grâce à l'ARN polymérase III. En effet, bien que la structure de la chromatine joue un rôle très important dans l'activité transcriptionnelle d'une région génomique, d'autres éléments entrent également en compte. Or, les gènes d'ARNr 5S retrouvés au sein du génome nucléaire sont souvent organisés en clusters de répétitions en tandem de plusieurs dizaines de copies (Sorensen and Frederiksen, 1991). Cette organisation particulière pourrait jouer un rôle non négligeable dans l'expression des ARNr 5S, qui bien entendu ne pourrait être reproduit par l'intégration unique du gène d'ARNr 5S recombinant en dehors de ces clusters.

Néanmoins, grâce à ce système, l'objectif d'augmentation du nombre de molécules anti-répliquatives au sein des cellules a été atteint puisque ce nombre a été multiplié au minimum par un facteur 10 en comparaison avec l'étude précédente (Comte *et al.*, 2013). En revanche, contrairement à ce qui a été observé auparavant, nous n'avons pas pu obtenir de diminution de l'hétéroplasmie dans le milieu riche en glucose en présence d'une quantité dix fois supérieure de molécule 5S-KSS-13H. Dans mes expériences, l'effet sur l'hétéroplasmie pour cette molécule n'a pu être obtenu que dans une lignée cellulaire contenant environ 2000 molécules anti-répliquatives par cellule, soit près de 100 fois plus de molécules. De plus, la

molécule 5S-KSS-15H, qui diffère uniquement de 5S-KSS-13H par deux nucléotides, permet également l'obtention d'une diminution plus faible mais significative de l'hétéroplasmie. Nous avons pu déterminer que les cellules l'exprimant contiennent plus de 1000 molécules de 5S-KSS-15H par cellule. Ces résultats pourraient alors suggérer l'existence d'un niveau seuil d'expression des ARNr 5S recombinants qui permettrait l'obtention de diminution de l'hétéroplasmie. Il faut néanmoins rester prudent car l'estimation du nombre d'ARNr 5S recombinants au sein des cellules cybrides a été réalisée par RT-PCR semi-quantitative, une méthode qui manque de précision. Quelques analyses par RT-PCR quantitative ont été réalisées et ont confirmé l'ordre de grandeur déterminé précédemment par RT-PCR semi-quantitative (données non présentées). L'utilisation de cette méthode plus précise pourra permettre de confirmer les résultats que nous avons obtenus dans cette étude.

La nécessité d'un niveau élevé d'expression de ces molécules peut notamment être justifié par la faible proportion d'ARNr 5S qui est importé dans les mitochondries. En effet, il a été montré que 1 à 5% des ARNr 5S cellulaires sont redirigés vers les mitochondries humaines (Entelis *et al.*, 2001). Ici, bien que nous ayons modifié le domaine qui permet l'interaction de l'ARNr 5S avec la protéine L5 du ribosome cytosolique, nous ne pouvons pas espérer un niveau très élevé de molécules recombinantes au sein des mitochondries de cellules cybrides. En effet, comme nous l'avons dit plus tôt, nous avons intégré un seul gène d'ARNr 5S recombinant dans les cellules cybrides. Or, celles-ci contiennent un grand nombre de gènes d'ARNr 5S sauvage (300 à 400 par génome haploïde) (Sorensen and Frederiksen, 1991). La molécule recombinante est donc soumise à une compétition très intense pour interagir avec les facteurs protéiques permettant son expression, son export nucléaire, puis son import mitochondrial. L'efficacité d'import des ARNr 5S recombinants resterait donc un facteur limitant pour le développement de cette stratégie anti-répllicative. Cependant, la voie d'import mitochondrial de l'ARNr 5S a été décrite de façon détaillée au sein de notre laboratoire, et notamment les partenaires protéiques dirigeant cette molécule vers la mitochondrie, le précurseur préMRP-L18 et la rhodanèse. Dans de futures expériences, afin d'augmenter le nombre de molécules recombinantes au sein des mitochondries de cellules cybrides, nous pourrions ainsi essayer de sur-exprimer ces partenaires protéiques pour voir s'ils permettent une augmentation de l'import mitochondrial des ARNr 5S recombinants ainsi qu'un effet plus prononcé sur l'hétéroplasmie.

Impact de la fonction mitochondriale de l'ARNr 5S

La fonction mitochondriale de l'ARNr 5S n'a toujours pas été élucidée. Alors que des études suggèrent son importance dans le processus de traduction mitochondriale (Smirnov *et al.*, 2011), les structures des mitoribosomes humains et porcins obtenues par cryo-microscopie électronique ont confirmé son absence au sein de l'appareil de synthèse protéique de la mitochondrie (Amunts *et al.*, 2015 ; Greber *et al.*, 2015). Des expériences récentes réalisées au laboratoire proposent que l'ARNr 5S puisse interagir avec des facteurs impliqués dans la biogénèse de la grande sous-unité du mitoribosome et celui-ci pourrait donc avoir un rôle à jouer dans sa maturation avant de s'en dissocier lorsque cette sous-unité est associée à la petite sous-unité du mitoribosome (Ivan Chicherin, données non publiées). Les interactions des ARNr 5S recombinants avec ces partenaires protéiques situés dans la mitochondrie pourraient empêcher leur interaction avec l'ADNmt mutant. Les futures expériences visant à étudier ces interactions et à élucider la fonction mitochondriale de l'ARNr 5S pourront peut-être apporter de nouvelles données intéressantes pour modéliser des ARNr 5S recombinants qui échapperaient à ces interactions au sein de la mitochondrie et seraient alors plus disponibles pour s'hybrider à l'ADNmt mutant.

Impact des conditions sélectives de culture sur la détection des diminutions d'hétéroplasmie

Dans mes expériences, je n'ai pas pu obtenir de diminutions du taux d'hétéroplasmie dans un milieu riche en glucose. Nous avons alors choisi de placer les cellules dans un milieu sélectif dépourvu de glucose. Précédemment, seules quelques études ont décrit la possibilité d'induire un shift de l'hétéroplasmie en utilisant des conditions sélectives de culture. Ainsi, l'utilisation d'un milieu dépourvu de glucose, mais riche en corps céto-gènes a permis de diminuer la proportion d'ADNmt mutants affectés par une large délétion au sein de cellules cybrides (Santra *et al.*, 2004). Une autre étude a démontré que la culture de cellules apparemment homoplasmiques pour une mutation ponctuelle associée un syndrome de type MELAS dans un milieu pauvre en glucose, permettait l'obtention d'un shift d'hétéroplasmie pour atteindre 90% d'ADNmt mutant (Desquret-Dumas *et al.*, 2012). Plus récemment en revanche, l'application d'un milieu pauvre en glucose mais riche en corps céto-gènes sur des cellules atteintes par la même mutation n'a pas entraînée de variation du taux d'hétéroplasmie, mais a permis de restaurer l'assemblage et de stabiliser le complexe I de la

chaîne respiratoire, ce qui pourrait notamment être expliqué par une augmentation de la quantité d'ADNmt (Frey *et al.*, 2017). Au cours de ce projet, nous avons émis l'hypothèse que la culture des cellules exprimant des ARNr 5S recombinants dans un milieu dépourvu de glucose, constituerait une condition favorable pour les cellules dont la proportion d'ADNmt mutant a été diminuée. Ces conditions sélectives engendreraient une sélection des cellules avec un niveau d'hétéroplasmie plus bas permettant la détection de l'effet anti-répliatif des ARNr 5S recombinants au sein d'une population de cellules.

Nous avons effectivement pu détecter des changements dans le taux d'hétéroplasmie au sein de deux lignées cellulaires exprimant des ARNr 5S recombinants cultivées dans le milieu dépourvu de glucose. L'utilisation de conditions sélectives de culture, favorables aux cellules dont les fonctions mitochondriales sont les mieux préservées, semble donc être une manière efficace de sélectionner des cellules dont le taux d'hétéroplasmie a été diminué. En revanche, les résultats obtenus devront être confirmés. En effet, nous n'avons pas réussi à reproduire les résultats très encourageants obtenus avec la molécule 5S-KSS-13H qui a permis une diminution très importante de l'hétéroplasmie. Ceci pourrait être expliqué par les différences observées dans l'expression de cette molécule au sein des lignées cybrides, mais de futures expériences seront nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

En conclusion, au cours de cette première partie, nous avons confirmé que l'ARNr 5S peut être utilisé comme vecteur d'import mitochondrial de petites séquences anti-répliatives menant à des diminutions de l'hétéroplasmie. En revanche, malgré la sélection des molécules les plus intéressantes pour le développement de cette stratégie et une augmentation importante de leur expression au sein des cellules cybrides, les ARNr 5S recombinants n'ont pas permis de diminuer l'hétéroplasmie dans les conditions de culture riches en glucose. Grâce à l'application de conditions sélectives de culture, j'ai pu obtenir des diminutions significatives de l'hétéroplasmie qui semblent dépendantes du niveau d'expression des molécules anti-répliatives. L'utilisation de ces conditions sélectives de culture en absence de glucose pourrait être pris en considération pour optimiser l'application de stratégies de thérapies géniques pour des mutations hétéroplasmiques de l'ADNmt.

Développement d'une stratégie anti-génomique basée sur l'utilisation du système CRISPR/Cas9

Dans une seconde partie, j'ai essayé d'appliquer une stratégie anti-génomique basée sur le développement d'un système CRISPR/Cas9 mitochondrial. Les nombreuses applications du système CRISPR/Cas9 sur le génome nucléaire ont prouvé sa grande efficacité pour induire des coupures spécifiques de l'ADN et ainsi permettre l'édition du génome. Ce système n'a en revanche jamais été appliqué à l'ADN mitochondrial en particulier à cause des difficultés éprouvées pour faire pénétrer les ARNsg au sein des mitochondries. Dans ce projet, j'ai tiré parti des connaissances accumulées par notre équipe au sujet de l'import mitochondrial d'ARN au sein des cellules humaines.

Import mitochondrial de l'endonucléase hCas9

J'ai tout d'abord démontré que l'endonucléase Cas9 peut être efficacement importée dans les mitochondries de cellules humaines grâce à l'ajout d'une préséquence d'adressage mitochondrial. Les différentes expériences réalisées suggèrent que cette protéine peut pénétrer dans la matrice mitochondriale et être retrouvée à proximité de l'ADNmt. Néanmoins, nous avons pu également observer qu'une expression trop importante de cette protéine entraîne une localisation aberrante de celle-ci puisque certaines cellules présentent une localisation cytosolique diffuse de MTS^{COX8A}-hCas9 avec de larges agrégats de protéines. Ce phénomène pourrait être un des facteurs expliquant les difficultés rencontrées dans le développement de notre stratégie. En effet, même lorsque j'ai produit une lignée cellulaire stable permettant l'expression inductible de cette endonucléase, j'ai déterminé qu'une concentration trop importante de tétracycline permettant l'induction provoquait une localisation aberrante de la protéine dans un grand nombre de cellules. Or, l'utilisation de concentrations plus faibles de tétracycline n'a permis l'expression simultanée de la protéine que dans environ 40% des cellules. Il y a donc un équilibre à trouver pour obtenir une localisation correcte de Cas9 dans un nombre plus important de cellules.

Plusieurs modifications de l'endonucléase MTS^{COX8A}-hCas9 pourraient être envisagées pour obtenir une localisation subcellulaire optimale de cette protéine. Tout d'abord, pour s'assurer qu'une partie de cette protéine ne soit pas relocalisée dans le noyau, un signal d'export nucléaire pourrait y être ajouté à l'image de ce qui est réalisé pour les mito-ZFN

(Minczuk et al., 2006). Une autre option qui peut être plus appropriée consisterait à ajouter la séquence 3'UTR (Untranslated region) de l'ARNm permettant l'expression de la protéine COX8A. Il a en effet été démontré que des signaux situés dans cette partie de l'ARNm permettent à celui-ci d'être traduit au niveau de ribosomes qui sont situés à la surface de la mitochondrie (Kaltimbacher *et al.*, 2006). La translocation de la protéine à travers la membrane mitochondriale externe est alors un processus co-translationnel qui assure sa localisation mitochondriale. Ces séquences 3'UTR ont notamment été utilisées dans le développement des mitoTALEN pour participer à leur adressage mitochondrial (Bacman et al., 2013). Enfin, puisque le niveau d'expression de la protéine MTS^{COX8A}-hCas9 semble très important pour déterminer sa localisation subcellulaire, une stratégie visant à limiter son expression pourrait être utilisée. C'est notamment ce qui a été réalisé pour obtenir un clivage spécifique de l'ADNmt avec les mitoZFN, grâce à l'utilisation d'un ribozyme couplé à un aptamère ARN sensible à la tétracycline (Gammage et al., 2016).

Import mitochondrial des ARNsg

J'ai ensuite modifié les ARNsg pour qu'ils puissent être redirigés vers les mitochondries de cellules humaines. Pour cela, j'ai ajouté les déterminants d'import mitochondrial identifiés au laboratoire et issus de l'ARNt^{Lys} tRK1 de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Ces motifs structuraux présentaient l'avantage d'avoir une petite taille et permettaient donc de limiter la taille des ARNsg en vue de leur import mitochondrial. Nous avons ainsi pu observer que l'ajout de ces déterminants permet de retrouver une partie des ARNsg dans la fraction mitochondriale. Cependant, nous avons également pu observer que les ARNsg auxquels nous n'avons pas ajouté de déterminant d'import mitochondrial peuvent être retrouvés en proportion similaire au sein des mitochondries de cellules humaines. Ceci nous mène à émettre l'hypothèse selon laquelle la procédure de transfection que nous utilisons joue un rôle important dans la localisation subcellulaire des ARNsg. En effet, nous introduisons dans les cellules les ARNsg synthétisés *in vitro* grâce à un agent de transfection. Nous pouvons alors imaginer que ceux-ci sont libérés en grande partie dans le cytosol des cellules. Cette localisation cytosolique pourrait permettre leur interaction avec des partenaires protéiques entraînant leur import mitochondrial. Les ARNsg auxquels nous n'avons pas ajouté de déterminant d'import mitochondrial, contiennent en revanche des motifs structuraux en tige-

boucle qui sont similaires aux motifs que nous ajoutons pour provoquer l'import mitochondrial de petits ARN. Nous pouvons ainsi imaginer que ces structures en tige-boucle pourraient permettre leur adressage mitochondrial en imitant les motifs d'import que nous avons ajouté aux ARNsg.

L'efficacité d'import mitochondrial de ces petits ARNsg pourrait néanmoins être un des facteurs limitants qui expliqueraient l'absence d'effet sur l'ADNmt. Les partenaires protéiques permettant l'import de ces petits ARN contenant des motifs issus de tRK1 ont été identifiés au sein de notre laboratoire, ce sont l'énolase et le précurseur de la lysyl-ARNt synthétase mitochondriale pre-Msk1. De façon similaire à ce qui peut être réalisé pour les ARNr 5S recombinants, il pourrait être intéressant de sur-exprimer ces partenaires protéiques afin de voir si cela permet d'augmenter l'import mitochondrial des ARNsg et de ce fait obtenir un effet plus important sur l'ADNmt.

Introduction de deux ARNsg ciblant deux régions distinctes de l'ADNmt

Puisqu'aucun effet significatif n'a pu être observé en introduisant un ARNsg dans les cellules, nous avons choisi d'étudier l'effet que pourrait engendrer l'introduction simultanée de deux ARNsg ciblant l'ADNmt au sein des cellules. Nous avons en effet émis l'hypothèse que l'introduction de plusieurs coupures de l'ADNmt pourrait permettre la détection de déplétions d'ADNmt. En effet, deux coupures simultanées de l'ADN sont plus compliquées à réparer par les systèmes de réparation de l'ADN, et ceci pourrait donc entraîner un effet plus prononcé sur l'ADNmt.

En utilisant ces conditions, nous avons effectivement pu détecter des déplétions de l'ADNmt lorsque la protéine MTS^{COX8A}-hCas9 est exprimée. Ces résultats prometteurs pourraient ainsi constituer la première indication d'une coupure de l'ADNmt par le système CRISPR/Cas9 *in vivo*. Ces résultats devront cependant être confirmés par des expériences qui visent à observer de façon plus directe les coupures de l'ADNmt. En effet, des analyses par Southern blot pourraient être effectuées afin de détecter d'éventuels fragments de clivage. Néanmoins, comme cela a été montré précédemment, l'ADNmt clivé est en général très vite dégradé, ce qui complique la détection de ces fragments issus de la coupure du génome mitochondrial (Srivastava et Moraes, 2001 ; Morreton *et al.*, 2017). L'utilisation de la technique de Ligation-Mediated PCR (LM-PCR) qui permet la détection de cassures

bicaténaire de l'ADN semble donc ici particulièrement appropriée (Hyvärinen *et al.*, 2007) et c'est vers ce type de méthodes que nous nous dirigerons par la suite.

Développement de nouvelles stratégies de transfection des cellules

Les expériences que nous avons réalisées dans cette deuxième partie ont donc permis de démontrer que les deux composants du système CRISPR/Cas9 peuvent être adressés vers les mitochondries de cellules humaines et qu'ils peuvent couper l'ADNmt. La quantité de complexes ARNsg/Cas9 au sein des cellules et des mitochondries semble en revanche être un facteur limitant très important dans le développement de cette stratégie. Une nouvelle stratégie de transfection est actuellement en développement au laboratoire pour tenter de corriger ce problème. Ainsi, il a été montré que la transfection de cellules avec des complexes ribonucléoprotéiques Cas9/ARNsg permet une édition du génome rapide et très efficace (Liang *et al.*, 2015). L'avantage de cette procédure de transfection repose notamment sur le fait d'introduire à la fois l'ARNsg et la protéine Cas9 au sein d'une même cellule. J'ai ainsi initié le développement de cette stratégie de transfection au cours des derniers mois. J'ai réussi à purifier la protéine MTS^{COX8A}-hCas9 après expression au sein de bactéries et les premières expériences réalisées confirment que cette protéine peut être introduite dans les cellules. En combinant les ARNsg et la nucléase MTS^{COX8A}-hCas9 avant transfection, nous pouvons alors imaginer que ces complexes, une fois à l'intérieur des cellules, vont être dirigés vers les mitochondries et pourront pénétrer au sein de la matrice mitochondriale. Par l'utilisation de cette stratégie, nous espérons ainsi augmenter le nombre de complexes Cas9/ARNsg dans les mitochondries pour obtenir un nombre plus important de coupures simultanées et spécifiques de l'ADNmt.

Au cours de ce projet de thèse, nous avons donc développé deux stratégies visant à diminuer la proportion d'ADNmt mutant au sein de cellules cybrides en utilisant les voies naturelles d'import mitochondrial d'ARN. Nous avons ainsi pu voir que ces voies peuvent être exploitées pour adresser des petits ARN dans les mitochondries de cellules humaines. Cependant, bien que des résultats prometteurs aient pu être obtenus dans l'application de ces deux stratégies, des expériences supplémentaires seront requises pour confirmer certains résultats et pour optimiser les effets entraperçus. L'utilisation des voies naturelles d'adressage mitochondrial d'ARN dans le développement de stratégies thérapeutiques semble en effet confrontée au problème d'efficacité d'import mitochondrial. La quantité d'ARN introduit dans les cellules et importé dans les mitochondries semble ainsi souvent trop faible pour obtenir un effet important sur l'hétéroplasmie. De futures études visant à augmenter la proportion d'ARN adressés dans les mitochondries grâce à la surexpression de protéines permettant leur import mitochondrial ou grâce au développement de nouvelles stratégies de transfection pourront certainement permettre la confirmation des premiers résultats que nous avons obtenus et l'utilisation d'un système CRISPR/Cas9 mitochondrial fonctionnel et efficace.

Matériels & Méthodes

I. Matériels

1. Lignées cellulaires

Cellules cybrides TSFR Mt :

Lignée cellulaire cybride issue de la fusion de cytoplastes de fibroblastes d'un patient porteur d'un ADNmt affecté par une délétion de 7075pb et de cellules immortalisées d'ostéosarcome 143B dépourvues d'ADNmt (rho0). Cette délétion entraîne la disparition de 9 gènes structuraux (*MT-ATP8*, *MT-ATP6*, *MT-CO3*, *MT-ND3*, *MT-ND4L*, *MT-ND4*, *MT-ND5*, *MT-ND6* et une partie de *MT-CYB*) ainsi que 6 gènes d'ARNt (*MT-TG*, *MT-TR*, *MT-TH*, *MT-TS2*, *MT-TL2* et *MT-TE*) et est associée à un syndrome de type Kearns Sayre Shy (KSS). Ces cellules contiennent environ 65% d'ADNmt mutant et sont caractérisées par une diminution de leur consommation d'oxygène de $10\pm 2\%$ par rapport à la lignée initiale immortalisée 143B (Comte *et al.*, 2013). Cellules fournies par le Dr. Anne Lombes (Institut Cochin, Paris, France).

Cellules cybrides ND5 :

Lignée cellulaire cybride issue de la fusion de cytoplastes de fibroblastes d'un patient porteur d'un ADNmt affecté par une mutation ponctuelle A13514G située dans le gène de la sous-unité du complexe I *MT-ND5* et de cellules immortalisées d'ostéosarcome 143B rho0 (Corona *et al.*, 2001). La lignée utilisée dans cette étude contient environ 50% d'ADNmt mutant et possède une résistance à la kanamycine à raison de $100\mu\text{g/mL}$ de milieu de culture. Cellules fournies par le Dr. Massimo Zeviani (Medical Research Council-Mitochondrial Biology Unit, Cambridge, Angleterre).

Cellules Hep G2 :

Lignée cellulaire immortalisée issue d'un carcinome hépatocytaire humain. Ces cellules sont utilisées comme lignée sauvage car elles sont dépourvues des mutations de l'ADNmt ciblées dans cette étude.

Cellules Flp-InTM 293 T-Rex :

Lignée cellulaire commerciale dérivée des cellules HEK (Human Embryonic Kidney) 293 produite pour son utilisation dans le système Flp-InTM T-rexTM (Invitrogen). Le plasmide pFRT/lacZeo y est intégré de façon stable dans une région génomique transcriptionnellement active. Ces cellules contiennent ainsi un site unique de recombinaison FRT et expriment le

gène de fusion *lacZ-Zeocin*TM. Elles contiennent également le plasmide pcDNA6TM/TR qui permet l'expression du répresseur Tet. Cette lignée cellulaire est résistante à la ZéocineTM (100µg/mL) et à la blasticidine (15µg/mL).

2. Milieux de culture

Milieu DMEM avec 4,5g/L de glucose :

Les cellules cybrides TSFR Mt et ND5 ont été cultivées dans un milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Sigma) contenant 4,5g/L de glucose additionné de 10% de sérum fœtal de veau (Gibco) décomplémenté 40min à 56°C, de bicarbonate de sodium (à 3,7g/L) (Sigma), d'un mélange Pénicilline/Streptomycine (à 100mg/mL) (Gibco), d'uridine (à 50mg/L) (Gibco) et de Fungizone (à 2,5mg/L) (Gibco). Le milieu préparé stérilement est filtré puis conservé à 4°C.

Milieu MEM avec 1g/L de glucose :

Les cellules Hep G2 ont été cultivées dans un milieu MEM (Minimum Essential Medium) (Sigma) contenant 1g/L de glucose additionné de 10% de sérum fœtal de veau (Gibco) décomplémenté 40min à 56°C, de bicarbonate de sodium (à 2,2g/L) (Sigma), d'un mélange Pénicilline/Streptomycine (à 100mg/L) (Gibco), d'uridine (à 50mg/L) (Gibco) et de Fungizone (à 2,5mg/L) (Gibco). Le milieu préparé stérilement est filtré puis conservé à 4°C.

Milieu EMEM avec 1g/L de glucose :

Les cellules Flp-InTM 293 T-Rex ont été cultivées dans un milieu EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium) (Sigma) contenant 1g/L de glucose additionné de 10% de sérum fœtal de veau (Gibco) décomplémenté 40min à 56°C, de bicarbonate de sodium (à 1,5g/L) (Sigma), d'un mélange Pénicilline/Streptomycine (à 100mg/L) (Gibco), de sodium pyruvate (à 0,11g/L) (Sigma) et de Fungizone (à 2,5mg/L) (Gibco). Le milieu préparé stérilement est filtré puis conservé à 4°C.

Milieu DMEM sans glucose :

Les cellules cybrides TSFR Mt et ND5 ont été cultivées dans un milieu DMEM (Dulbecco's Modified Essential Medium) (Sigma) sans glucose, additionné de 10% de sérum fœtal de veau (Gibco) décomplémenté 40min à 56°C, de bicarbonate de sodium (à 3,7g/L) (Sigma), de L-glutamine (à 0,584g/L) (Sigma), de sodium pyruvate (à 0,11g/L) (Sigma), d'un mélange de

Pénicilline/Streptomycine (à 100mg/L) (Gibco) et de Fungizone (à 2,5mg/L) (Gibco). Le milieu préparé est filtré puis conservé à 4°C.

3. Souches bactériennes

Cellules E.cloni(r)10G (Lucigen): *F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) endA1 recA1 Φ80dlacZΔM15 ΔlacX74 araD139 Δ(ara,leu)7697 galU galK rpsL nupG λ- tonA*

Cellules E.coli XL1-Blue (Stratagen) : *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIq ZΔM15 Tn10 (Tetr)]*

Cellules Rosetta™ (DE3) : *F' ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm (DE3) pRARE (Cam^R)*

4. Anticorps

Anticorps primaires :

Anticorps monoclonal CRISPR/Cas9 (Diagenode) :

Source = souris. Dilution 1/5000^e (WB). Dilution 1/200^e (Microscopie).

Anticorps polyclonal enolase (C-19) (Santa cruz biotechnology) :

Source = chèvre. Dilution 1/2000^e (WB).

Anticorps polyclonal PNPase (Abcam) :

Source = lapin. Dilution 1/10000^e (WB)

Anticorps TOM20 :

Source = lapin. Dilution 1/200^e (Microscopie)

Anticorps secondaires :

Anticorps anti-souris (NXA931) (GE Healthcare) :

Source = mouton. Dilution 1/10000^e (WB)

Anticorps anti-lapin (NA934V) (GE Healthcare) :

Source = singe. Dilution 1/10000^e (WB)

Anticorps anti-souris (A-11001) (Molecular probes) :

Source = chèvre. Conjugué à Alexa-Fluor 488. Dilution 1/1000^e (PALM)

Anticorps anti-souris (A-21237) (Molecular probes) :

Source = chèvre. Conjugué à Alexa Fluor 647. Dilution 1/1000^e (PALM)

Anticorps anti-lapin (A-11008) (Molecular probes) :

Source = chèvre. Conjugué à Alexa Fluor 488. Dilution 1/1000^e (PALM)

Anticorps anti-lapin (A-21246) (Molecular probes) :

Source = chèvre. Conjugué à Alexa Fluor 647. Dilution 1/1000^e (PALM)

II. Méthodes

1. Méthodes relatives à la culture de cellules humaines

1.1. Décongélation des cellules

Les cellules sont conservées à -150°C dans $300\mu\text{L}$ de **tampon SVF+DMSO**. Pour décongeler les cellules, le tube de cryoconservation les contenant est placé à 37°C pendant 2min. Puis, 1mL de milieu de culture préchauffé à 37°C est additionné aux cellules avant de les centrifuger à $600\times g$; 10min ; t°a. Le culot est resuspendu dans du milieu de culture et les cellules sont mises en culture.

Tampon SVF+DMSO : Sérum de Veau Foetal non décomplémenté + 10% DMSO

1.2. Culture et passage des cellules

Toutes les cellules de cette étude sont cultivées dans un incubateur à 37°C et sous 5% de CO_2 , dans le milieu de culture approprié. Lorsque les cellules occupent la totalité de la surface de leur support, elles sont transférées dans un autre support ou divisées, on parle alors de « passage ». Pour cela, le milieu de culture est tout d'abord retiré par aspiration. Après avoir rincé les cellules avec du **tampon PBS 1X** (*Sigma*), un volume approprié de solution Trypsine-EDTA 0,05% (*Gibco*) (à raison de $0,2\text{mL}/10\text{cm}^2$), préchauffée à 37°C , est appliqué sur celles-ci. Les cellules sont alors incubées 2 à 3min à température ambiante. La trypsine est ensuite inactivée en ajoutant au moins 5 volumes de milieu de culture complet, les cellules sont détachées et récupérées. Après centrifugation à $600\times g$; 10min ; t°a, le culot de cellules est remis en suspension dans du milieu de culture et celles-ci sont réparties dans leurs nouveaux contenants.

Tampon PBS 1X : KH_2PO_4 1,5mM ; NaCl 150mM ; NaH_2PO_4 3mM pH7.4

1.3. Congélation des cellules

Pour conserver les cellules, celles-ci sont congelées à -150°C . Pour cela, les cellules sont tout d'abord détachées comme décrit dans la partie **II-1.2**. Après centrifugation à $600\times g$; 10min ; t°a, le culot de cellules est resuspendu dans $300\mu\text{L}$ de **tampon SVF+DMSO** et placé

dans un tube de cryopréservation. Les tubes sont alors mis dans un container de congélation (*CoolCell*, *BioCision*) qui limite la diminution de température à 1°C/min. Celui-ci est placé pendant 6 à 24h à -80°C et les tubes sont ensuite transférés à -150°C.

1.4. Transfection des cellules

Toutes les transfections de cette étude ont été réalisées en utilisant l'agent de transfection Lipofectamine™ 2000 (*Invitrogen*). Pour être transfectées, les cellules sont préparées pour atteindre 50-70% de confluence au moment de la transfection. Le milieu de culture est alors retiré et remplacé par de l'Opti-MEM® (*Gibco*) préchauffé à 37°C. Les complexes Lipofectamine™/ARN et Lipofectamine™/ADN sont préparés dans de l'Opti-MEM® en suivant le protocole du fournisseur, puis ajoutés aux cellules. Dans la plupart des cas, le milieu de transfection est remplacé après 6h par du milieu de culture préchauffé à 37°C. Plusieurs changements ont pu être apportés à ce protocole en fonction du type cellulaire ou du but de l'expérience. Ces changements seront alors indiqués par la suite.

2. Méthodes d'extraction de matériel biologique

2.1. Extraction d'ADN total de cellules humaines

Pour extraire l'ADN total des cellules humaines (*Comte et al.*, 2013), celles-ci sont tout d'abord détachées comme décrit dans la partie II-1.2. Après centrifugation à 600xg ; 10min ; t°a, le culot de cellules est repris dans 500µL de **tampon RSB** additionné de 10µL de Protéinase K (à 20mg/mL) (*Promega*) et incubé à 50°C pendant 2h. L'ADN est ensuite précipité en ajoutant 50µL de NaCl 5M et 500µL d'isopropanol et en plaçant le tout à -20°C pour la nuit. L'ADN est alors culotté par centrifugation à 16000xg ; 30min ; t°a, lavé à l'éthanol et resuspendu dans de l'eau milliQ ou du **tampon TE 1X**.

Tampon RSB : Tris-HCl 10mM pH7.5 ; NaCl 10mM ; EDTA 25mM ; SDS 1%

Tampon TE 1X : Tris-HCl 10mM pH8.0 ; EDTA 1mM

2.2. Extraction d'ARN total de cellules humaines

Pour extraire l'ARN total de cellules humaines, celles-ci sont tout d'abord détachées comme décrit dans la partie II-1.2. L'extraction est ensuite réalisée avec du TRIzol (*Ambion*) en suivant le protocole du fournisseur. Après centrifugation à 600xg ; 10min ; t°a, le culot de cellules est repris dans 500µL de TRIzol (*Ambion*) et incubé 5min à t°a. Puis, 100µL de chloroforme sont ajoutés et le tout est une nouvelle fois incubé pendant 3min à t°a. Après centrifugation à 16000xg ; 15min ; 4°C, la phase aqueuse supérieure est récupérée et les ARN sont précipités en ajoutant 250µL d'isopropanol et en incubant le tout à -20°C pour la nuit. Les ARN sont alors culottés par centrifugation à 16000xg ; 30min ; 4°C, lavés à l'éthanol, séchés puis repris dans un volume approprié d'eau milliQ.

2.3. Isolation des mitochondries de cellules humaines

Les mitochondries sont isolées à partir d'une culture d'au moins 25cm² de cellules humaines (*Dovydenko et al., 2015*). Les cellules sont tout d'abord détachées avec du **tampon PBS-EDTA**. Pour cela, le milieu de culture est retiré par aspiration et les cellules sont lavées avec du tampon PBS 1X. Les cellules sont ensuite détachées par incubation pendant 10min à 37°C dans du tampon PBS-EDTA. Elles sont alors centrifugées à 600xg ; 10min ; t°a et le culot est repris une première fois dans du PBS 1X pour laver les cellules. Après une nouvelle centrifugation à 600xg ; 10min ; t°a, le culot est repris dans 1,5mL de **tampon BB** + 0,3% BSA. Les cellules sont alors cassées par une série de 50 aspirations/refoulements au moyen d'une seringue de 2mL munie d'une aiguille 23Gx1'' (0,6 x 25mm) (*Terumo*[®]). Les débris cellulaires et les cellules non cassées sont ensuite éliminés par centrifugation à 1500xg ; 5min ; 4°C et le surnageant est récupéré. Cette étape est répétée 4 à 5 fois. Le dernier surnageant est alors centrifugé à 16000xg ; 45min ; 4°C pour culotter les mitochondries.

Tampon PBS-EDTA : PBS 1X ; EDTA 1mM

Tampon BB : Sorbitol 0,6M ; HEPES KOH 10mM pH6.7 ; EDTA 1mM

2.4. Extraction des ADN de mitochondries purifiées

Pour extraire les ADN mitochondriaux purifiés (*Tonin et al., 2014*), le culot de mitochondries est repris dans 270µL de **tampon BB** additionné de 30µL de **tampon DNase I**

10X. Les ADN situés à l'extérieur de la mitochondrie sont dégradés par ajout de 200U de DNase I (*Boehringer Mannheim*) et incubation à 4°C pendant 15min. La DNase I est ensuite inactivée en ajoutant 15mM d'EDTA, en centrifugeant à 16000xg ; 10min ; 4°C et en enlevant le surnageant. Les mitochondries sont ensuite resuspendues dans 2mL de **tampon de lyse** additionnés de 20µL de protéinase K (à 20mg/mL) et incubées 30min dans la glace. Puis, 20µL de Sarkozyl 20% sont ajoutés et les ADN mitochondriaux sont extraits avec un mélange de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (ratio 25:24:1) pH7.5-8.0. Ils sont ensuite précipités en ajoutant 100mM de NaCl et un volume d'isopropanol et en incubant le tout à -20°C pour la nuit. Les ADN mitochondriaux sont ensuite culottés par centrifugation à 16000xg ; 30min ; t°a, lavés à l'éthanol et repris dans de l'eau milliQ ou du **tampon TE**.

Tampon DNase I 10X : Tris-HCl 100mM pH7.8 ; MgCl₂ 25mM ; CaCl₂ 5mM

Tampon de lyse : HEPES 20mM pH7.8 ; NaCl 75mM ; EDTA 50mM

2.5. Extraction des ARN de mitochondries purifiées

Pour extraire les ARN mitochondriaux purifiés (Dovydenko et al., 2015), le culot de mitochondries est repris dans 300µL de **tampon BB** additionné de 300µL de **tampon RNase A 2X** et le tout est incubé à température ambiante pendant 10min. Ceci a pour but de dégrader les ARN cytosoliques attachés à la membrane mitochondriale externe. La RNase A est ensuite inactivée en ajoutant 500µL de **tampon BB** + 5mM EDTA. Après centrifugation à 16000xg ; 10min ; 4°C, le culot de mitochondries est repris dans 300µL de **tampon BB**. Cette étape est répétée 3 fois pour laver les mitochondries. Pour produire des mitoplastes, dépourvus de membrane mitochondriale externe, 20µL de solution de digitonine (*Sigma*) (à 1mg/mL) sont ajoutés aux 300µL de tampon BB contenant les mitochondries, et le tout est incubé pendant 7min à t°a. Après dilution dans deux volumes de tampon BB, la suspension est centrifugée à 16000xg ; 10min ; 4°C. Le culot de mitoplastes est alors repris dans 500µL de TRIzol et l'extraction d'ARN est réalisée comme décrit dans la partie **II-2.2**. Les ARN mitochondriaux dans de l'eau milliQ sont stockés à -80°C.

Tampon RNase A 2X : Tampon BB ; RNase A (10mg/mL) ; MgCl₂ 4mM

2.6. Extraction des protéines de mitochondries purifiées

Pour extraire les protéines mitochondriales purifiées, le culot de mitochondries est repris dans 100µL de **tampon BB**. La concentration en protéines d'1/20^e de la suspension est déterminée par la méthode de Bradford. Les mitochondries sont alors traitées à la protéinase K (*Promega*) pendant 3min à 37°C en ajoutant 2µg de l'enzyme pour 100µg de protéines de la suspension. Cette étape a pour objectif de dégrader les protéines cytosoliques fixées à membrane mitochondriale externe. La protéinase K est ensuite inactivée en ajoutant 1mL de **tampon BB** et 10 µL de PMSF à 100mM, en centrifugeant à 16000xg ; 10min ; 4°C et en éliminant le surnageant. Pour analyser ces protéines par SDS-PAGE, le culot de mitochondries est repris dans du **tampon Laemmli 1X** et immédiatement chauffer à 95°C pendant 5min. Les échantillons peuvent être stockés à -20°C.

Tampon Laemmli 1X: Tris-HCl 62,5mM pH6.8 ; Glycérol 10% ; SDS 2% ; Bleu de Bromophenol 0,01%

3. Méthodes de mesure du taux d'hétéroplasmie

3.1. Mesure de l'hétéroplasmie de cellules porteuses de la délétion m.8363_15438del (KSS)

La quantification de l'hétéroplasmie au sein des cellules cybrides porteuses de la délétion m.8363_15438del (KSS) est effectuée par qPCR en temps réel à partir d'un extrait d'ADN total préparé suivant le protocole décrit dans la partie II-2.1 (Comte et al., 2013). Deux paires d'amorces sont utilisées (**Tableau 8**): les amorces n°1 et 2 permettent l'amplification d'un fragment de 210pb situé dans le gène mitochondrial de *MT-RNR1* (nucléotides 1095-1305 de l'ADNmt) qui n'est pas affecté par la délétion KSS ; les amorces n°3 et 4 permettent l'amplification d'un fragment de 164pb situé dans le gène mitochondrial *MT-ND4* affecté par la délétion KSS et qui caractérise donc uniquement les molécules d'ADNmt sauvages.

La détection de l'amplification d'ADN est réalisée avec du SYBR Green (*BioRad*) dans le thermocycleur « iCycler, CFX96™ Real-Time Detection System » (*BioRad*). Toutes les réactions de qPCR sont réalisées en triplicats et dans un volume final de 20µL contenant 10µL de iQ SYBR Green Supermix (*BioRad*), 1µL d'amorce n°1 ou 2 (à 10pmol/µL), 1µL d'amorce n°3 ou 4 (à

10pmol/ μ L), 3 μ L d'eau et 5 μ L d'ADN total dilué 100x (environ 5ng). L'amplification est réalisée dans les conditions décrites dans le **Tableau 8**.

N°	Nom	Séquence	Programme PCR
1	1095F	5' TAG CCC TAA ACC TCA ACA GT 3'	95°C ; 10min 95°C ; 30sec x40 60°C ; 30sec
2	1305B	5' TGC GCT TAC TTT GTA GCC TTC AT 3'	
3	11614F	5' CAT TGC ATA CTC TTC AAT CAG C 3'	
4	11778B	5' CGA CTG TGA GTG CGT T 3'	

Tableau 8. Amorces et conditions PCR pour la mesure du taux d'hétéroplasmie de la délétion KSS.

La quantification absolue du nombre de molécules d'ADNmt totales et sauvages est effectuée grâce à deux gammes étalons. Pour quantifier le nombre de copies d'ADNmt une gamme étalon a été réalisée avec un plasmide pUC119 contenant un fragment d'ADNmt (nucléotides 109-1714 de l'ADNmt) amplifié par les amorces 1 et 2. Pour quantifier le nombre de copies d'ADNmt sauvages, une gamme étalon a été réalisée avec un plasmide pUC119 contenant un fragment d'ADNmt (nucléotides 10739-11839 de l'ADNmt) amplifié avec les amorces 3 et 4. Chaque plasmide linéarisé a été dilué pour avoir 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 et 10^3 copies. Le taux d'hétéroplasmie pour la mutation m.8363_15438del est déterminé en utilisant la formule suivante :

$$\text{Taux d'hétéroplasmie (en \%)} = \left(1 - \frac{\text{ADNmt sauvage}}{\text{ADNmt total}}\right) \times 100$$

3.2. Mesure de l'hétéroplasmie de cellules porteuses de la mutation ponctuelle m.13514A>G

La quantification de l'hétéroplasmie au sein des cellules cybrides porteuses de la mutation ponctuelle m.13514A>G est effectuée par restriction de fragments PCR (Tonin et al., 2014) à partir d'un extrait d'ADN total préparé selon le protocole décrit dans la partie II-2.1. La mutation ponctuelle entraîne en effet l'apparition du site de restriction de l'enzyme HaeIII. Seuls les produits PCR comportant cette mutation pourront ainsi être digérés par l'enzyme de restriction HaeIII. C'est en déterminant la proportion de produits PCR digérés que l'on peut

alors évaluer le taux d'hétéroplasmie. L'ADN total est ainsi utilisé comme matrice dans une PCR pour amplifier un fragment d'ADNmt de 125pb grâce aux amorces 1 et 2 dans les conditions décrites dans le tableau 9. Ensuite, 1/5^e des produits PCR obtenus sont digérés 1h à 37°C par l'enzyme de restriction HaeIII (*ThermoScientific*). Les produits de digestion sont alors déposés sur gel de polyacrylamide natif 10% et séparés par électrophorèse. Après migration, le gel est coloré par un bain de bromure d'éthidium (1µg/mL) pendant 10min et visualisé sous UV (*Gbox, Syngene*). Les signaux sont quantifiés grâce au programme GeneTools (*Syngene*). Le taux d'hétéroplasmie est déterminé grâce à la formule :

$$\text{Taux d'hétéroplasmie} = \frac{\text{ADN digéré}}{\text{ADN total}} = \left[1 - \left(\frac{\text{Fragment 125pb}}{\text{Fragment 125pb} + 80\text{pb} + 45\text{pb}} \right) \right] \times 100$$

4. Méthodes relatives à l'analyse des acides nucléiques

4.1. Transfert de type Southern

Pour réaliser un transfert d'ADN de type Southern, les fragments d'ADN sont tout d'abord séparés par électrophorèse sur gel d'agarose dans du **tampon TBE 1X**. Après électrophorèse, le gel est plongé dans une **solution de dépurination** et placé sous agitation pendant 30min. Cette solution est ensuite remplacée par une **solution de dénaturation** qui est renouvelée après 5min pour 15min supplémentaires. Enfin, le gel est placé dans deux derniers bains de 10min dans une **solution de neutralisation**. Le gel d'agarose est ensuite placé sur du papier Whatman imbibé de tampon SSC 10X. Une membrane Amersham Hybond-N+ (*GE Healthcare*) de la même dimension que le gel puis trois morceaux de papier Whatman sont imbibés d'eau sont alors placés au-dessus du gel. Pour finir, une pile de papier filtre et un poids sont placés sur le gel, la membrane et le papier Whatman. Le transfert se fait par capillarité sur la nuit à température ambiante. Le lendemain, la membrane de nylon est récupérée et fixée sous UV à une puissance de 120000 µJ/cm².

Tampon TBE 1X : Tris-Borate 45mM ; EDTA 1mM pH 8.3

Solution de dépurination : HCl 0,25N

Solution de dénaturation : NaCl 1,5M ; NaOH 0,5M

Solution de neutralisation : NaCl 1,5M ; Tris-HCl 0,5M pH8.0

4.2. Transfert de type northern

Pour réaliser un transfert d'ARN de type northern, les ARN sont tout d'abord séparés par gel de polyacrylamide dénaturant. Ce gel est préparé à partir d'une solution stock d'acrylamide/N,N'méthylène bisacrylamide (19/1) 40% dans du tampon TBE 1X et contient 8M d'urée. Les solutions d'ARN sont additionnées d'un volume de **tampon de charge STOP**, chauffés à 95°C pendant 3min puis déposées sur gel. L'électrophorèse est alors réalisée à 200V dans du tampon TBE 1X. Les ARN sont ensuite visualisés sous UV à la Gbox (*Syngene*) après coloration dans un bain de bromure d'éthidium (0,5µg/mL) pendant 10min.

Le gel est alors incubé pendant 15min dans du **Tampon de transfert**. Puis, les ARN sont transférés sur membrane Amersham Hybond-N (GE Healthcare) par électro-transfert dans du tampon de transfert à 200mA et 4°C sur la nuit. Le lendemain, la membrane est séchée pendant 10min à température ambiante puis fixée sous UV sur chaque face pendant 3min à 150000µJ/cm².

Tampon de charge STOP : Formamide 98% (v/v) ; EDTA 5mM ; Bleu de xylène cyanol 0,02% ; Beu de Bromophénol 0,02%

Tampon de transfert : Tampon TBE 0,5X

5. Méthodes relatives au développement de la stratégie anti-réplivative utilisant l'ARNr 5S comme vecteur d'import mitochondrial

5.1. Modélisation et sélection des ARNr 5S recombinants

Les structures secondaires des ARNr 5S recombinants ont été prédites en utilisant le programme *RNA folding form* du serveur Mfold (Zuker *et al.*, 2003) et corrigées pour être en accord avec les données connues sur la structure de l'ARNr 5S humain (Szymanski *et al.*, 2003). Pour déterminer les températures de fusion des duplex ARN/ADN, j'ai utilisé le programme *OligoAnalyzer 3.1* (IDT-DNA) dans les conditions suivantes : type de la séquence = ARN, type de la cible = ADN, [Oligonucléotide] = 0,50µM, [Na⁺] = 100mM et [Mg²⁺] = 20mM. Pour estimer l'impact de la mutation ponctuelle m.13514A>G sur la température de fusion des duplex ARN/ADN, j'ai utilisé l'outil « Tm Mismatch » du programme *OligoAnalyzer 3.1* (IDT-DNA) qui permet l'introduction d'un mésappariement avec l'ADN ciblé. Cet outil ne permettant pas

l'analyse des duplex ARN/ADN, j'ai déterminé les températures de fusion pour des duplex ADN/ADN.

5.2. Production des matrices ADN pour la transcription *in vitro* des 5Srec.

Pour produire les ARNr 5S recombinants par transcription *in vitro*, des matrices ADN contenant les séquences de ces ARN sous le contrôle du promoteur T7 ont été produites par une série de deux PCR.

La PCR1 est réalisée dans un volume final de 50µL en utilisant l'enzyme Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (*ThermoScientific*) selon les indications du fournisseur. La matrice utilisée dans cette PCR est un plasmide pUC contenant la séquence de l'ARNr 5S humain sous le contrôle du promoteur T7 (Smirnov *et al.*, 2008). L'amplification est réalisée grâce à l'amorce sens n°1 et les amorces antisens n°2 à 14 (**Tableau 9**) dans les conditions décrites dans le **Tableau 10**. Cette PCR permet l'amplification d'un produit contenant le promoteur T7 suivi par une partie de la séquence de l'ARNr 5S et l'insert anti-répliatif.

n°	Nom	Séquence
1	PromT7	5' GGGATCCATAATACGACTCACTATA 3'
2	KSS-15H-rev	5' AGGCCCGACCCTGCTTAGCTTACAGTGCTTACTTTCAGGGTGGTATGGCCGTA 3'
3	KSS-15L-rev	5' AGGCCCGACCCTGCTTAGCTAGAAGTAAGCACTGTTTCAGGGTGGTATGGCCGTA 3'
4	KSS-17H-rev	5' AGGCCCGACCCTGCTTAGCTTTTACAGTGCTTACTTCTTCAGGGTGGTATGGCCGTA 3'
5	KSS-20H-rev	5' CCAGGCCCGACCCTGCTTAGCTTTACAGTGCTTACTTCTCGCGTTCAGGGTGGTATGGC 3'
6	KSS-21L-rev	5' CCAGGCCCGACCCTGCTTAGAAGAGAAGTAAGCACTGTAACGCGTTCAGGGTGGTATGGC 3'
7	KSS-23H-rev	5' CCAGGCCCGACCCTGCTTAGCTCTTTACAGTGCTTACTTCTCGCGTTCAGGGTGGTATGGC 3'
8	KSS-24L-rev	5' CCAGGCCCGACCCTGCTTAGGAAGAGAAGTAAGCACTGTAAGACGCGTTCAGGGTGGTATGGC 3'
9	ND5-18H-rev	5' CGACCCTGCTTAGCTACTCCAAGGCCACATCGCGTTCAGGGTG 3'
10	ND5-18L-rev	5' CGACCCTGCTTAGTGATGTGGCCTTTGGAGTTCGCGTTCAGGGTG 3'
11	ND5-19H-rev	5' CGACCCTGCTTAGAAAGGCCACATCATCGAAAACGCGTTCAGGGTG 3'
12	ND5-19L-rev	5' CGACCCTGCTTAGTTCGATGATGTGGCCTTTGCGCGTTCAGGGTG 3'
13	ND5-20H-rev	5' CGACCCTGCTTAGTTCTACTCCAAGGCCACATCGCGTTCAGGGTG 3'
14	ND5-20L-rev	5' CGACCCTGCTTAGTTTCGATGATGTGGCCTTTGCGCGTTCAGGGTG 3'
15	5S-BgIII	5' GGAGATCTAAGCCTACAACACCCGG 3'

Tableau 9. Séquence des amorces utilisées pour la production des matrices de transcription T7 des ARNr 5S recombinants.

Programme PCR	
Programme KSS	Programme ND5
94°C ; 5min	94°C ; 5min
94°C ; 30sec	94°C ; 30sec
52°C ; 30sec	56°C ; 30sec
72°C ; 30sec	72°C ; 30sec
x30	x30
72°C ; 6min	72°C ; 6min

Tableau 10. Programmes de la PCR1 pour l'amplification des matrices de transcription T7 des ARNr 5S recombinants.

La PCR2 est réalisée dans un volume final de 50µL en utilisant l'enzyme Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (*ThermoScientific*) selon les indications du fournisseur et avec la même matrice que pour la PCR1 (Smirnov *et al.*, 2008). L'amplification est ici réalisée en utilisant 1/10^e de la PCR1 comme amorce sens et l'amorce antisens n°15 (**Tableau 9**) dans les conditions décrites dans le **Tableau 11**. Cette seconde PCR permet l'amplification d'un produit contenant le promoteur T7 suivi de la séquence de l'ARNr 5S contenant un insert anti-répliatif, directement suivie par un site de restriction BglIII. L'ensemble de la réaction de PCR2 est ensuite séparé par électrophorèse sur gel de polyacrylamide natif puis visualisé sous UV après coloration au bromure d'éthidium. Les fragments d'ADN de taille attendue sont excisés puis placés dans 500µL de **Tampon d'éluion**. L'éluion est réalisée sous agitation à 2000rpm pour la nuit. Puis l'éluat est récupéré et l'ADN est précipité à l'éthanol, centrifugé à 16000xg ; 30min ; t°a, lavé à l'éthanol, séché, et finalement repris dans de l'eau milliQ. Finalement, les matrices ADN sont clivées par l'enzyme de restriction BglIII (FastDigest BglIII, ThermoScientific) pendant 1h à 37°C afin d'assurer la formation de l'extrémité 3' exacte de l'ARNr 5S.

Programme PCR2	
94°C ; 5min	
94°C ; 30sec	x30
52°C ; 30sec	
72°C ; 30sec	
72°C ; 6min	

Tableau 11. Programme de la PCR2 pour l'amplification des matrices de transcription T7 des ARNr 5S recombinants.

Tampon d'éluion : Acetate d'ammonium 0,5M ; Acetate de Magnésium 10mM ; EDTA 0,1mM ; SDS 0,1%

5.3. Synthèse des ARNr 5S recombinants par T7 transcription

La synthèse des ARNr 5S recombinants est effectuée grâce au kit T7 RiboMAX™ Express Large Scale RNA Production System (*Promega*) en suivant les indications du fournisseur. Ainsi, 1µg de la matrice ADN composée de la séquence de l'ARNr 5S recombinant sous le contrôle du promoteur T7 sont incubés dans 10µL de tampon RiboMAX Express T7 2X et 2µL d'un mélange d'enzymes (T7 ARN polymérase, pyrophosphatase, RNasin). La réaction est incubée à 37°C pendant 16h minimum puis l'ADN est éliminé par traitement à la DNase I pendant 30min à 37°C.

Les ARN sont ensuite purifiés sur gel de polyacrylamide 8%, 8M urée, TBE 1X. Pour cela, la solution de transcription est additionnée d'un volume de **tampon de charge STOP**, chauffée à 95°C pendant 3min et déposée sur le gel. Après migration, les ARN sont détectés par « UV-shadowing » et les signaux correspondants aux ARNr 5S recombinants sont excisés puis placés dans 400µL de tampon d'éluion et 40µL de phénol acide pH 4,5-5 sous agitation à 2000rpm à 4°C pendant 16h. L'éluat est alors récupéré et les ARN sont précipités à l'éthanol, lavés et repris dans un volume d'eau puis stockés à -80°C.

5.4. Marquage radioactif des ARNr 5S recombinants en 5'

Pour marquer radioactivement les ARNr 5S recombinants à l'extrémité 5', ceux-ci sont tout d'abord déphosphorylés. Pour cela, 2µg d'ARN sont mis en présence de 40U de RNaseOUT (*Invitrogen*) et de 1U de phosphatase alcaline (*Roche*), et incubés à 37°C pendant 40min. La solution est ensuite déprotéinisée en ajoutant un volume de phénol acide, en centrifugeant à 16000xg ; 5min ; 4°C, et en récupérant la phase aqueuse. Les ARNr 5S recombinés déphosphorylés sont alors précipités à l'éthanol et repris dans de l'eau.

Le marquage radioactif est réalisé en plaçant 0,7µg d'ARNr 5S recombinants pré-chauffés 1min à 90°C, en présence de 40U de RNaseOUT (*Invitrogen*), de 10U de T4 Polynucléotide Kinase (*Promega*) et de 3µL de γ -[³²P]-ATP (10µCi/µl ; 3000Ci/mmmole) pendant 45min à 37°C. Les ARNr 5S recombinés radiomarqués sont ensuite purifiés par gel filtration

grâce aux colonnes Micro Bio-Spin™ Chromatography Columns (*BioRad*) selon le protocole du fournisseur.

5.5. Tests d'hybridation *in vitro* à l'ADNmt des ARNr 5S recombinants

Pour la délétion KSS, les fragments de génomes mitochondriaux sauvages et mutants KSS sont synthétisés par PCR à partir de fragments d'ADNmt clonés dans le vecteur pUC119. Le fragment d'ADNmt sauvage de 430pb (positions 15251 à 15680 dans le gène du cytochrome b) est amplifié grâce aux amorces 1 et 2 dans les conditions décrites dans le **Tableau 12**. Le fragment d'ADNmt muté de 512pb (positions 8099 à 8365 et 15438 à 15680 correspondant aux bornes de la délétion) est amplifié grâce aux amorces 2 et 3 selon les conditions décrites dans le **Tableau 12**.

N°	Nom	Séquence	Programme PCR
1	CytwbwtF	5' CTT TAA AGC TTC ACA CGA TTC TTT ACC TTT C 3'	94°C ; 2min
2	CytwbwtR	5' TCT TTG GAA TTC GTT TGG ATA TAT GGA GGA TGG 3'	94°C ; 30sec 60°C ; 1min 72°C ; 1min
3	LysmtF	5' TCA TAC AAG CTT ACA GAT GCA ATT CCC GGA CG 3'	72°C ; 5min

Tableau 12. Amorces et programme PCR pour amplifier les fragments d'ADNmt WT et Mut KSS.

En rouge, site cible de l'enzyme de restriction HindIII. En bleu, site cible de l'enzyme de restriction EcoRI.

Pour la mutation ponctuelle ND5, les fragments de génome mitochondrial sauvage et mutants ND5 sont obtenus par PCR grâce aux amorces 1 et 2 dans les conditions décrites dans le **Tableau 13**. Les fragments de génome mitochondrial sauvage sont obtenus en utilisant de l'ADN total de cellules sauvages 143B comme matrice. Les fragments de génome mitochondrial mutant ND5 sont obtenus par PCR à partir d'ADN total de cellules cybrides contenant environ 80% d'ADNmt mutant porteur de la mutation m.13514A>G.

N°	Nom	Séquence	Programme PCR
1	CRCF	5' CAT ACC TCT CAC TTC AAC CTC C 3'	94°C ; 5min 94°C ; 30sec 50°C ; 1min 72°C ; 1min 72°C ; 10min
2	hmtGluRTfor	5' GTT CTT GTA GTT GAA ATA C 3'	

Tableau 13. Amorces et programme PCR pour amplifier les fragments d'ADNmt WT et Mut ND5.

Les fragments obtenus sont ensuite déposés sur gel d'agarose 1% et séparés par électrophorèse puis transférés sur membrane Amersham Hybond-N+ (*GE Healthcare*) comme décrit dans la partie II-4.1.

Avant hybridation, les membranes sont pré-hybridées pendant 1h à 65°C dans du **Tampon de pré-hybridation**. Les ARNr 5S recombinants radiomarqués sont alors chauffés 5min à 95°C. L'hybridation se déroule dans 10mL de **Tampon d'hybridation** contenant les ARNr 5S recombinants radiomarqués pendant 6h à 37°C sous rotation. Les membranes sont ensuite lavées 3 fois, pendant 10 minutes, dans du **Tampon de lavage**. Les signaux d'hybridation sont alors révélés par Phosphorimaging grâce au scanner multifonction "Typhoon TRIO" (*GE Healthcare*) et les signaux sont quantifiés en utilisant le programme ImageQuantTL.

Pour réhybrider une membrane avec d'autres ARN radioactifs, les membranes sont déshybridées par 3 bains successifs dans du **Tampon de déshybridation** à 80°C sous agitation pendant 10min.

Tampon de pré-hybridation : SSC 6X ; Solution de Denhardt 10X ; SDS 0,2%

Tampon d'hybridation : PBS 1X ; SDS 0,1%

Tampon de lavage : SSC 2X ; SDS 0,1%

Tampon de déshybridation : SSC 0,02X ; SDS 0,1%

5.6. Production de lignées cellulaires cybrides transmitochondriales Flp-In™

Les lignées cellulaires cybrides transmitochondriales comportant un site de recombinaison FRT ont été produites en utilisant le système Flp-In™ T-Rex™ (*Invitrogen*). Pour cela, les cellules cybrides TSFR Mt ou ND5 ont été transfectées avec le plasmide pFRT//*lacZeo*

en suivant les indications du fournisseur. Les cellules ayant intégré ce plasmide ont ensuite été sélectionnées à la Zeocin™ (*Invitrogen*) (60µg/mL pour les cellules ND5 pFRT ; 100µg/mL pour les cellules TSFR pFRT). Les clones cellulaires résistants à l'antibiotique ont ensuite été isolés, mis en culture et analysés.

L'activité spécifique en β-galactosidase a été déterminée grâce au kit « β-gal Assay kit » (*Invitrogen*) en suivant les instructions du fournisseur et quantifiée en nmol d'ONPG hydrolysé/30min/mg de protéines totales.

5.7. Analyse du nombre de site FRT au sein des lignées cybrides pFRT

Pour analyser le nombre de sites FRT au sein du génome nucléaire de chaque clone résistant à la Zeocin, l'ADN total des cellules a été extrait comme décrit dans la partie **II-2.a**. Cet ADN a ensuite été déprotéinisé en ajoutant un volume de Roti®-Phenol pH7.5-8.0 (*Roth*) et en incubant le tout 1h sur roue. Après centrifugation à 16000xg ; 5min ; t°a, la phase aqueuse est récupérée puis l'ADN est précipité à l'éthanol et centrifugé à 16000xg ; 30min ; t°a. Le culot d'ADN est alors lavé à l'éthanol puis repris dans un volume d'eau milliQ. L'ADN total a ensuite été digéré par les enzymes de restriction XbaI, HindIII ou les deux enzymes à la fois (*FastDigest*, *ThermoScientific*) pendant 16h à 37°C. La digestion enzymatique a alors été inactivée à 80°C pendant 10min. Les fragments d'ADN sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 1% puis transférés sur membrane Amersham Hybond N+ comme décrit dans le paragraphe **II-4.1**.

La détection des sites FRT est réalisée grâce à une sonde marquée radioactivement ciblant le plasmide pFRT/*lacZeo*. Pour cela, un fragment du plasmide pFRT/*lacZeo* a été amplifié par PCR avec les amorces 1 et 2 dans les conditions décrites dans le **Tableau 14**. Ce fragment PCR a ensuite été utilisé comme matrice pour générer des sondes radioactives marquées à l'α-[³²P]-dCTP avec le kit Prime-a-gene® Labelling System (*Promega*) en suivant les indications du fournisseur. Le produit de cette réaction est purifié par gel filtration grâce aux colonnes Micro Bio-Spin™ Chromatography Columns (*BioRad*).

N°	Nom	Séquence	Programme PCR
1	LacZ-Zeo-F	5' GCT GGA GTG CGA TCT TCC TG 3'	94°C ; 5min 94°C ; 30sec 60°C ; 1min 72°C ; 1min 72°C ; 10min
2	LacZ-Zeo-R	5' CTC ATC CGC CAC ATA TCC TGA 3'	

Tableau 14. Amorces et programme PCR pour amplification d'un fragment du plasmide pFRT/lacZeo.

La membrane est alors pré-hybridée pendant 1h à 65°C dans du **tampon de pré-hybridation phosphate** puis la sonde y est ajoutée après avoir été pré-chauffée pendant 3min à 95°C. L'hybridation est réalisée pendant 6h à 65°C, puis la membrane est lavée trois fois pendant 10min à 45°C dans du **tampon de lavage**. La membrane est alors exposée pendant 24h sur une plaque Imaging Plate Fuji BASIII et les signaux radioactifs sont révélés par phosphorimaging sur le scanner Typhoon TRIO (*GE Healthcare*).

Tampon de pré-hybridation phosphate : NaH₂PO₄ 0,5M ; Na₂HPO₄ 0,5M ; SDS 10%

Tampon de lavage : SSC 1X ; SDS 0,1%

5.8. Production de lignées cellulaires cybrides transmittochondriales exprimant des ARNr 5S recombinants

Pour générer des lignées cellulaires cybrides transmittochondriales KSS et ND5 exprimant des ARNr 5S recombinants, les gènes d'ARNr 5S recombinants ont tout d'abord été clonés dans le vecteur d'expression pcDNA5/FRT/TO (*Invitrogen*). Les gènes d'ARNr 5S recombinants ont été préparés par une série de deux amplifications PCR.

La PCR1 est une PCR réalisée avec des amorces qui se recouvrent partiellement (**Tableau 15**) dans les conditions décrites dans le **tableau 16**. Pour les molécules 5S-KSS-13H et 5S-KSS-14L, 5S-ND5-19H, 5S-ND5-20H et 5S-ND5-20L, cette PCR1 a été réalisée avec l'amorce sens n°1 et les amorces antisens n°3, 4, 12, 13 et 14. Pour les autres molécules, cette PCR1 a été réalisée avec l'amorce sens n°2 et les amorces antisens n° 5 à 11. Les produits PCR résultants contiennent la séquence flanquant le gène d'ARNr 5S en 5', une partie de la séquence de l'ARNr 5S et l'insert anti-répliatif.

Ce produit a ensuite été utilisé comme amorce sens dans la PCR2 avec l'amorce antisens n°15 pour les molécules 5S-KSS-13H, 5S-KSS-14L, 5S-ND5-19H, 5S-ND5-20H et 5S-ND5-20L et l'amorce antisens n°16 pour les autres molécules dans les conditions décrites dans le **tableau 16**. La matrice pour cette PCR est un plasmide contenant le gène de l'ARNr 5S humain et ses régions flanquantes (Smirnov *et al*, 2008).

N°	Nom	Séquence
1	5'-BamHI-5S	5' CCGGATCCGGGCGGGGCTGGGCTCTTGGGGCAGCCAGGCGCCTCCTCAGCGCCTACGGCCATACCACCC 3'
2	5'-HindIII-5S	5' CCAAGCTTGGGCGGGGCTGGGCTCTTGGGGCAGCCAGGCGCCTCCTCAGCGCCTACGGCCATACCACCC 3'
3	KSS-13H-rev	5' AGGCCCGACCCTGCTTAGCTACAGTGCTTACTTTTCAGGGTGGTATGGCCGTA 3'
4	KSS-14L-rev	5' AGGCCCGACCCTGCTTAGCTAAGTAAGCACTGTATTCAGGGTGGTATGGCCGTA 3'
5	KSS-15H-rev	5' AGGCCCGACCCTGCTTAGCTTTACAGTGCTTACTTTTCAGGGTGGTATGGCCGTA 3'
6	KSS-15L-rev	5' AGGCCCGACCCTGCTTAGCTAGAAGTAAGCACTGTTCAGGGTGGTATGGCCGTA 3'
7	KSS-17H-rev	5' AGGCCCGACCCTGCTTAGCTTTACAGTGCTTACTTCTTCAGGGTGGTATGGCCGTA 3'
8	KSS-20H-rev	5' CCAGGCCCGACCCTGCTTAGCTTTACAGTGCTTACTTCTCCGCTTCAGGGTGGTATGGC 3'
9	KSS-21L-rev	5' CCAGGCCCGACCCTGCTTAGAAGAGAAGTAAGCACTGTAAACGCGTTCAGGGTGGTATGGC 3'
10	KSS-23H-rev	5' CCAGGCCCGACCCTGCTTAGCTCTTTACAGTGCTTACTTCTCTCGCTTCAGGGTGGTATGGC 3'
11	KSS-24L-rev	5' CCAGGCCCGACCCTGCTTAGGAAGAGAAGTAAGCACTGTAAAGACGCGTTCAGGGTGGTATGGC 3'
12	KSS-19H-rev	5' CGACCCTGCTTAGAAAAGGCCACATCATCGAAACGCGTTCAGGGTG 3'
13	KSS-20H-rev	5' CGACCCTGCTTAGTTCTACTCAAAGGCCACATCGCGTTCAGGGTG 3'
14	KSS-20L-rev	5' CGACCCTGCTTAGTTTCGATGATGTGGCCTTTGCGCGTTCAGGGTG 3'
15	3'-HindIII-5S	5' CCAAGCTTAAAGCCAAAGAAAAGCCTACAACACCCG 3'
16	3'-BamHI-5S	5' CCGGATCCAAAGCCAAAGAAAAGCCTACAACACCCG 3'

Tableau 15. Amorces permettant l'amplification des gènes d'ARNr 5S recombinants et leur clonage dans le plasmide pcDNA5/FRT/TO.

Programme PCR	
PCR1	PCR2
94°C ; 5min	94°C ; 5min
94°C ; 30sec	94°C ; 1min
25°C ; 30sec	52°C ; 30sec
72°C ; 30sec	72°C ; 30sec
94°C ; 30sec	72°C ; 6min
48°C ; 30sec	
72°C ; 30sec	
94°C ; 30sec	
60°C ; 30sec	
72°C ; 30sec	
72°C ; 6min	

Tableau 16. Programmes PCR permettant l'amplification des gènes d'ARNr 5S recombinants

Les fragments PCR obtenus ont alors été purifiés sur gel d'agarose en utilisant le kit Qiaquick Gel Extraction (*QIAGEN*), puis digérés par les enzymes de restriction HindIII et BamHI (*FastDigest, ThermoScientific*) pendant 1h à 37°C. Parallèlement, 2µg de plasmide pcDNATM5/FRT/TO sont digérés par les enzymes de restriction BamHI et HindIII pendant 1h à 37°C puis déphosphorylés pendant 40min à 37°C. Les fragments PCR digérés sont alors ligués dans le plasmide pcDNATM5/FRT/TO digéré en présence de 1U de T4 DNA ligase pendant 1h à température ambiante. Les produits de ligation sont ensuite utilisés pour transformer des bactéries E.coloni électrocompétentes par électroporation à 2500V. Les bactéries sont alors étalées sur milieu LB additionné de 100µg/ml d'Ampicilline et incubées à 37°C pendant 16h. Les plasmides sont purifiés grâce au kit QIAprep Spin Miniprep (*QIAGEN*) et séquencés.

Les cellules cybrides TSFR pFRT et ND5 pFRT ont été co-transfectées avec un plasmide pcDNA5/FRT/TO-5Srec et le plasmide pOG44 permettant l'expression de la recombinase Flp à un ratio molaire de 1 :10 en utilisant la Lipofectamine 2000 (*Invitrogen*). Les cellules ayant intégré le plasmide pcDNA5/FRT/TO-5Srec sont alors sélectionnées en ajoutant 150µg/mL d'Hygromycine B-gold (*Invitrogen*), 48h après transfection.

5.9. Analyse de la quantité d'ARN par RT-PCR semi-quantitative

Les ARN totaux extraits d'après le protocole décrit dans le paragraphe II-2.2, sont tout d'abord traités à la DNase I (*Invitrogen*) pendant 30min à 37°C. Cette réaction est stoppée en

effectuant une seconde extraction au TRIzol. Les étapes de rétrotranscription et de PCR ont été réalisées en utilisant le kit QIAGEN One-step RT-PCR (QIAGEN) en suivant les recommandations du fournisseur. Les amorces utilisées permettent l'amplification spécifique des ARNr 5S recombinants car les amorces sens (n°1 à 6 du **tableau 17**) s'hybrident spécifiquement à l'insert anti-répliatif. L'amorce antisens n° 7 est commune à tous les ARNr 5S recombinants et cible l'extrémité 3' de l'ARNr 5S. Les préparations sont placées dans un thermocycleur et l'étape de rétrotranscription est réalisée à 50°C pendant 30min. La reverse transcriptase est ensuite inactivée en chauffant à 95°C pendant 12min. Cette étape permet également l'activation de l'ADN polymérase. L'amplification est alors réalisée selon les conditions décrites dans le **tableau 17**.

N°	Nom	Séquence	Programme
1	RT-5S-KSS-H	5' CAC CCT GAA AAG TAA GCA C 3'	50°C ; 30min RT 95°C ; 12min 94°C ; 15sec 52°C ; 30sec x32 72°C ; 30sec
2	RT-5S-KSS-L	5' CCT GAA TAC AGT GCT TAC 3'	
3	RT-13H-KSS	5' CTG AAG AAG TAA GCA CTG AG 3'	
4	RT-15H-KSS	5' GAG AAG TAA GCA CTG TAA AG 3'	
5	RT-15L-KSS	5' CCC TGA AAC AGT GCT TAC 3'	
6	RT-17H-KSS	5' CCC TGA AGA AGT AAG CAC TG 3'	
7	RT-5S-antisens	5' AAG CCT ACA ACA CCC 3'	

Tableau 17. Amorces et programme utilisés pour quantifier les ARNr 5S recombinants par RT-PCR semi-quantitative.

Les contrôles permettant la vérification de l'absence de contamination par de l'ADN sont réalisés sans étape de rétrotranscription. Pour chaque ARNr 5S recombinant, une droite de calibration est réalisée grâce à des amplifications par RT-PCR de quantités connues de transcrits synthétisés *in vitro*. Les produits de RT-PCR sont alors séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 8% natif, colorés au bromure d'éthidium, et révélés sous UV à la Gbox (Syngene). L'intensité des signaux est quantifiée avec le logiciel GeneTool (Syngene) et l'estimation semi-quantitative du nombre d'ARNr 5S recombinants par cellule est réalisée en se servant de l'équation de la droite de calibration : intensité du signal en fonction du logarithme de la quantité initiale d'ARN.

6. Méthodes relatives au développement du système CRISPR/Cas9 mitochondrial

6.1. Synthèse des ARNsg par T7 transcription

Les ARNsg ont été produits par T7 transcription en utilisant le kit T7 RiboMAX™ Express Large Scale RNA Production System (Promega) en suivant les instructions du fournisseur, à partir de matrices ADN composés de la séquence de chaque ARNsg précédée par le promoteur T7. Ces matrices sont produites par une première PCR utilisant 100pmol d'amorces qui se recouvrent partiellement (**Tableau 18**) en absence de matrice et en utilisant les conditions suivantes : après une première phase de dénaturation à 94°C pendant 5min, 5 cycles de dénaturation à 94°C pendant 30sec, d'hybridation des amorces à 30°C pendant 30sec et d'élongation à 72°C pendant 30sec sont réalisés. Puis, 5 nouveaux cycles de dénaturation à 94°C pendant 30sec, d'hybridation des amorces à 60°C pendant 30sec et d'élongation à 72°C pendant 30sec permettent l'obtention des matrices qui contiennent les séquences des différents ARNsg sous le contrôle du promoteur T7. Les matrices sont alors déprotéinisées par addition d'un volume de phénol pH7.5-8.0 et en récupérant la phase aqueuse. L'ADN est alors précipité à l'éthanol, centrifugé à 16000xg ; 30min ; t°a, lavé à l'éthanol et repris dans de l'eau milliQ. Après transcription avec le kit T7 RiboMAX™ Express Large Scale RNA Production System (Promega), les ARNsg sont purifiés comme décrit dans le paragraphe II-5.c, repris dans un volume d'eau milliQ et conservés à -80°C.

N°	Nom	Séquence
1	T7-KSS-5'guide	5'GGGATCCATAATACGACTCACTATAGAGAAGTAAGCACTGTAAAGGTTTTAGAGCTAGAA ATAG 3'
2	T7-D-KSS-5'guide	5'GGGATCCATAATACGACTCACTATAGCGCAAUCGGUAGCGCGAGAAGUAAGCACUGUAA AGGTTTTAGAGCTAGAAATAG 3'
3	Anti-F-3' guide	5'AAAGGCCCTGTAGGGGGCTCAACGGACTAGCCTTATTTAACTTGCTATTTCTAGC 3'
4	Anti-long-guide	5'AAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTATTTAACTTGCTA TTTCTAGC 3'
5	Anti-short-guide	5'CGGACTAGCCTTATTTAACTTGCTATTTCTAGC 3'
6	T7-WT-5'guide	5'GGGATCCATAATACGACTCACTATAGAAGGAAGAGAAGTAAGCCGTTTTAGAGCTAGAA ATAGCAAGTTAAAATAAGAATA 3'
7	T7-D-WT-5'guide	5'GGGATCCATAATACGACTCACTATAGCGCAATCGGTAGCGCGAAGGAAGAGAAGTAAGCC GTTTTAGAGCTAGAAATAGC 3'
8	Rev-F-long-guide	5'AAAGGCCCTGTAGGGGGCTCAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGA CTATTTCTATTTAACTTGCT 3'
9	Rev-long-guide	5'AAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTATTCTTATTTAACTTGCTA TTTCTAGCTCTAAAAC 3'
10	For-5F-tail	5'GGGATCCATAATACGACTCACTATAGTTAATTAATTAATGCTTGTTTTAGAGCTAGAAAT AGCAAGTTAAAATAATAATA 3'
11	For-8F-tail	5'GGGATCCATAATACGACTCACTATAGATAAATAATAGGATGAGGCGTTTTAGAGCTAGAAA TAGCAAGTTAAAATAATAATA 3'
12	Rev-F-tail	5'AAAGGCCCTGTAGGGGGCTCAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGAC TATTATTATTTAACTTGCT 3'
13	Rev-O-tail	5'AAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATTCGGACTATTCTTATTTAACTTGCTAT TTCTAGC 3'

Tableau 18. Amorces utilisées pour produire les matrices ADN de transcription des ARNs

En vert, séquence du promoteur T7 ; en rouge, séquence guide ; en jaune, tige-boucle d'import F ou D ; en bleu, séquence complémentaire à l'amorce opposée.

6.2. Expression et purification de la protéine Cas9 recombinante

La protéine recombinante Cas9 a été exprimée et purifiée en utilisant le plasmide commercial pMJ806 (Addgene #39312) selon le protocole décrit dans (Jinek *et al.*, 2012). Pour cela, ce plasmide portant une fusion de Cas9 avec une étiquette MBP, une étiquette His-tag sous le contrôle du promoteur de la β -galactosidase, a été introduit par transformation dans des bactéries E.coli Rosetta 2 BL21 (DE3) et les transformants ont été sélectionnés sur milieu LB + 25 μ g/mL de Kanamycine. Une pré-culture de 5mL a ensuite été réalisée dans du milieu LB + 25 μ g/mL de Kanamycine + 100 μ g/mL d'Ampicilline à 37°C sur la nuit. Cette pré-culture est utilisée pour ensemercer une culture de 100mL de LB contenant 0,4% (v/v) de glucose 1M

et 4mM de sulfate de magnésium. Lorsque la densité optique est située entre 0,6 et 0,9 unités, l'expression de la protéine Cas9 a été induite en ajoutant 0,2mM d'IPTG et en plaçant la culture à 18°C pendant 20h.

Après centrifugation à 5000xg ; 5min ; 4°C, le culot de bactérie est repris dans 1mL de **tampon de lyse protéique** additionné d'inhibiteurs de protéase (*Roche*). Les bactéries sont alors lysées par une série de deux sonications pendant 30 secondes à une amplitude de 25% entrecoupées par 1 minute d'incubation dans la glace. Les bactéries lysées sont alors centrifugées à 16000xg ; 30min ; 4°C et le surnageant est récupéré.

Une première étape de purification par affinité sur billes de Ni-NTA (*QIAGEN*) est alors réalisée. Pour cela, le lysat est incubé sur billes à 4°C sur roue pendant la nuit. La résine est ensuite lavée cinq fois avec du **tampon de lavage Ni-NTA** et la protéine est éluée avec le **tampon d'éluion Ni-NTA**.

Une seconde étape de purification est ensuite réalisée sur résine d'amylose (*New England Biolabs*). Pour cela, les éluats issus de la première purification sont incubés pendant 2h à 4°C sur roue avec les billes d'amylose. Les billes sont ensuite lavées cinq fois avec du **tampon de lavage amylose**. La protéine Cas9 recombinante est éluée par incubation sur la nuit à 4°C avec la protéase TEV. Enfin, la protéine est purifiée par dialyse contre la **solution de dialyse Cas9**.

Tampon de lyse protéique : Tris-HCl 20mM pH8.0 ; NaCl 500mM ; β -mercaptoéthanol 1mM

Tampon de lavage Ni-NTA : Tris-HCl 20mM pH8.0 ; NaCl 500mM

Tampon d'éluion Ni-NTA : Tris-HCl 20mM pH8.0 ; NaCl 250mM ; Glycérol 10% ; Imidazole 100mM

Tampon de lavage amylose : Tris-HCl 20mM pH7.4 ; NaCl 0,2M ; EDTA 1mM

Solution de dialyse Cas9 : HEPES 20mM ; KCl 150mM ; β -Mercaptoéthanol 1mM ; Glycérol 10%

6.3. Tests de clivage *in vitro*

Les tests de clivage *in vitro* ont été réalisés comme décrits dans (*Jinek et al., 2012*). Chaque réaction contient ainsi 500nM d'ARNsg, 500nM de protéine Cas9 recombinante et 300ng d'ADN matrice (qui peut être un plasmide linéarisé ou un fragment PCR). Avant la réaction, les ARNsg sont chauffés à 95°C pendant 2min puis laissés 10min à température

ambiante pour refroidir doucement. Les trois composant sont ensuite incubés pendant 1h à 37°C dans du **tampon de clivage Cas9**. La réaction est stoppée en ajoutant 250mM d'EDTA et du **tampon de charge ADN**. Les fragments d'ADN résultants sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 1%, colorés au bromure d'éthidium et visualisés sous UV à la Gbox (*Syngene*). Une détection par Southern blot peut aussi être réalisée comme décrit dans la partie **II-4.1**.

Tampon de clivage Cas9 : HEPES 20mM pH7.5 ; KCl 150mM ; DTT 0,5mM ; EDTA 0,1mM

Tampon de charge ADN : Glycérol 30% (v/v) ; Bleu de xylène cyanol 0,25% (p/v) ; Bleu de bromophénol 0,25% (p/v)

6.4. Analyses des protéines par western-blot

Les extraits protéiques ont été analysés par gel SDS-PAGE 8%. Avant dépôt, les échantillons sont additionnés d'un volume de tampon de Laemmli et chauffés à 40°C pendant 3min. La séparation par électrophorèse est réalisée à 150V pendant 1h30. Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose Amersham Protran (*GE Healthcare*) pendant 2h à 4°C dans du **tampon de transfert protéique**. Après transfert, la membrane est colorée au rouge Ponceau pendant 10min à température ambiante.

La membrane est ensuite incubée pendant 1h à température ambiante ou sur la nuit à 4°C dans une **solution de blocage** afin de diminuer les interactions aspécifiques des anticorps. La membrane est alors rincée avec du **tampon PBS-Tween**, puis incubée avec l'anticorps primaire dilué de façon approprié dans du tampon PBS-Tween, pendant 1h à température ambiante ou à 4°C sur la nuit. Après trois nouveaux lavages dans du tampon PBS-Tween pendant 10min à température ambiante, l'anticorps secondaire dilué au 1/10000 dans du tampon PBS-Tween est appliqué sur la membrane, et le tout est incubé pendant 1h à température ambiante. La membrane est ensuite lavée trois fois pendant 10min dans du tampon PBS-Tween. La révélation est réalisée en incubant la membrane pendant 2min dans la **solution de révélation**, puis par visualisation grâce au Chemidoc Touch, Imaging System (*Biorad*).

Pour enlever les anticorps de la membrane, celle-ci est incubée pendant 40min à 50°C dans du **tampon de stripping**, puis lavée plusieurs fois dans du tampon PBS-Tween.

Tampon de transfert protéique : Tris-Glycine-SDS 1X ; Ethanol 20%

Solution de blocage : PBS 1X ; Tween 0,1% ; 5% de lait en poudre

Tampon PBS-Tween : PBS 1X ; Tween 0,1%

Solution de révélation : Tris-HCl 100mM pH8.5 ; H₂O₂ 30% ; acide coumarique 90mM ; Luminol 250mM

Tampon de stripping : Tris-HCl 62mM pH6.7 ; β-mercaptoethanol 100mM ; SDS 2%

6.5. Analyses par microscopie

Toutes les analyses par microscopie confocale à fluorescence ont été généreusement réalisées par le Dr. Anna Smirnova. Pour cela, les cellules sont placées dans des plaques Lab-Tek® (*Nunc*) à 20% de confluence. Eventuellement, la transfection des cellules est réalisée 24h plus tard selon le protocole standard. La fixation est réalisée 24h après transfection en incubant les cellules pendant 10min à 37°C dans une **solution de fixation** ; suivi de 5 lavages dans du PBS 1X. Les cellules sont ensuite perméabilisées par incubation dans le **tampon de perméabilisation** pendant 10min, puis lavées 5 fois dans du tampon PBS 1X. Le blocage est alors réalisé en incubant les cellules pendant 20min dans du PBS 1X contenant 5% de BSA. L'incubation avec l'anticorps primaire est ensuite réalisée pendant 3h à 4°C, suivie de cinq nouveaux lavages au PBS 1X. Enfin, l'anticorps secondaire est ajouté pendant 1h à température ambiante et les cellules sont lavées cinq fois avec du PBS 1X. Les cellules ont alors été visualisées avec un microscope confocal de type LSM 700 (*Zeiss*) muni d'un objectif à immersion à huile 63x/1,40 et du logiciel d'acquisition ZEN (*Zeiss*). Les longueurs d'onde d'excitation sont de 488nm (pour l'Alexa Fluor 488) et de 633nm (pour l'Alexa Fluor 647). Pour la quantification des cellules induites à la tétracycline, le nombre de cellules positives pour la fluorescence hCas9 a été divisé par le nombre total de cellules estimé par marquage au DAPI et en utilisant le logiciel « ImageJ ».

Les analyses par microscopie super-résolutive PALM/STORM ont été réalisées par le Dr. Anna Smirnova en collaboration avec Ludovic Richert du laboratoire de biophotonique et de pharmacologie dirigé par le Dr. Yves Mély. Pour cela, des cellules Hep G2 ont été co-transfectées avec le plasmide MTS^{COX8A}-hCas9 et un plasmide permettant l'expression de la fusion TWINKLE-mEos2. Les procédures de fixation et d'immunofluorescence sont réalisées comme décrits précédemment.

Solution de fixation : PBS 1X ; Paraformaldéhyde 3% ; dans du milieu de culture.

Tampon de perméabilisation : PBS 1X ; Triton X-100 0,5% (v/v)

6.6. Analyse de la localisation subcellulaire des ARNsg

Pour analyser la localisation mitochondriale des ARNsg (Dovydenko et al., 2015), les cellules cybrides TSFR Mt ou Hep G2 ont été transfectées avec chaque ARNsg à raison de 1µg/10cm² de cellules, en utilisant la Lipofectamine 2000 (*Invitrogen*) d'après les instructions du fournisseur. Les ARN totaux et mitochondriaux ont été extraits 48h après transfection comme décrit dans les paragraphes II-2.2, II-2.3 et II-2.5. Les ARN ont ensuite été séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide dénaturant et transférés sur membrane Amersham Hybond-N comme décrit dans la partie II-4.2. Après incubation dans du **tampon d'hybridation ARN** pendant 1h à 65°C, les sondes marquées radioactivement en 5' sont appliquées sur la membrane pendant 6h à la température appropriée dans du tampon d'hybridation. Les sondes sont préparées en incubant 50pmol d'oligonucléotide ADN avec 10U de T4 Polynucléotide Kinase (*Promega*) et 10µCi de γ-[³²P]-ATP à 37°C pendant 45min et en les purifiant par filtration sur gel avec des colonnes Micro Bio-Spin chromatography columns (*BioRad*) en suivant les instructions du fournisseur. Avant hybridation, les sondes sont chauffées pendant 5min à 95°C. Après hybridation, les membranes sont lavées 3 fois dans du **tampon de lavage northern** pendant 10min à température ambiante. Les signaux radioactifs sont révélés par Phosphorimaging sur un scanner Typhoon TRIO (*GE Healthcare*) et quantifiés grâce au logiciel ImageQuant TL (*GE Healthcare*). Pour calculer l'efficacité d'import, les signaux sont tout d'abord normalisés par le signal d'un ARN mitochondrial. La proportion d'ARN importé est déterminé en réalisant le ratio des signaux normalisés mitochondriaux et totaux.

Tampon d'hybridation ARN : SSC 6X ; Solution de Denhardt 10X ; SDS 0,2%

Tampon de lavage northern : SSC 2X ; SDS 0,1%

6.7. Préparation de lysats de mitochondries

Pour réaliser des tests de clivage *in vitro* en utilisant des lysats mitochondriaux, les mitochondries de cellules HEK293-T-Rex-MTS^{COX8A}-hCas9 ont été isolées comme décrit dans le paragraphe II-2.3. Les mitochondries sont ensuite resuspendues dans du **tampon de lyse mitochondriale** et incubées pendant 2h à 4°C sur roue. Les lysats peuvent ensuite être séparés en phases solubles et insolubles par centrifugation à 16000xg ; 10min ; 4°C.

Tampon de lyse mitochondriale : Tris-HCl 20mM pH7.8 ; KCl 150mM ; MgCl₂ 10mM ; DTT 5mM ; Triton-X 100 1% ; Inhibiteurs de protéase 1X (*Roche*).

6.8. Analyse de la quantité d'ADNmt par cellules par qPCR en temps réel

Pour mesurer la quantité d'ADNmt au sein des cellules, nous avons utilisé une technique par qPCR en temps réel. L'ADN total des cellules transfectées a été extrait grâce au protocole décrit dans le paragraphe II-2.1. La détection de l'amplification d'ADN est réalisée avec du SYBR Green (*BioRad*) dans le thermocycleur « iCycler, CFX96™ Real-Time Detection System » (*BioRad*). Toutes les réactions de qPCR sont réalisées en triplicats et dans un volume final de 20µL contenant 10µL de iQ SYBR Green Supermix (*BioRad*), 1µL d'amorce n°1 ou 2 (à 10pmol/µL), 1µL d'amorce n°3 ou 4 (à 10pmol/µL), 3µL d'eau et 5µL d'ADN total dilué 100x (environ 5ng). L'amplification est réalisée dans les conditions décrites dans le **Tableau 19**. Les amorces 1 et 2 permettent l'amplification d'un fragment du gène mitochondrial *MT-RNR1*. Les amorces 3 et 4 permettent l'amplification d'un fragment du gène nucléaire *TST*. Les données obtenues ont été analysées *in silico* en utilisant le programme BioRad CFX Manager™ 3.0. L'efficacité d'amplification est déterminée par le logiciel grâce aux courbes de calibration réalisées à partir de dilutions successives des plasmides contenant les fragments ciblés par les deux couples d'amorce. La quantité relative de gène *MT-RNR1* a été déterminée par la formule :

$$\text{Quantité relative } MT-RNR1 = \frac{[E_{MT-RNR1}^{(Ct \text{ référence} - Ct \text{ échantillon})}]}{[E_{TST}^{(Ct \text{ référence} - Ct \text{ échantillon})}]}$$

Où : $E_{MT-RNR1}$ = Efficacité d'amplification du gène MT-RNR1

E_{TST} = Efficacité d'amplification du gène TST

Ct référence = Cycle seuil des cellules contrôle

Ct échantillon = Cycle seuil des cellules traitées

La quantification absolue du nombre de gènes *MT-RNR1* a été déterminée en réalisant des courbes de calibration. La courbe de calibration du gène *MT-RNR1* a été réalisée avec des quantités connues d'un plasmide contenant un fragment de ce gène (nucléotides 109-1714 de l'ADNmt). La courbe de calibration du gène TST a été produite à partir de quantités connues d'un plasmide contenant ce gène (plasmide pTST-3xFlag). La quantité de gènes MT-RNR1 a été normalisée par la quantité de gènes TST.

N°	Nom	Séquence	Programme PCR
1	1095F	5' TAG CCC TAA ACC TCA ACA GT 3'	95°C ; 10min 95°C ; 30sec x40 60°C ; 30sec
2	1305B	5' TGC GCT TAC TTT GTA GCC TTC AT 3'	
3	TST1-For	5' GTG GAT GTT CCG TGT GTT TGG 3'	
4	TST1-Rev	5' CAG CAC CTG CTC GTA GGT C 3'	

Tableau 19. Amorces et programme PCR utilisés pour quantifier la quantité d'ADNmt par cellules.

Bibliographie

Bibliographie

A

Agaronyan, K. *et al.* (2015) 'Replication-transcription switch in human mitochondria', *Science*, 347(6221), pp. 548–551.

Akman, G. *et al.* (2016) 'Pathological ribonuclease H1 causes R-loop depletion and aberrant DNA segregation in mitochondria', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(30), pp. E4276–E4285.

Alkhnabashi, O. S. *et al.* (2016) 'Characterizing leader sequences of CRISPR loci', *Bioinformatics*, 32(17), pp. i576–i585

Amunts, A. *et al.* (2015) 'The structure of the human mitochondrial ribosome', *Science*, 348(6230), pp. 95–98.

Anderson, S. *et al.* (1981) 'Sequence and organization of the human mitochondrial genome', *Nature*, 290(5806), pp. 457–465.

Arnberg, A. *et al.* (1971) 'The presence of DNA molecules with a displacement loop in standard mitochondrial DNA preparations', *BBA Section Nucleic Acids And Protein Synthesis*, 246(2), pp. 353–357.

B

Bacman, S. *et al.* (2007) 'Modulating mtDNA heteroplasmy by mitochondria-targeted restriction endonucleases in a "differential multiple cleavage-site" model', *Gene Therapy*, 14(18), pp. 1309–1318.

Bacman, S. R. *et al.* (2012) 'Manipulation of mtDNA heteroplasmy in all striated muscles of newborn mice by AAV9-mediated delivery of a mitochondria-targeted restriction endonuclease', *Gene Therapy*. Nature Publishing Group, 19(11), pp. 1101–1106

Bacman, S. R. *et al.* (2013) 'Specific elimination of mutant mitochondrial genomes in patient-derived cells by mitoTALENs', *Nature Medicine*, 19(9), pp. 1111–1113.

Bacman, S. R., Williams, S. L. and Moraes, C. T. (2009) 'Intra- and inter-molecular recombination of mitochondrial DNA after in vivo induction of multiple double-strand breaks', *Nucleic Acids Research*, 37(13), pp. 4218–4226.

Baleva, M. *et al.* (2015) 'A moonlighting human protein is involved in mitochondrial import of tRNA', *International Journal of Molecular Sciences*, 16(5), pp. 9354–9367.

Barrangou, R. *et al.* (2007) 'CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes', *Science*, 315(March), pp. 1709–1713.

Barrangou, R. and Marraffini, L. A. (2014) 'CRISPR-cas systems: Prokaryotes upgrade to adaptive immunity', *Molecular Cell*. Elsevier Inc., 54(2), pp. 234–244.

Bayona-Bafaluy, M. P. *et al.* (2005) 'Rapid directional shift of mitochondrial DNA heteroplasmy in animal tissues by a mitochondrially targeted restriction endonuclease.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(40), pp. 14392–14397.

Bikard, D. *et al.* (2013) 'Programmable repression and activation of bacterial gene expression using an engineered CRISPR-Cas system', *Nucleic Acids Research*, 41(15), pp. 7429–7437.

Bleier, L. and Dröse, S. (2013) 'Superoxide generation by complex III: From mechanistic rationales to functional consequences', *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*. Elsevier B.V., 1827(11–12), pp. 1320–1331.

Bokori-Brown, M. and Holt, I. J. (2006) 'Expression of algal nuclear ATP synthase subunit 6 in human cells results in protein targeting to mitochondria but no assembly into ATP synthase.', *Rejuvenation research*, 9(4), pp. 455–469.

Bolotin, A. *et al.* (2005) 'Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin', *Microbiology*, 151(8), pp. 2551–2561.

Boominathan, A. *et al.* (2016) 'Stable nuclear expression of ATP8 and ATP6 genes rescues a mtDNA Complex v null mutant', *Nucleic Acids Research*, 44(19), pp. 9342–9357.

Bouzaidi-Tiali, N. *et al.* (2007) 'Elongation factor 1a mediates the specificity of mitochondrial tRNA import in *T. brucei*', *The EMBO Journal*, 26(20), pp. 4302–4312.

Bowmaker, M. *et al.* (2003) 'Mammalian Mitochondrial DNA Replicates Bidirectionally from an Initiation Zone', *Journal of Biological Chemistry*, 278(51), pp. 50961–50969.

Brandina, I. *et al.* (2006) 'Enolase takes part in a macromolecular complex associated to mitochondria in yeast', *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1757(9–10), pp. 1217–1228.

Brzezniak, L. K. *et al.* (2011) 'Involvement of human ELAC2 gene product in 3' end processing of mitochondrial tRNAs', *RNA Biology*, 8(4), pp. 616–626.

C

Cao, L. *et al.* (2007) 'The mitochondrial bottleneck occurs without reduction of mtDNA content in female mouse germ cells', *Nature Genetics*, 39(3), pp. 386–390.

Caspari, E. (1955) 'the Role of Genes and Cytoplasmic Particles in Differentiation', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 60(7), pp. 1026–1037.

Cerritelli, S. M. *et al.* (2016) 'Failure to Produce Mitochondrial DNA Results in Embryonic Lethality in *Rnaseh1* Null Mice', *Molecular Cell*, 11(3), pp. 807–815

Chacinska, A. *et al.* (2005) 'Mitochondrial presequence translocase: Switching between TOM tethering and motor recruitment involves Tim21 and Tim17', *Cell*. Elsevier Inc., 120(6), pp. 817–829.

Chacinska, A. *et al.* (2009) 'Importing Mitochondrial Proteins: Machineries and Mechanisms', *Cell*, 138(4), pp. 628–644.

Chang, D. and Clayton, D. (1987) 'A Mammalian Mitochondrial RNA Processing Activity Contains Nucleus-Encoded RNA', 235(4793), pp. 1178–1184.

Chen, B. and Huang, B. (2014) *Imaging genomic elements in living cells using CRISPR/Cas9*. 1st edn, *Methods in Enzymology*. 1st edn. Elsevier Inc.

Chinnery, P. *et al.* (1999) 'Peptide nucleic acid delivery to human mitochondria', *Gene Therapy*, 6, pp. 1919–1928.

Chretien, D. *et al.* (2017) 'Mitochondria are physiologically maintained at close to 50 °C'.

Comte, C. *et al.* (2013) 'Mitochondrial targeting of recombinant RNAs modulates the level of a heteroplasmic mutation in human mitochondrial DNA associated with Kearns Sayre Syndrome', *Nucleic Acids Research*, 41(1), pp. 418–433.

Cong, L. *et al.* (2013) 'Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/VCas Systems', *Science*, 339(6121), pp. 819–823.

Corona, P. *et al.* (2001) 'A Novel mtDNA Mutation in the ND5 Subunit of Complex I in Two MELAS Patients', *Annals of Neurology*, 49(1), pp. 106–110.

Crausaz Esseiva, A. *et al.* (2004) 'The T-Stem Determines the Cytosolic or Mitochondrial Localization of Trypanosomal tRNAs^{Met}', *Molecular biology of the cell*, 15(June), pp. 2750–2757.

Craven, L. *et al.* (2017) 'Recent advances in mitochondrial disease', *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 18(7), pp. 1–7.

Cree, L. M. *et al.* (2008) 'A reduction of mitochondrial DNA molecules during embryogenesis explains the rapid segregation of genotypes', *Nature Genetics*, 40(2), pp. 249–254.

Cwerman-Thibault, H. *et al.* (2015) 'Nuclear expression of mitochondrial ND4 leads to the protein assembling in complex I and prevents optic atrophy and visual loss', *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development*, 2 : 15003.

D

D'Aurelio, M. *et al.* (2004) 'Heterologous mitochondrial DNA recombination in human cells', *Human Molecular Genetics*, 13(24), pp. 3171–3179.

Delage, L. *et al.* (2003) 'In vitro import of a nuclearly encoded tRNA into mitochondria of *Solanum tuberosum*.' , *Molecular and cellular biology*, 23(11), pp. 4000–4012.

Deltcheva, E. *et al.* (2011) 'CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III', *Nature*, 471(7340), pp. 602–607.

Desquiret-Dumas, V. *et al.* (2012) 'Metabolically induced heteroplasmy shifting and l-arginine treatment reduce the energetic defect in a neuronal-like model of MELAS', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. Elsevier B.V., 1822(6), pp. 1019–1029.

Doersen, C. J. *et al.* (1985) 'Characterization of an RNase P activity from HeLa cell mitochondria. Comparison with the cytosol RNase P activity', *Journal of Biological Chemistry*, 260(10), pp. 5942–5949.

Dovydenko, I. *et al.* (2015) 'Mitochondrial Targeting of Recombinant RNA', in *Mitochondrial medicine*, pp. 209–225.

Dudek, J., Rehling, P. and van der Laan, M. (2013) 'Mitochondrial protein import: Common principles and physiological networks', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. Elsevier B.V., 1833(2), pp. 274–285.

E

Ekstrand, M. I. *et al.* (2004) 'Mitochondrial transcription factor A regulates mtDNA copy number in mammals', *Human Molecular Genetics*, 13(9), pp. 935–944.

El-Hattab, A. W. and Scaglia, F. (2013) 'Mitochondrial DNA Depletion Syndromes: Review and Updates of Genetic Basis, Manifestations, and Therapeutic Options', *Neurotherapeutics*, 10(2), pp. 186–198.

Elliott, H. R. *et al.* (2008) 'Pathogenic Mitochondrial DNA Mutations Are Common in the General Population', *American Journal of Human Genetics*, 83(2), pp. 254–260.

Entelis, N. *et al.* (2006) 'A glycolytic enzyme, enolase, is recruited as a cofactor of tRNA targeting toward mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae*', *Genes and Development*, 20(12), pp. 1609–1620.

Entelis, N. S. *et al.* (2001) '5 S rRNA and tRNA import into human mitochondria: Comparison of in vitro requirements', *Journal of Biological Chemistry*, 276(49), pp. 45642–45653.

Ernster, L. and Schatz, G. (1981) 'Mitochondria : A Historical Review', 91(December).

F

Falkenberg, M. *et al.* (2002) 'Mitochondrial transcription factors B1 and B2 activate transcription of human mtDNA', *Nature Genetics*, 31(3), pp. 289–294.

Falkenberg, M., Larsson, N.-G. and Gustafsson, C. M. (2007) 'DNA Replication and Transcription in Mammalian Mitochondria', *Annual Review of Biochemistry*, 76(1), pp. 679–699.

Feuer, W.J. *et al.* (2016) 'Gene Therapy for Leber Hereditary Optic Neuropathy : Initial Results' *Ophthalmology*, 123(3), pp. 558-570.

Frechin, M. *et al.* (2009) 'Yeast mitochondrial Gln-tRNA^{Gln} generated by a GatFAB-mediated transamidation pathway involving Arc1p-controlled subcellular sorting of cytosolic GluRS', *Genes and Development*, 23(9), pp. 1119–1130.

Frey, S. *et al.* (2017) 'The addition of ketone bodies alleviates mitochondrial dysfunction by restoring complex I assembly in a MELAS cellular model', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. Elsevier B.V., 1863(1), pp. 284–291

Freyer, C. *et al.* (2010) 'Maintenance of respiratory chain function in mouse hearts with severely impaired mtDNA transcription', *Nucleic Acids Research*, 38(19), pp. 6577–6588.

G

Gammage, P. A. *et al.* (2014) 'Mitochondrially targeted ZFNs for selective degradation of pathogenic mitochondrial genomes bearing large-scale deletions or point mutations', *EMBO Molecular Medicine*, 6(4), pp. 458–466.

Gammage, P. A. *et al.* (2016) 'Near-complete elimination of mutant mtDNA by iterative or dynamic dose-controlled treatment with mtZFNs', *Nucleic Acids Research*, 44(16), pp. 7804–7816.

Garneau, J. E. *et al.* (2010) 'The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA', *Nature*, 468(7320), pp. 67–71.

Geiger, J. and Dalgaard, L. T. (2017) 'Interplay of mitochondrial metabolism and microRNAs', *Cellular and Molecular Life Sciences*. Springer International Publishing, 74(4), pp. 631–646.

Gilbert, L. a *et al.* (2013) 'CRISPR-Mediated Modular RNA-Guided Regulation of Transcription in Eukaryotes', *Cell*, 154(2), pp. 442–451.

Gilkerson, R. *et al.* (2013) 'The Mitochondrial Nucleoid : Integrating mitochondrial DNA into cellular homeostasis', *Cold Spring Harb Perspect Bio*, pp. 1–10.

Glick, B. S. *et al.* (1992) 'Cytochromes c1 and b2 are sorted to the intermembrane space of yeast mitochondria by a stop-transfer mechanism', *Cell*, 69(5), pp. 809–822.

Gorman, G. S. *et al.* (2015) 'Prevalence of nuclear and mitochondrial DNA mutations related to adult mitochondrial disease', *Annals of Neurology*, 77(5), pp. 753–759.

Gorman, G. S. *et al.* (2016) 'Mitochondrial diseases', *Nature Reviews Disease Primers*. Macmillan Publishers Limited, 2, p. 16080.

Gowher, A. *et al.* (2013) 'Induced tRNA Import into Human Mitochondria: Implication of a Host Aminoacyl-tRNA-Synthetase', *PLoS ONE*, 8(6).

Greber, B. J. *et al.* (2015) 'The complete structure of the 55S mammalian mitochondrial

ribosome', *Science*, 348(6232), pp. 303–308

H

Hale, C. R. *et al.* (2009) 'RNA-Guided RNA Cleavage by a CRISPR RNA-Cas Protein Complex', *Cell*. Elsevier Ltd, 139(5), pp. 945–956.

Hancock, K. and Hajduk, S. L. (1990) 'The Mitochondrial Encoded * tRNAs of *Trypanosoma brucei* Are Nuclear', *Biochemistry*, 265(31), pp. 19208–19215

Hashimoto, M. *et al.* (2015) 'MitoTALEN: A General Approach to Reduce Mutant mtDNA Loads and Restore Oxidative Phosphorylation Function in Mitochondrial Diseases', *Molecular Therapy*. American Society of Gene & Cell Therapy, 23(10), pp. 1592–1599.

He, J. *et al.* (2012) 'Mitochondrial nucleoid interacting proteins support mitochondrial protein synthesis', *Nucleic Acids Research*, 40(13), pp. 6109–6121.

Hille, F. and Charpentier, E. (2016) 'CRISPR-Cas : biology , mechanisms and relevance'.

Holt, I. J., Harding, A. E. and Morgan-Hughes, J. A. (1988) 'Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies', *Nature*, 331(6158), pp. 717–719.

Holt, I. J., Lorimer, H. E. and Jacobs, H. T. (2000) 'Coupled Leading- and Lagging-Strand Synthesis of Mammalian Mitochondrial DNA', *Cell*, 100(5), pp. 515–524.

Hwang, W. Y. *et al.* (2013) 'Efficient In Vivo Genome Editing Using RNA-Guided Nucleases Woong', *Nature biotechnology*, 31(3), pp. 227–229.

Hyvärinen, A. K. *et al.* (2007) 'The mitochondrial transcription termination factor mTERF modulates replication pausing in human mitochondrial DNA', *Nucleic Acids Research*, 35(19), pp. 6458–6474.

I

Ikeda, S. and Ozaki, K. (1997) 'Action of mitochondrial endonuclease G on DNA damaged by L-ascorbic acid, peplomycin, and cis-diamminedichloroplatinum (II).', *Biochemical and biophysical research communications*, 235(2), pp. 291–294.

J

Jagannathan, R. *et al.* (2015) 'Translational Regulation of the Mitochondrial Genome Following Redistribution of Mitochondrial MicroRNA in the Diabetic Heart', *Circulation: Cardiovascular Genetics*, 8(6), pp. 785–802.

Jansen, R. *et al.* (2002) 'Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes', *Molecular Microbiology*, 43(6), pp. 1565–1575.

Jiang, F. and Doudna, J. A. (2017) 'CRISPR – Cas9 Structures and Mechanisms',

Annu.Rev.Biophys, 46(March), pp. 505–529.

Jinek, M. *et al.* (2012) 'A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity', *Science*, 337(6096), pp. 816–821.

Jinek, M. *et al.* (2014) 'Structures of Cas9 Endonucleases Reveal RNA-Mediated Conformational Activation', *Science*, 343(6176), pp. 1247997–1247997.

Jusiak, B. *et al.* (2016) 'Engineering Synthetic Gene Circuits in Living Cells with CRISPR Technology', *Trends in Biotechnology*. Elsevier Ltd, 34(7), pp. 535–547.

K

Kaltimbacher, V. *et al.* (2006) 'mRNA localization to the mitochondrial surface allows the efficient translocation inside the organelle of a nuclear recoded ATP6 protein.', *RNA (New York, N.Y.)*, 12(7), pp. 1408–1417.

Kamenski, P. *et al.* (2007) 'Evidence for an Adaptation Mechanism of Mitochondrial Translation via tRNA Import from the Cytosol', *Molecular Cell*, 26(5), pp. 625–637.

Karicheva, O. Z. *et al.* (2011) 'Correction of the consequences of mitochondrial 3243A>G mutation in the MT-TL1 gene causing the MELAS syndrome by tRNA import into mitochondria', *Nucleic Acids Research*, 39(18), pp. 8173–8186.

Karnkowska, A. *et al.* (2016) 'A eukaryote without a mitochondrial organelle', *Current Biology*, 26(10), pp. 1274–1284.

Kazak, L., Reyes, A. and Holt, I. J. (2012) 'Minimizing the damage: repair pathways keep mitochondrial DNA intact', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group, 13(10), pp. 659–671.

Kzakova, H. A. *et al.* (1999) 'The aminoacceptor stem of the yeast tRNA(Lys) contains determinants of mitochondrial import selectivity', *FEBS Letters*, 442(2–3), pp. 193–197.

King, M. and Attardi, G. (1989) 'Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation', *Science*, 246(4929), pp. 500–503.

Kiss, T. and Filipowicz, W. (1992) 'Evidence against a mitochondrial location of the 7-2/MRP RNA in mammalian cells', *Cell*, 70(1), pp. 11–16.

Kolesnikova, O. *et al.* (2010) 'Selection of RNA aptamers imported into yeast and human mitochondria', *RNA (New York, NY)*, 16(5), pp. 926–941.

Kolesnikova, O. A. (2000) 'Suppression of Mutations in Mitochondrial DNA by tRNAs Imported from the Cytoplasm', *Science*, 289(5486), pp. 1931–1933.

Kolesnikova, O. A. *et al.* (2004) 'Nuclear DNA-encoded tRNAs targeted into mitochondria can rescue a mitochondrial DNA mutation associated with the MERRF syndrome in cultured human cells', *Human Molecular Genetics*, 13(20), pp. 2519–2534.

Korhonen, J. A. *et al.* (2004) 'Reconstitution of a minimal mtDNA replisome in vitro', *The EMBO Journal*, 23(12), pp. 2423–2429.

Kruse, B., Narasimhan, N. and Attardi, G. (1989) 'Termination of transcription in human mitochondria: Identification and purification of a DNA binding protein factor that promotes termination', *Cell*, 58(2), pp. 391–397.

Kukat, C. *et al.* (2011) 'Super-resolution 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*, 108(33), pp. 13534–13539.

Kukat, C. *et al.* (2015) 'Cross-strand binding of TFAM to a single mtDNA molecule forms the mitochondrial nucleoid', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(36), pp. 11288–11293.

Kutik, S. *et al.* (2008) 'Dissecting Membrane Insertion of Mitochondrial β -Barrel Proteins', *Cell*, 132(6), pp. 1011–1024.

L

Liang, X. *et al.* (2015) 'Rapid and highly efficient mammalian cell engineering via Cas9 protein transfection', *Journal of Biotechnology*. Elsevier B.V., 208, pp. 44–53.

Lopez, M. F. *et al.* (2000) 'High-throughput profiling of the mitochondrial proteome using affinity fractionation and automation', *Electrophoresis*, 21(16), pp. 3427–3440.

M

Magalhães, P. J., Andreu, A. L. and Schon, E. A. (1998) 'Evidence for the presence of 5S rRNA in mammalian mitochondria.', *Molecular biology of the cell*, 9(9), pp. 2375–82.

Mai, N., Chrzanowska-Lightowlers, Z. M. A. and Lightowlers, R. N. (2017) 'The process of mammalian mitochondrial protein synthesis', *Cell and Tissue Research*. Cell and Tissue Research, 367(1), pp. 5–20.

Makarova, K. S. *et al.* (2006) 'A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action.', *Biology direct*, 1(1), p. 7.

Makarova, K. S. *et al.* (2015) 'An updated evolutionary classification of CRISPR–Cas systems', *Nature Reviews Microbiology*, 13(11), pp. 722–736.

Mali, P. *et al.* (2013) 'RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9 Prashant', *Science*, 339(6121), pp. 823–826.

Manfredi, G. *et al.* (2002) 'Rescue of a deficiency in ATP synthesis by transfer of MTATP6, a mitochondrial DNA-encoded gene, to the nucleus.', *Nature genetics*, 30(4), pp. 394–9.

- Martin, R. P. *et al.* (1979) 'Import of Nuclear Deoxyribonucleic Acid Coded Lysine-Accepting Transfer Ribonucleic Acid (Anticodon C-U-U) into Yeast Mitochondria', *Biochemistry*, 18(21), pp. 4600–4605.
- Mason, P. A. *et al.* (2003) 'Mismatch repair activity in mammalian mitochondria', *Nucleic Acids Research*, 31(3), pp. 1052–1058.
- Meagher, M. and Lightowlers, R. N. (2014) 'The role of TDP1 and APTX in mitochondrial DNA repair', *Biochimie*. Elsevier Masson SAS, 100(1), pp. 121–124.
- Michaud, M., Maréchal-Drouard, L. and Duchêne, A. M. (2014) 'Targeting of cytosolic mRNA to mitochondria: Naked RNA can bind to the mitochondrial surface', *Biochimie*. Elsevier Masson SAS, 100(1), pp. 159–166.
- Minczuk, M. *et al.* (2006) 'Sequence-specific modification of mitochondrial DNA using a chimeric zinc finger methylase.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(52), pp. 19689–94.
- Miralles Fuste, J. *et al.* (2014) 'In Vivo Occupancy of Mitochondrial Single-Stranded DNA Binding Protein Supports the Strand Displacement Mode of DNA Replication', *PLoS Genetics*, 10(12).
- Miyaki, M., Kazuko, Y. and Ono, T. (1977) 'Strand breaks of mammalian mitochondrial DNA induced by carcinogens', 17, pp. 321–329.
- Mojica, F. J. M. *et al.* (2005) 'Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements', *Journal of Molecular Evolution*, 60(2), pp. 174–182
- Mojica, F. J. M. *et al.* (2009) 'Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system', *Microbiology*, 155(3), pp. 733–740.
- Mojica, F. J. M., Juez, G. and Rodriguez-Valera, F. (1993) 'Transcription at different salinities of *Haloflex mediterranei* sequences adjacent to partially modified PstI sites', *Molecular Microbiology*, 9(3), pp. 613–621.
- Montoya, J. *et al.* (1982) 'Identification of initiation sites for heavy-strand and light-strand transcription in human mitochondrial DNA', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79(December), pp. 7195–7199.
- Montoya, J., Gaines, G. L. and Attardi, G. (1983) 'The pattern of transcription of the human mitochondrial rRNA genes reveals two overlapping transcription units', *Cell*, 34(1), pp. 151–159.
- Moretton, A. *et al.* (2017) 'Selective mitochondrial DNA degradation following double-strand breaks', *PLoS ONE*, 12(4), pp. 1–17.

N

- Nagley, P. *et al.* (1988) 'Assembly of functional proton-translocating ATPase complex in yeast

mitochondria with cytoplasmically synthesized subunit 8, a polypeptide normally encoded within the organelle.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(7), pp. 2091–5.

Narendra, D. P. *et al.* (2010) 'PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin', *PLoS Biology*, 8(1).

Nass, S. and Nass, M. (1963) 'An electron histochemical study of mitochondrial fibrous inclusions', 81(March), pp. 209–213.

Nelles, D. A. *et al.* (2016) 'Programmable RNA Tracking in Live Cells with CRISPR/Cas9', *Cell*. Elsevier Inc., 165(2), pp. 488–496.

Nicholls, T. J. and Minczuk, M. (2014) 'In D-loop: 40 years of mitochondrial 7S DNA', *Experimental Gerontology*. Elsevier Inc., 56(July), pp. 175–181.

Niemann, M. *et al.* (2017) 'tRNAs and proteins use the same import channel for translocation across the mitochondrial outer membrane of trypanosomes', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, p. 201711430.

Nishimasu, H. *et al.* (2014) 'Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA', *Cell*. Elsevier Inc., 156(5), pp. 935–949.

O

O'Connell, M. R. *et al.* (2014) 'Programmable RNA recognition and cleavage by CRISPR/Cas9', *Nature*. Nature Publishing Group, 516(7530), pp. 263–266.

Ojala, D., Montoya, J. and Attardi, G. (1981) 'tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria', *Nature*, 290(5806), pp. 470–474.

P

PALADE, G. E. (1953) 'Study structure m.d.', *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 1(22), pp. 188–211.

Palmieri, F. and Pierri, C. L. (2010) 'Mitochondrial metabolite transport', *Essays In Biochemistry*, 47, pp. 37–52.

Perales-Clemente, E. *et al.* (2011) 'Allotopic expression of mitochondrial-encoded genes in mammals: Achieved goal, undemonstrated mechanism or impossible task?', *Nucleic Acids Research*, 39(1), pp. 225–234.

Pohjoismäki, J. L. O. *et al.* (2006) 'Alterations to the expression level of mitochondrial transcription factor A, TFAM, modify the mode of mitochondrial DNA replication in cultured human cells', *Nucleic Acids Research*, 34(20), pp. 5815–5828.

Porcelli, A. M. *et al.* (2005) 'pH difference across the outer mitochondrial membrane measured

with a green fluorescent protein mutant', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 326(4), pp. 799–804.

Pourcel, C., Salvignol, G. and Vergnaud, G. (2005) 'CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies', *Microbiology*, 151(3), pp. 653–663.

Puranam, R. S. and Attardi, G. (2001) 'The RNase P associated with HeLa cell mitochondria contains an essential RNA component identical in sequence to that of the nuclear RNase P.', *Molecular and cellular biology*, 21(2), pp. 548–61.

R

Reddy, P. *et al.* (2015) 'Selective elimination of mitochondrial mutations in the germline by genome editing', *Cell*. Elsevier Inc., 161(3), pp. 459–469.

Rich, P. (2003) 'Chemiosmotic coupling: The cost of living', *Nature*, 421(6923), pp. 583–583.

Rich, P. R. and Maréchal, A. (2010) 'The mitochondrial respiratory chain', *Essays In Biochemistry*, 47, pp. 1–23.

Rinehart, J. *et al.* (2005) '*Saccharomyces cerevisiae* imports the cytosolic pathway for Glu-tRNA synthesis into the mitochondrion', *Genes and Development*, 19(5), pp. 583–592.

Robberson, D. L. and Clayton, D. A. (1972) 'Replication of mitochondrial DNA in mouse L cells and their thymidine kinase - derivatives: displacement replication on a covalently-closed circular template.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 69(12), pp. 3810–4.

Rorbach, J. *et al.* (2016) 'Human mitochondrial ribosomes can switch their structural RNA composition', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(43), pp. 12198–12201.

Rossmannith, W. *et al.* (1995) 'Human mitochondrial tRNA processing', *Journal of Biological ...*, pp. 12885–12891.

Rossmannith, W. and Karwan, R. M. (1998) 'Characterization of Human Mitochondrial RNase P: Novel Aspects in tRNA Processing', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 247(2), pp. 234–241.

Rubio, M. A. *et al.* (2008) 'Mammalian mitochondria have the innate ability to import {tRNAs} by a mechanism distinct from protein import.', *Proc. Natl. Acad. Sci. {U.S.A.}*, 105(27), pp. 9186–9191.

S

Saitoh, T. *et al.* (2007) 'Tom20 recognizes mitochondrial presequences through dynamic equilibrium among multiple bound states.', *The EMBO journal*, 26(22), pp. 4777–4787.

- Salinas-Giegé, T., Giegé, R. and Giegé, P. (2015) 'tRNA biology in mitochondria', *International Journal of Molecular Sciences*, 16(3), pp. 4518–4559.
- Salinas, T. *et al.* (2006) 'The voltage-dependent anion channel, a major component of the tRNA import machinery in plant mitochondria.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(48), pp. 18362–7.
- Sander, J. D. and Joung, J. K. (2014) 'CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes', *Nature Biotechnology*. Nature Publishing Group, 32(4), pp. 347–355.
- Santra, S. *et al.* (2004) 'Ketogenic treatment reduces deleted mitochondrial DNAs in cultured human cells', *Annals of Neurology*, 56(5), pp. 662–669.
- SATO, M. (1991) 'Organization of multiple nucleoids and DNA molecules in mitochondria of a human cell', *Experimental Cell Research*, 196(1), pp. 137–140.
- Sazanov, L. A. (2007) 'Respiratory complex I: Mechanistic and structural insights provided by the crystal structure of the hydrophilic domain', *Biochemistry*, 46(9), pp. 2275–2288.
- Schneider, A. (2011) 'Mitochondrial tRNA Import and Its Consequences for Mitochondrial Translation', *Annual Review of Biochemistry*, 80(1), pp. 1033–1053.
- Schon, E. A., DiMauro, S. and Hirano, M. (2012) 'Human mitochondrial DNA: roles of inherited and somatic mutations', *Nature Reviews Genetics*. Nature Publishing Group, 13(12), pp. 878–890.
- Shokolenko, I. *et al.* (2009) 'Oxidative stress induces degradation of mitochondrial DNA', *Nucleic Acids Research*, 37(8), pp. 2539–2548.
- Simpson, L. and Shaw, J. (1989) 'RNA editing and the mitochondrial cryptogenes of kinetoplastid protozoa', *Cell*, 57(3), pp. 355–366.
- Sjostrand, F. S. (1953) 'Electron Microscopy of Mitochondria and Cytoplasmic Double Membranes', *Nature*, 171, pp. 30–31
- Smirnov, A. *et al.* (2010) 'Mitochondrial enzyme rhodanese is essential for 5 S ribosomal RNA import into human mitochondria', *Journal of Biological Chemistry*, 285(40), pp. 30792–30803.
- Smirnov, A. *et al.* (2011) 'Biological significance of 5s rRNA import into human mitochondria: Role of ribosomal protein MRP-L18', *Genes and Development*, 25(12), pp. 1289–1305.
- Smirnov, A. V *et al.* (2008) 'Specific features of 5S rRNA structure - its interactions with macromolecules and possible functions.', *Biochemistry. Biokhimiia*, 73(13), pp. 1418–1437.
- Sobek, S. and Boege, F. (2014) 'DNA topoisomerases in mtDNA maintenance and ageing', *Experimental Gerontology*. The Authors, 56, pp. 135–141.
- Sorensen, P. D. and Frederiksen, S. (1991) 'Characterization of human 5S rRNA genes', *Nucleic Acids Res.*, 19(15), pp. 4147–4151. doi: 10.1093/nar/19.15.4147.

Srivastava, S. and Moraes, C. T. (2001) 'Manipulating mitochondrial DNA heteroplasmy by a mitochondrially targeted restriction endonuclease.', *Human molecular genetics*, 10(26), pp. 3093–3099. doi: 10.1093/hmg/10.26.3093.

Srivastava, S. and Moraes, C. T. (2005) 'Double-strand breaks of mouse muscle mtDNA promote large deletions similar to multiple mtDNA deletions in humans', *Human Molecular Genetics*, 14(7), pp. 893–902. doi: 10.1093/hmg/ddi082.

Sternberg, S. H. *et al.* (2014) 'HHS Public Access', 507(7490), pp. 62–67. doi: 10.1038/nature13011.DNA.

Suyama, Y. (1967) 'The Origins of Mitochondrial Ribonucleic Acids in *Tetrahymena pyriformis*', *Biochemistry*, 6(9), pp. 2829–2839. doi: 10.1021/bi00861a025.

Szczelkun, M. D. *et al.* (2014) 'Direct observation of R-loop formation by single RNA-guided Cas9 and Cascade effector complexes', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(27), pp. 9798–9803. doi: 10.1073/pnas.1402597111.

T

Tadi, S. K. *et al.* (2016) 'Microhomology-mediated end joining is the principal mediator of double-strand break repair during mitochondrial DNA lesions', *Molecular Biology of the Cell*, 27(2), pp. 223–235. doi: 10.1091/mbc.E15-05-0260.

Tanaka, M. *et al.* (2002) 'Gene Therapy for Mitochondrial Disease by Delivering Restriction Endonuclease Sma I into Mitochondria Gene Therapy for Mitochondrial Disease by Delivering Restriction Endonuclease Sma I into Mitochondria', *Journal of Biomedical Science*, 9, pp. 534–541. doi: 10.1007/BF02254980.

Tarassov, I., Entelis, N. and Martin, R. P. (1995) 'An intact protein translocating machinery is required for mitochondrial import of a yeast cytoplasmic tRNA.', *Journal of molecular biology*, 245, pp. 315–323. doi: 10.1006/jmbi.1994.0026.

Taylor, R. W. *et al.* (1997) 'Selective inhibition of mutant human mitochondrial DNA replication in vitro by peptide nucleic acids.', *Nature genetics*, 15(2), pp. 212–215. doi: 10.1038/ng0297-212.

Terzioglu, M. *et al.* (2013) 'MTERF1 Binds mtDNA to prevent transcriptional interference at the light-strand promoter but is dispensable for rRNA gene transcription regulation', *Cell Metabolism*, 17(4), pp. 618–626. doi: 10.1016/j.cmet.2013.03.006.

Thorslund, T. *et al.* (2002) 'Repair of 8-oxoG is slower in endogenous nuclear genes than in mitochondrial DNA and is without strand bias', *DNA Repair*, 1(4), pp. 261–273. doi: 10.1016/S1568-7864(02)00003-4.

Tiranti, V. *et al.* (1997) 'Identification of the gene encoding the human mitochondrial RNA polymerase (h-mtRPOL) by cyberscreening of the Expressed Sequence Tags database.', *Human molecular genetics*, 6(4), pp. 615–25.

Tomecki, R. *et al.* (2004) 'Identification of a novel human nuclear-encoded mitochondrial poly(A) polymerase', *Nucleic Acids Research*, 32(20), pp. 6001–6014.

Tonin, Y. *et al.* (2014) 'Modeling of antigenomic therapy of mitochondrial diseases by mitochondrially addressed RNA targeting a pathogenic point mutation in mitochondrial DNA', *Journal of Biological Chemistry*, 289(19), pp. 13323–13334.

Torres, R. *et al.* (2014) 'Engineering human tumour-associated chromosomal translocations with the RNA-guided CRISPR–Cas9 system', *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 5, pp. 1–8.

Tuppen, H. A. L. *et al.* (2010) 'Mitochondrial DNA mutations and human disease.', *Biochimica et biophysica acta*, pp. 113–28.

V

Vögtle, F. N. *et al.* (2009) 'Global Analysis of the Mitochondrial N-Proteome Identifies a Processing Peptidase Critical for Protein Stability', *Cell*, 139(2), pp. 428–439.

W

Wai, T., Teoli, D. and Shoubridge, E. A. (2008) 'The mitochondrial DNA genetic bottleneck results from replication of a subpopulation of genomes', *Nature Genetics*, 40(12), pp. 1484–1488.

Walberg, M. W. and Clayton, D. A. (1981) 'Sequence and properties of the human KB cell and mouse L cell D-loop regions of mitochondrial DNA', *Nucleic Acids Research*, 9(20), pp. 5411–5421.

Wallace, D. C. and Chalkia, D. (2013) 'Mitochondrial DNA genetics and the heteroplasmy conundrum in evolution and disease.', *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(11), pp. 1–47.

Wan, X. *et al.*, (2016) 'Efficacy and safety of rAAV2-ND4 treatment for Leber's Hereditary Optic Neuropathy', *Scientific Reports*, 6, 21587.

Wang, G. *et al.* (2010) 'PNPASE Regulates RNA Import into Mitochondria', 142(3), pp. 456–467.

Wanrooij, S. *et al.* (2007) 'Expression of catalytic mutants of the mtDNA helicase Twinkle and polymerase POLG causes distinct replication stalling phenotypes', *Nucleic Acids Research*, 35(10), pp. 3238–3251.

Wanrooij, S. *et al.* (2008) 'Human mitochondrial RNA polymerase primes lagging-strand DNA synthesis in vitro', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(32), pp. 11122–11127.

Wanrooij, S. and Falkenberg, M. (2010) 'The human mitochondrial replication fork in health and disease', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. Elsevier B.V., 1797(8), pp. 1378–1388.

Westermann, B. (2010) 'Mitochondrial fusion and fission in cell life and death', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group, 11(12), pp. 872–884.

Westra, E. R., Buckling, A. and Fineran, P. C. (2014) 'CRISPR–Cas systems: beyond adaptive immunity', *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group, 12(5), pp. 317–326.

Wilkins, H. M., Carl, S. M. and Swerdlow, R. H. (2014) 'Cytoplasmic hybrid (cybrid) cell lines as a practical model for mitochondriopathies', *Redox Biology*. Elsevier Ltd., 2(1), pp. 619–631.

Y

Yakubovskaya, E. *et al.* (2006) 'Functional human mitochondrial DNA polymerase γ forms a heterotrimer', *Journal of Biological Chemistry*, 281(1), pp. 374–382.

Yang, C. *et al.* (1997) 'Crystal structure of human mitochondrial single-stranded DNA binding protein at 2.4 Å resolution.', *Nature structural & molecular biology*, 4, pp. 153–157.

Yang, M. Y. *et al.* (2002) 'Biased incorporation of ribonucleotides on the mitochondrial L-strand accounts for apparent strand-asymmetric DNA replication', *Cell*, 111(4), pp. 495–505.

Yasukawa, T. *et al.* (2006) 'Replication of vertebrate mitochondrial DNA entails transient ribonucleotide incorporation throughout the lagging strand', *The EMBO Journal*, 25(22), pp. 5358–5371.

Yogev, O., Karniely, S. and Pines, O. (2007) 'Translation-coupled translocation of yeast fumarase into mitochondria in vivo', *Journal of Biological Chemistry*, 282(40), pp. 29222–29229.

Yoshionari, S. *et al.* (1994) 'Existence of nuclear-encoded 5S-rRNA in bovine mitochondria', *FEBS Letters*, 338(2), pp. 137–142.

Z

Zhang, J. *et al.* (2016) 'First live birth using human oocytes reconstituted by spindle nuclear transfer for mitochondrial DNA mutation causing Leigh syndrome', *Fertility and Sterility*. Elsevier, 106(3), pp. e375–e376.

Zhou, Q. *et al.* (2016) 'Mitochondrial endonuclease G mediates breakdown of paternal mitochondria upon fertilization', *Science*, 353(6297), pp. 394–399.

Annexes

Article

Stable expression of anti-replicative recombinant 5S rRNA molecules modulates the mtDNA heteroplasmy in a glucose-dependent manner.

(Article en cours de soumission)

Romuald Loutre ¹, Anne-Marie Heckel ¹, Damien Jeandard ¹, Ivan Tarassov ¹ and Nina Entelis ^{1,*}

¹ UMR 7156 Génétique Moléculaire, Génomique, Microbiologie (GMGM), Strasbourg University-CNRS, Strasbourg 67084, France

* Correspondence: n.entelis@unistra.fr; Tel.: +33-3-68-85-14-60

Article

Stable expression of anti-replicative recombinant 5S rRNA molecules modulates the mtDNA heteroplasmy in a glucose-dependent manner.

Romuald Loutre ¹, Anne-Marie Heckel ¹, Damien Jeandard ¹, Ivan Tarassov ¹ and Nina Entelis ^{1,*}

¹ UMR 7156 Génétique Moléculaire, Génomique, Microbiologie (GMGM), Strasbourg University-CNRS, Strasbourg 67084, France

* Correspondence: n.entelis@unistra.fr; Tel.: +33-3-68-85-14-60

Academic Editor: name

Received: date; Accepted: date; Published: date

Abstract: Mutations in mitochondrial DNA are an important source of severe and incurable human diseases. The vast majority of these mutations are *heteroplasmic*, meaning that mutant and wild-type genomes are present simultaneously in a same cell. Only a very high proportion of mutant mitochondrial DNA (heteroplasmy level) has pathological consequences. We previously demonstrated that targeting small RNAs able to specifically anneal with the mutant mitochondrial DNA into mitochondria led to a decrease of the heteroplasmy level by inhibiting mutant mtDNA replication, thus representing a potential therapy. So far, the efficiency of cellular expression and mitochondrial delivery of therapeutic RNAs was very low. In the current study, we increased the level of expression of the anti-replicative recombinant 5S rRNA targeting a large deletion in mitochondrial DNA which causes the KSS syndrome. For this, we created *transmitochondrial* cybrid cell line bearing a site for Flp-recombinase and used this system for the recombinase-mediated integration of genes coding for the anti-replicative recombinant 5S rRNAs. Several 5S rRNA versions were expressed at a high level and one of them produced a strong effect, reducing the heteroplasmy by more than 40%. Cells with decreased load of mutant mtDNA can be selected by use of carbohydrate-free media.

Keywords: Mitochondria; Mitochondrial disorders; Mitochondrial DNA mutations; Heteroplasmy; RNA mitochondrial import; 5S rRNA.

1. Introduction

Mitochondria are essential organelles of human cells because of their fundamental roles in several critical cellular processes including energy generation, iron-sulfur (Fe-S) clusters production, calcium homeostasis and apoptosis [1]. They contain their own genome, in multiple copies per cell, allowing the synthesis of 13 polypeptides which are all essential components of the mitochondrial respiratory chain in human cells. Mutations in this mitochondrial DNA (mtDNA) have been associated with a wide variety of human disorders ranging from optic atrophy, deafness, diabetes to peripheral neuropathy or myopathy [2]. Most of the pathogenic mutations in human mtDNA are heteroplasmic (i.e. coexistence of mutant and wild-type genomes in a same cell) and their phenotypic expression is intimately linked to the ratio between mutant mtDNA molecules and wild-type ones [3]. Biochemical defects and associated symptoms will only appear if this heteroplasmy level exceeds a given threshold generally comprised between 60% and 95% of mutant mtDNA. Thus, modulating the heteroplasmy levels appears to be a potential therapeutic approach.

In previous studies, we developed an anti-replicative strategy which consists in targeting mitochondria with small RNA molecules able to specifically anneal with mutant mtDNA and to interfere with its replication [4,5]. This strategy has been assayed on a human cybrid cell line bearing 60% of mtDNA affected by a large deletion (nucleotides 8363-15438) underlying a case of frequent

mitochondrial pathology, the Kearns Sayre Syndrome (KSS) [4]. To target these anti-replicative oligonucleotides into human mitochondria, we developed two types of RNA mitochondrial vectors: small RNA aptamers used for the transient transfection of human cells, and recombinant 5S rRNA which can be expressed in nucleus.

5S rRNA is a highly conserved and essential component of the large ribosomal subunit of all organisms, the only exceptions being mitochondrial ribosomes of yeast and mammals [6]. However, 5S rRNA seems to be the most abundantly imported RNA in mammalian mitochondria [7,8]. Our studies demonstrated that 5S rRNA import mechanism relies on protein factors identified as the mitochondrial enzyme rhodanese and the precursor of mitochondrial ribosomal protein MRP-L18 [9,10], interacting with two structural motifs located in the α and γ domains of 5S rRNA (Fig.1a), while a third motif corresponding to the distal part of the β domain and allowing the interaction with cytosolic ribosomal protein L5, may be either deleted or replaced without loss of import capacity [11]. This finding was exploited to demonstrate that 5S rRNA can function as a vector to deliver oligoribonucleotides into human mitochondria.

Our previous attempts to stably express 5S rRNA-based recombinant RNA (rec.5S rRNAs) in human cybrid cells resulted in a very weak expression level, estimated at 30 ± 5 molecules per cell, though it allowed a moderate heteroplasmy shift. Moreover, variation in the rec.5S rRNAs expression obtained in different clones of transfected cells led to diverse effects on the mitochondrial heteroplasmy level (no shifts were detected in 70% of clones) [4].

In the present study, we aimed to increase the expression level of anti-replicative rec.5S rRNAs in human cybrid cells in a stable manner, and to verify if this expression can decrease the proportion of mutant mtDNA.

2. Results

2.1 Design of recombinant 5S rRNA molecules

To use 5S rRNA as a mitochondrial vector targeting mtDNA molecules affected by the KSS deletion, the distal portion of the β -domain of 5S rRNA (Fig. 1a) was replaced by sequences corresponding to either H- or L-strand (standard annotation of two mtDNA strands, Heavy and Light ones) of the mtDNA at the junction of the KSS deletion boundaries [4]. Besides the previously tested rec.5S rRNA versions bearing the insertions corresponding to 13 nucleotides of the H-strand (5S-KSS-13H) or to 14 nucleotides of the L-strand (5S-KSS-14L), we designed two new versions bearing insertions of 15 nucleotides (5S-KSS-15H and 5S-KSS-15L) (Fig. 1b).

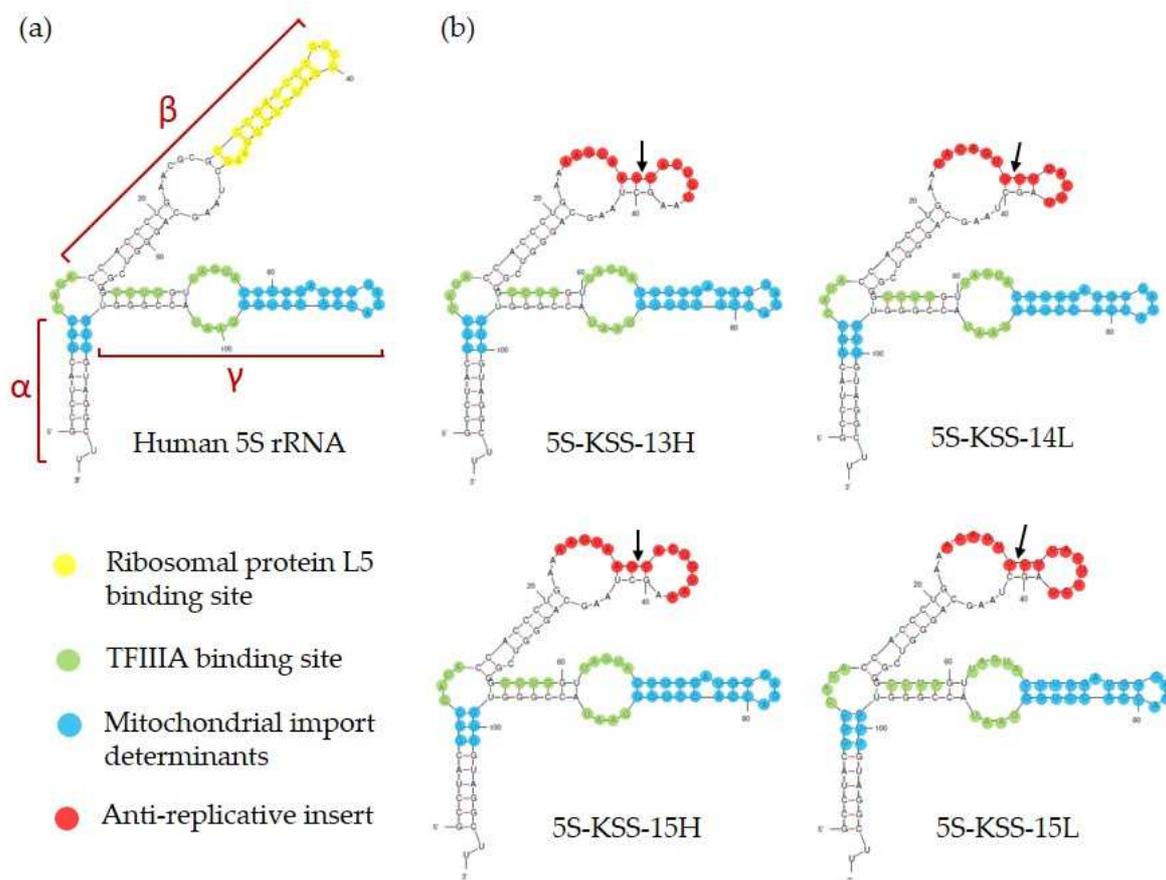


Figure 1. Secondary structure of human 5S rRNA (a) and 2D structure predictions for rec.5S rRNAs (b). Sequences of the anti-replicative insertions (shown in red) correspond to boundaries of the KSS deletion in mtDNA; arrows indicate the deletion point.

For all the rec.5S rRNAs, the secondary structure predictions have been thoroughly analyzed and we selected versions characterized by a classical 5S rRNA scaffold where the inserted sequences did not form base-pairing with other parts of the molecule, thus preserving regions of interaction with TFIIIA allowing nuclear export and structural determinants of mitochondrial import (Fig. 1b). *Cofold* analysis of the annealing between rec.5S rRNAs and the mutant mtDNA predicted that the length of the duplex region should be the same as the size of insertion for 5S-KSS-14L and 5S-KSS-15L versions (14 and 15 bp correspondingly), and slightly longer for 5S-KSS-13H and 5S-KSS-15H molecules (15 and 17 bp, Fig. 2). According to melting temperature predictions, T_m values are also different for rec.5S rRNAs targeting the L-strand of mtDNA (52.1°C and 56.6°C) and those targeting the H-strand (45.2°C and 48.9°C).

	Annealing to KSS mtDNA	Annealing to wild-type mtDNA (5' deletion boundary)	Annealing to wild-type mtDNA (3' deletion boundary)
5S-KSS-13H 8357-8362 15438-15444	15b ; T _m = 52,1°C 3'..UCGAAU <u>GUCACGAAUG</u> AAAAG..5' 5'..TCTTTACAGTGCTTACTTCTC..3'	8b ; T _m = 17,3°C 3'..UCGAAU <u>GUCACGAAUG</u> AAAAG..5' 5'..TCTTTACAGTGAAATGCCCC..3'	8b ; T _m = 27,3°C 3'..UCGAAU <u>GUCACGAAUG</u> AAAAG..5' 5'..ACGCCCTCGGGCTTACTTCTCT..3'
5S-KSS-15H 8355-8362 15438-15444	17b ; T _m = 56,6°C 3'..UCGAA <u>AAUGUCACGAAUG</u> AAAAG..5' 5'..CTCTTTACAGTGCTTACTTCT..3'	10b ; T _m = 31,7°C 3'..UCGAA <u>AAUGUCACGAAUG</u> AAAAG..5' 5'..CTCTTTACAGTGAAATGCCCC..3'	8b ; T _m = 27,3°C 3'..UCGAA <u>AAUGUCACGAAUG</u> AAAAG..5' 5'..AGACGCCCTCGGGCTTACTTCT..3'
5S-KSS-14L 8356-8362 15438-15444	14b ; T _m = 45,2°C 5'..GAAU <u>ACAGUGCUUACUU</u> AG..3' 3'..GAAATGTCACGAATGAAGA..5'	7b ; T _m = 15,6°C 5'..GAAU <u>ACAGUGCUUACUU</u> AGC..3' 3'..GAAATGTCACCTTTACGGGG..5'	8b ; T _m = 15,5°C 5'..GAAU <u>ACAGUGCUUACUU</u> AGC..3' 3'..TGCGGGAGCCGAATGAAGAG..5'
5S-KSS-15L 8357-8362 15438-15446	15b ; T _m = 48,9°C 5'..AA <u>ACAGUGCUUACUU</u> CUAG..3' 3'..AAATGTCACGAATGAAGAGA..5'	6b ; T _m = 9,0°C 5'..GAA <u>ACAGUGCUUACUU</u> AGC..3' 3'..AAATGTCACCTTTACGGGGTTG..5'	10b ; T _m = 27,6°C 5'..GAA <u>ACAGUGCUUACUU</u> AGC..3' 3'..CGGGAGCCGAATGAAGAGA..5'

Figure 2. Melting temperatures predicted by OligoAnalyzer 3.1 (IDT-DNA) for duplexes between rec.5S rRNAs (indicated at the left) and mutant or wild-type mtDNA regions (indicated above the panels). Upper part of each duplex corresponds to the anti-replicative insertion of rec.5S rRNAs (in yellow, nucleotides complementary to the 5' boundary of the KSS deletion, in green, nucleotides complementary to the 3' deletion boundary). 5S-KSS-13H and 5S-KSS-15H anneal to the L-strand of mtDNA while 5S-KSS-14L and 5S-KSS-15L anneal to the H-strand.

Annealing of rec.5S rRNAs to wild-type mtDNA should be negligible at 37°C. This has been directly demonstrated by *in vitro* hybridizations of labeled rec.5S rRNAs with mutant mtDNA fragments, but not with wild type ones, under physiological conditions (Fig. S1).

2.2 Stable expression of rec.5S rRNA in human cybrid cells

Attempting to obtain an increased level of the stable expression of selected rec.5S rRNAs in human cybrid cells, we used the Flp recombinase-mediated integration of a gene of interest into specific genomic location by Flp-InTM T-RexTM Core system (Invitrogen). To check the impact of rec.5S rRNA stable expression on the heteroplasmy level, we first had to introduce the FRT site into nuclear genome of the KSS cybrid cell line. These cells, obtained by the fusion of the patient's cytoplasts with nuclei of immortalized osteosarcoma cells, contain a heteroplasmic population of mutant and wild type mtDNA molecules and were characterized by a small decrease of oxygen consumption and an increased fragility face to transfection procedures [4]. Thus, due to a high mortality of KSS cybrid cells, only three Zeocin-resistant clones were obtained after transfection with the pFRT/*lacZeo* plasmid. These clones were characterized by similar growth rates and by a single integrated FRT site, as determined by Southern blot hybridization (Fig. S2).

Because integration of the pFRT/*lacZeo* plasmid into the genome occurs randomly, expression levels of the *lacZ*-Zeocin fusion gene will be dependent on the transcriptional activity of the surrounding sequences at the integration site. Thus, Zeocin-resistant clones were screened for β -galactosidase activity levels. For all of them, specific β -gal activities were 4 to 8-fold lower compared to the commercial HEK 293 T-RexTM Flp-InTM cells (Table S2). Clone 5, selected for further experiments (referred to as FRT-KSS cell line), was characterized by the highest β -gal activity and by 51±5% KSS heteroplasmy level.

Genes of rec.5S rRNA versions with natural flanking regions were cloned into pcDNATM5/FRT/TO vector and then integrated into FRT site of the nuclear genome of FRT-KSS cybrid cell line. Expression levels of rec.5S rRNAs have been assayed by semi-quantitative RT-PCR using corresponding T7-transcripts to create a calibration curve (Fig. 3). In a first experiment, two cell lines, 5S-KSS-13H(1) and 5S-KSS-14L(1), have been created and characterized by rather high rec.5S rRNAs expression levels, about 2,000 molecules per cell. Unfortunately, further attempts to obtain FRT-KSS cell lines expressing all the four rec.5S rRNA versions resulted in 10-fold lower expression for three rec.5S rRNA molecules

(200-300 molecules/cell for lines 5S-KSS-13H(2), 5S-KSS-14L(2) and 5S-KSS-15L) and a 1,300 molecules/cell level for 5S-KSS-15H (Table 1). Despite this variability, we still obtained improved rec.5S rRNA expression levels compared to those detected previously following a random integration of rec.5S rRNA genes and estimated at 30 ± 5 molecules per cell.

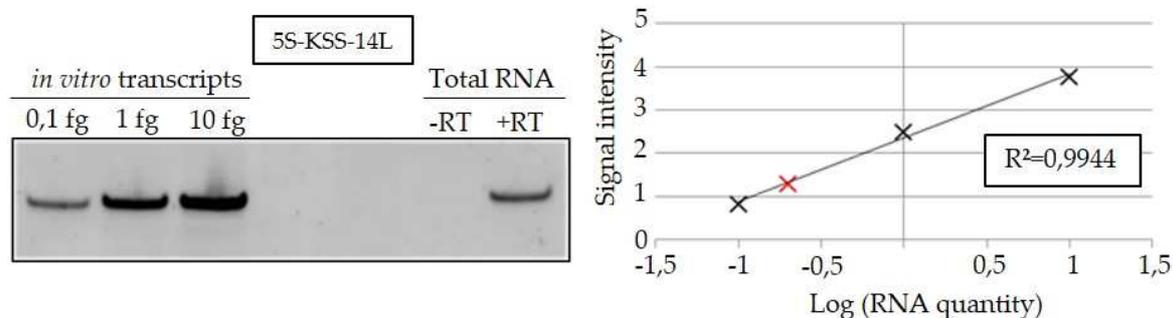


Figure 3. Quantification of 5S-KSS-14L RNA expression by semi-quantitative RT-PCR. On the left, PAGE analysis of the RT-PCR reactions performed on the total cellular RNA or known amounts of purified T7-transcripts, as indicated above the panel. On the right, an example of the calibration curve used for quantification of 5S-KSS-14L RNA (in red) in cybrid cell line.

Rec.5S rRNA expressing cell line	Number of rec.5S rRNA/cell
5S-KSS-13H(1)	2000
5S-KSS-13H(2)	200
5S-KSS-14L(1)	2000
5S-KSS-14L(2)	300
5S-KSS-15H	1300
5S-KSS-15L	215

Table 1. Amounts of anti-replicative molecules in rec.5S rRNA expressing cell lines.

2.3 Shift of the heteroplasmy levels in transgenic cell lines

To check if the increased expression of rec.5S rRNA molecules can induce a mtDNA heteroplasmy shift in the human cybrid cells, we cultivated FRT-KSS cell lines for 6-9 weeks and measured the mutant mtDNA load by real-time qPCR as described previously [4]. First, we compared the KSS heteroplasmy levels in the transgene and control cell lines after cultivation in a glucose-rich medium, but failed to detect any significant shift of the proportion between mutant and wild-type mtDNA molecules (Fig. 4, "glucose-rich").

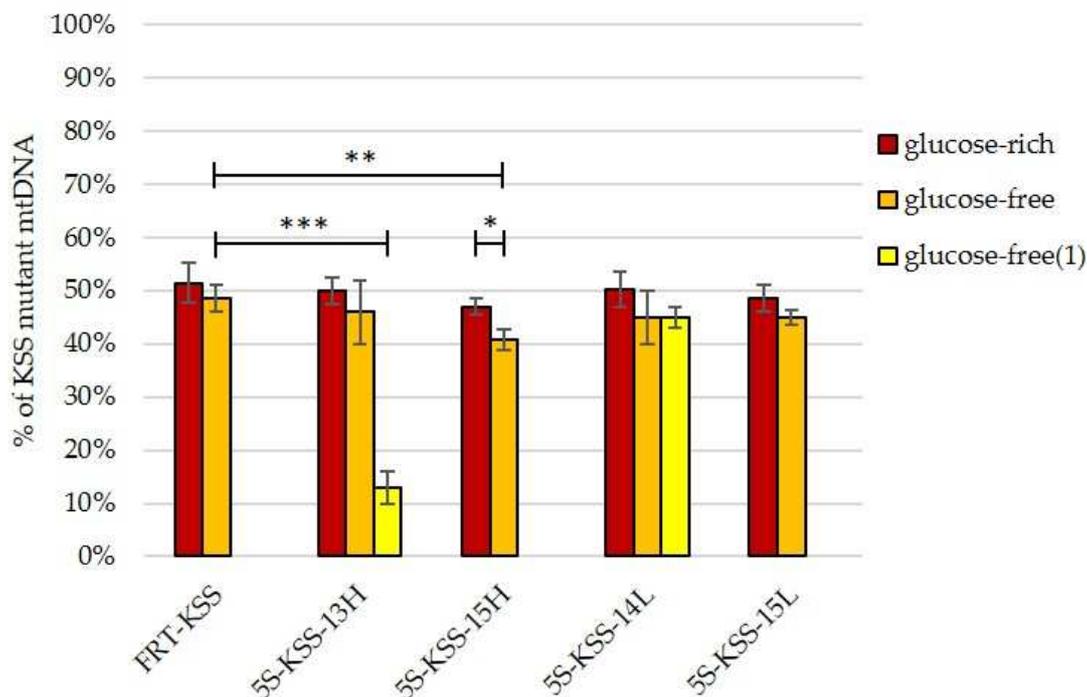


Figure 4. Effect of rec.5S rRNA expression on the heteroplasmy level of KSS cybrids cells after cultivation in glucose-rich or glucose-free media. “glucose-free(1)” correspond to cybrid cell lines “5S-KSS-13H(1)” and “5S-KSS-14L(1)” cultivated in the glucose-free medium. Standard deviations are calculated from independent qPCR measurements ($3 \leq n \leq 7$). Statistical differences were determined with a two-tailed Student’s *t*-test (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$).

Next, we aimed to create a selective advantage for cells with decreased heteroplasmy levels and therefore improved respiration capacity. For this, we cultivated transgenic cells in a carbohydrate-free medium. In these conditions, only pyruvate and amino acids are available as energy sources and cells then should rely on mitochondrial oxidative phosphorylation to produce ATP.

Cybrid cells FRT-KSS were able to grow in a medium without addition of glucose and demonstrated very low heteroplasmy variations after 6 weeks of culture. Expression of the rec.5S rRNA versions 5S-KSS-14L and 5S-KSS-15L designed to target the H-strand of mtDNA, had no significant impact on the heteroplasmy. In contrast, a stable decrease of the KSS heteroplasmy level have been detected for cells expressing 5S-KSS-13H and 5S-KSS-15H versions targeting the L-strand of the mutant mtDNA. In 5S-KSS-15H cells, the heteroplasmy level has shifted from $51 \pm 4\%$ to $41 \pm 2\%$, which represents a rather small but significant change (P -value < 0.01) (Fig.4, “glucose-free”). Moreover, in the cell line characterized by a high level of a rec.5S rRNA expression, namely 5S-KSS-13H(1), the proportion of the mutant mitochondrial genomes has been decreased in a dramatic manner till $13 \pm 3\%$ (Fig. 4, “glucose-free(1)”). This level was thereafter stable during cell cultivation in glucose-rich and glucose-free media. Noteworthy, expression of 200 copies of the same RNA in cell line 5S-KSS-13H(2) didn’t induce a significant heteroplasmy change.

Obtained new data indicate that the impact of anti-replicative rec.5S rRNA molecules on the mutant mtDNA load is strongly dependent on the amount of rec.5S rRNA molecules. More than 1000 molecules per cell seem to be necessary to affect the mutant mtDNA replication and thus change the proportion between mutant and wild-type mitochondrial genomes. Nevertheless, 5S-KSS-14L and 5S-KSS-15L versions could not shift the heteroplasmy level even in the cell line 5S-KSS-14L(1) where the transgene expression was comparable with those in 5S-KSS-13H(1) cell line (Fig. 4, Table 1).

3. Discussion

3.1 5S rRNA as a mitochondrial RNA vector

Natural pathway of small non-coding RNA trafficking into mitochondria has been described in phylogenetic groups as diverse as protozoan, plants, fungi and animals [12-14]. Small 5S ribosomal RNA is one of the most abundant cytosolic RNA imported into mitochondria. It has been described that 5S rRNAs are expressed from large nuclear gene arrays (100–200 genes) and that a small portion (about 1-5%) of its cellular pool can readily be found within mitochondria in different organisms, from flies to humans [7,8,15]. The mitochondrial function of this rRNA is not clear. Cryo-electronic microscopy analysis recently demonstrated that the mitochondrial ribosomes of pig liver and human cultured cells do not contain 5S rRNA, but its place in the central protuberance of the large ribosomal subunit is occupied by mitochondrial tRNA^{Phe} or tRNA^{Val} correspondingly [16,17].

We aimed to use this small imported RNA molecule as a vector to address into human mitochondria anti-replicative oligonucleotides with a therapeutic potential. In contrast to small artificial anti-replicative RNAs used previously for the transient transfection of human cells [5,18], recombinant molecules based on 5S rRNA structure can be expressed in cells in a stable manner due to the internal promoter region recognized by RNA Polymerase III, then be processed, exported from the nucleus and imported into mitochondria [4,11]. Nevertheless, we should take into account the discrepancy between 100-200 copies of wild-type 5S rRNA gene and one gene of rec.5S rRNA per genome, which creates a competition between 5S rRNA molecules for the transcription, maturation and export protein factors. In our previous study, the plasmids containing rec.5S rRNA genes were introduced into genome of human cybrid cells in a random manner. This approach allowed a low expression of rec.5S rRNA, variable in different clones, but still sufficient for a shift in mutant mtDNA proportion in few selected cell lines [4].

In the present study, we used the Flp recombinase-mediated integration of a gene of interest into specific genomic location. This approach allowed a significant improvement of rec.5S rRNAs expression. Nevertheless, a significant heteroplasmy shift has been detected only in cells bearing one version of rec.5S rRNA genes, namely 5S-KSS-13H, expressed at the level of 2,000 molecules per cell. Lower expression of the same molecule did not affect mutant mtDNA load, indicating on an anti-replicative RNA concentration threshold. Surprisingly, 5S-KSS-15H version, which differs by 2 bp longer duplex predicted with mutant mtDNA, provided only a small heteroplasmy decrease (Fig. 3). This can be explained by a slightly lower expression of this RNA. Another difference between these constructs consists in direct orientation of 5S-KSS-15H gene in respect to CMV promoter in the pcDNATM5/FRT/TO cloning vector, in contrast with the inverse orientation of 5S-KSS-13H gene. Thus, the 5S-KSS-15H expression can be over-estimated by RT-PCR due to possible synthesis of a longer transcript from external CMV promoter. These considerations should be taken into account in the further studies aiming to increase the expression of anti-replicative RNA molecules in a more reproducible way by using constructs bearing only promoters for RNA-polymerase III.

Expression of two other rec.5S rRNA versions 5S-KSS-14L and 5S-KSS-15L designed to target the H-strand of mtDNA, had no significant impact on the KSS heteroplasmy level. This can be related to asymmetric strand-displacement mechanism of human mtDNA replication, supposing that at the first step, only L-strand is used as a template for DNA synthesis [19], therefore, its targeting by anti-replicative RNAs 5S-KSS-13H and 5S-KSS-15H should be more efficient compared to the H-strand targeting RNAs. One should also take into account that melting temperatures predicted for rec.5S rRNA-mtDNA duplexes are lower for 5S-KSS-14L and 5S-KSS-15L versions (45.2°C and 48.9°C) compared to 5S-KSS-13H and 5S-KSS-15H ones (52.1°C and 56.6°C, Fig. 2). This can also explain poor anti-replicative abilities of 5S-KSS-L versions.

Noteworthy, shifts in mutant mtDNA proportion have been detected only for cells cultivated in a medium poor in glucose.

3.2 Selective conditions improved the anti-replicative RNA effect

Warburg and Crabtree effects describe the ability of rapidly proliferating cells to favor glycolysis. Recent studies suggest that cells can adapt to mitochondrial dysfunction by switching to glycolysis, despite aerobic conditions [20]. Development of *transmitochondrial* cybrids by fusion of enucleated somatic cells harboring pathological mtDNA mutations with a cell line depleted of their mtDNA has enabled the study of consequences of mtDNA mutations [21,22]. However, cybrid cells cultured in media with high concentrations of glucose tend to acquire highly glycolytic phenotypes, which make them less suitable as models for studying mitochondrial dysfunction.

Attempts have been made to overcome this phenomenon, by substituting glucose with galactose, which does not support anaerobic glycolysis [23]. This is usually explained by the fact that galactose cannot be oxidized to pyruvate without prior conversion to glucose, which consumes two molecules of ATP, thus making anaerobic glycolysis useless as a source of energy [24]. Nevertheless, some cell lines cannot utilize galactose, but can grow in a carbohydrate-free media, apparently relying on the metabolism of pyruvate and amino acids, thus galactose-containing media can be replaced by carbohydrate-free ones. It was demonstrated that the activity of all respiratory chain complexes tended to be higher in the glucose-starved cells [25], since they are forced to rely on mitochondrial oxidative phosphorylation to meet their energy requirements.

Previously, only few studies addressed the question of metabolically induced mtDNA heteroplasmy shifting. The ketogenic medium has been shown to shift the heteroplasmy level of cybrid cells towards the wild type [26]. Another report demonstrated that the apparently homoplasmic 100% MELAS cybrid cells kept in low-glucose medium have shifted their heteroplasmy level to 90% [27]. These data are in accordance with the hypothesis that culturing mutant cells in a low-glucose medium forcing the cells to use oxidative phosphorylation would create a selective advantage for cells with improved respiration capacities.

In the present study, we attempted to induce the heteroplasmy shift by stable expression of anti-replicative 5S rRNA molecules capable to slow the mutant mtDNA replication and thus decreasing proportion between mutant and wild type mtDNA molecules. This process cannot occur with the same efficiency in all the cell population. Therefore, applying the selective conditions favorable for the cells where the mutant mtDNA proportion has been successfully decreased, allowed detection of the change in heteroplasmy load for cybrid cells bearing a large deletion in mtDNA.

In conclusion, our new data demonstrate that expression of anti-replicative molecules based on 5S rRNA structure in human cybrid cells can induce a stable shift in a heteroplasmy level of pathogenic mutations in mtDNA. This shift can be modulated by cell growth conditions, thus opening possibility to improve models of gene therapy exploiting the anti-replicative strategy.

4. Materials and Methods

4.1 Human cell lines and culture conditions

Human *transmitochondrial* cybrid cells containing approximately 65%±2% of mtDNA molecules affected by KSS deletion (nucleotides 8363-15438) [4] were cultivated in DMEM medium (Sigma) containing 4.5 g/L glucose, 0.584 g/L L-glutamine and supplemented with 3.7 g/L sodium bicarbonate for glucose-rich conditions or in DMEM base (Sigma) supplemented with 3.7 g/L sodium bicarbonate, 0.584 g/L L-glutamine and 108 mg/L sodium pyruvate for glucose-free conditions. Cybrid cells transfected with pFRT/*lacZeo* were cultivated in media containing 100 µg/mL Zeocin (Invitrogen). Cells transfected with pcDNATM5/FRT/TO are cultivated in media supplemented with 150µg/mL Hygromycin B-Gold (InvivoGen).

4.2 Design and selection of recombinant 5S rRNA molecules

Secondary structures of rec.5S rRNA were predicted using the “Mfold” program [28] and corrected in accordance with data on human 5S rRNA structure [29]. Analysis of the annealing between rec.5S rRNAs and the mtDNA was performed by *RNAcofold web server*, University of Vienna. To estimate melting temperatures for RNA-DNA duplexes, we used IDT Sci-Tools OligoAnalyzer 3.1 software [30].

4.3 Rec.5S rRNA synthesis and in vitro hybridization

Rec.5S rRNAs were obtained by T7 transcription using the T7 RiboMAX Express Large-Scale RNA Production System (Promega) and gel-purified. To create PCR templates, we used a two-step protocol: PCR1 was performed on a plasmid bearing the human 5S rRNA sequence under the control of the T7 promoter [11] using forward primer n°1 and reverse primers n°2 to 5 (Supplementary Table S1). Resulting PCR1 product was used as forward primer for PCR2 performed on the same plasmid template with reverse primer n°6 creating a DNA fragment containing rec.5S RNA sequence under the control of the T7 promoter. Plasmid or PCR fragment were cleaved by BglIII (Fast Digest, ThermoScientific) to assure formation of the exact 5S rRNA 3' end.

To test specific rec.5S RNA annealing with target mtDNA, wild-type or mutant mtDNA fragments (nucleotides 15,251–15,680 of wild-type mtDNA or 8,099–8,365/15,438–15,680 of mutant mtDNA) were amplified as described previously [4] using primers n°7 and 8 or n°8 and 9 respectively, separated on 1% agarose gel, blotted to Amersham Hybond-N membrane (GE Healthcare) and hybridized with ³²P-labeled recombinant RNA in 1X PBS at 37 °C. Hybridization signals were revealed by phosphorimaging in Typhoon Trio (GE Healthcare).

4.4 Production of a human transmitochondrial cybrid cell line bearing FRT site

To generate a KSS cybrid cell line bearing an FRT site, we used the Flp-In™ T-Rex™ Core system (Invitrogen). Cybrid cells were transfected with the pFRT/*lacZeo* plasmid according to the manufacturer's protocol, and Zeocin-resistant clones were isolated.

To determine the number of FRT sites in each zeocin-resistant clone, genomic DNA was extracted, digested with HindIII (ThermoScientific), separated on a 1% agarose gel and blotted to Amersham Hybond-N membrane (GE Healthcare). To detect FRT sites, a fragment of the *lacZ* gene was amplified according to the manufacturer's protocol (Invitrogen) and ³²P-labelled using Prime-a-gene Labelling System (Promega). After hybridization at 65°C and washing, signals were revealed by phosphorimaging in Typhon Trio (GE Healthcare).

Specific β-galactosidase activity in cellular lysate were determined for each clone by use of the β-gal assay kit (Invitrogen) following manufacturer's instructions and quantified as nmol of hydrolyzed substrate ONPG/30 min/mg of cellular protein.

4.5 Generation of human transmitochondrial cybrid cell lines expressing rec.5S rRNA

Rec.5S rRNA genes were obtained by a two-step protocol: 1) PCR1 with partially overlapping primers: forward primers n°10 (for 5S-KSS-15H and 5S-KSS-15L) or n°12 (for 5S-KSS-13H and 5S-KSS-14L) and reverse primers n°2 to 5. 2) Resulting DNA fragments were used as forward primers in a PCR2 with reverse primer n°11 (for 5S-KSS-15H and 5S-KSS-15L) or n°13 (for 5S-KSS-13H and 5S-KSS-14L) and a plasmid containing human 5S rRNA gene with flanking regions [11] as a template.

Then, rec.5S rRNA genes were cloned into the pcDNA™5/FRT/TO plasmid vector (Invitrogen) and verified by sequence analysis. Cybrid FRT-KSS cells were co-transfected with pcDNA™5/FRT/TO-rec.5S rRNA constructs and pOG44 plasmid encoding Flp recombinase (Invitrogen) at a molar ratio 1:10 using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Forty-eight hours after transfection, Hygromycin B-gold (150µg/mL) (Invitrogen) was added to the medium for selection.

4.6 RT-PCR

Total cellular RNA was isolated with TRIzol reagent (Invitrogen). Levels of rec.5S rRNA expression were assayed by semi-quantitative RT-PCR with forward primers specific to the anti-replicative insert (primers n°18 to 21) and reverse primer corresponding to the 3'-end of 5S rRNA (primer n°22) using One-step RT-PCR kit (QIAGEN). For each recombinant RNA, serial dilutions of the corresponding T7-transcript were used to create a calibration curve and thus estimate the amount of rec.5S rRNA molecules per cell. RT-PCR products were PAGE separated, visualized by ethidium bromide staining and quantified using G-box Software.

4.7 Heteroplasmy test

To isolate total DNA, cells were solubilized in 0.5 ml of buffer containing 10mM Tris-HCl pH 7.5, 10mM NaCl, 25mM Na-EDTA and 1% SDS. Then, 10 µl of proteinase K solution (20 mg/ml) was added and the mixture was incubated for 2 h at 50°. Finally, 50 µl of 5M NaCl was added and DNA was precipitated by isopropanol.

Heteroplasmy level was analyzed by real-time qPCR using SYBR Green (iCycler, CFX96™ Real-Time Detection System, BioRad) with primers listed in the Supplementary Table S1. Two pairs of primers were used: 1) n°14 and 15 amplifying a 210bp fragment of 12S rRNA gene (nucleotides 1095–1305 in mtDNA) not affected by the KSS deletion as a value showing all mtDNA molecules, and 2) n°16 and 17 amplifying a 164 bp fragment in the deleted region (nucleotides 11 614–11 778) as a value showing only wild-type mtDNA molecules. All reactions were performed in a 20 µl volume in triplicates. PCR was performed by initial denaturation at 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 30s at 95°C and 30s at 60°C. The threshold cycle (Ct) values of each sample were used in the post-PCR data analysis by BioRad CFX Manager™ software 3.0, only if standard deviation (SD) of triplicate samples was less than 0.2. In each experiment, absolute amounts of both PCR products were determined using serial dilutions of linearized plasmid DNA bearing a corresponding sequence. The KSS heteroplasmy level was calculated using the formula: mutant mtDNA/total mtDNA = 1 - (WT mtDNA/total mtDNA).

Supplementary Materials: Supplementary materials can be found at www.mdpi.com/link.

Acknowledgments: The authors are grateful to A.Lombes (Institut Cochin, Paris) for providing human transmitochondrial cybrid cells. This work was supported by CNRS, the University of Strasbourg and LABEX ANR-11-LABX-0057_MITOCROSS.

Author Contributions: N.E and I.T conceived and designed the experiments; R.L, AM.H and D.J performed the experiments; R.L, AM.H, D.J and N.E analysed the data; R.L and N.E wrote the article.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

mtDNA	Mitochondrial DNA
KSS	Kearns Sayre Syndrome
FRT	Flp Recombination Target
HEK	Human Embryonic Kidney
ATP	Adenosine TriPhosphate
CMV	Cytomegalovirus
MELAS	Mitochondrial myopathy encephalopathy lactic acidosis and stroke-like episodes

References

1. Saito, M.; Kaye, G.; Negishi, K.; Linker, N.; Gammage, M.; Kosmala, W.; Marwick, T.H.; Protect-Pace, i. Dyssynchrony, contraction efficiency and regional function with apical and non-apical rv pacing. *Heart* 2015, *101*, 600-608.

2. Gorman, G.S.; Schaefer, A.M.; Ng, Y.; Gomez, N.; Blakely, E.L.; Alston, C.L.; Feeney, C.; Horvath, R.; Yu-Wai-Man, P.; Chinnery, P.F., *et al.* Prevalence of nuclear and mitochondrial DNA mutations related to adult mitochondrial disease. *Ann Neurol* 2015, *77*, 753-759.
3. Wallace, D.C. Mitochondrial DNA mutations in disease and aging. *Environ Mol Mutagen* 2010, *51*, 440-450.
4. Comte, C.; Tonin, Y.; Heckel-Mager, A.M.; Boucheham, A.; Smirnov, A.; Aure, K.; Lombes, A.; Martin, R.P.; Entelis, N.; Tarassov, I. Mitochondrial targeting of recombinant rnas modulates the level of a heteroplasmic mutation in human mitochondrial DNA associated with kearns sayre syndrome. *Nucleic Acids Res* 2013, *41*, 418-433.
5. Tonin, Y.; Heckel, A.M.; Vysokikh, M.; Dovydenko, I.; Meschaninova, M.; Rotig, A.; Munnich, A.; Venyaminova, A.; Tarassov, I.; Entelis, N. Modeling of antigenomic therapy of mitochondrial diseases by mitochondrially addressed rna targeting a pathogenic point mutation in mitochondrial DNA. *J Biol Chem* 2014, *289*, 13323-13334.
6. Greber, B.J.; Ban, N. Structure and function of the mitochondrial ribosome. *Annual review of biochemistry* 2016, *85*, 103-132.
7. Entelis, N.S.; Kolesnikova, O.A.; Dogan, S.; Martin, R.P.; Tarassov, I.A. 5 s rna and trna import into human mitochondria. Comparison of in vitro requirements. *J Biol Chem* 2001, *276*, 45642-45653.
8. Magalhaes, P.J.; Andreu, A.L.; Schon, E.A. Evidence for the presence of 5s rna in mammalian mitochondria. *Molecular biology of the cell* 1998, *9*, 2375-2382.
9. Smirnov, A.; Comte, C.; Mager-Heckel, A.M.; Addis, V.; Krasheninnikov, I.A.; Martin, R.P.; Entelis, N.; Tarassov, I. Mitochondrial enzyme rhodanese is essential for 5 s ribosomal rna import into human mitochondria. *J Biol Chem* 2010, *285*, 30792-30803.
10. Smirnov, A.; Entelis, N.; Martin, R.P.; Tarassov, I. Biological significance of 5s rna import into human mitochondria: Role of ribosomal protein mrp-118. *Genes & development* 2011, *25*, 1289-1305.
11. Smirnov, A.; Tarassov, I.; Mager-Heckel, A.M.; Letzelter, M.; Martin, R.P.; Krasheninnikov, I.A.; Entelis, N. Two distinct structural elements of 5s rna are needed for its import into human mitochondria. *Rna* 2008, *14*, 749-759.
12. Entelis, N.S.; Kolesnikova, O.A.; Martin, R.P.; Tarassov, I.A. Rna delivery into mitochondria. *Adv Drug Deliv Rev* 2001, *49*, 199-215.
13. Rubio, M.A.; Rinehart, J.J.; Krett, B.; Duvezin-Caubet, S.; Reichert, A.S.; Soll, D.; Alfonzo, J.D. Mammalian mitochondria have the innate ability to import trnas by a mechanism distinct from protein import. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008, *105*, 9186-9191.
14. Salinas, T.; Duchene, A.M.; Marechal-Drouard, L. Recent advances in trna mitochondrial import. *Trends in biochemical sciences* 2008, *33*, 320-329.
15. Towheed, A.; Markantone, D.M.; Crain, A.T.; Celotto, A.M.; Palladino, M.J. Small mitochondrial-targeted rnas modulate endogenous mitochondrial protein expression in vivo. *Neurobiology of disease* 2014, *69*, 15-22.
16. Amunts, A.; Brown, A.; Bai, X.C.; Llacer, J.L.; Hussain, T.; Emsley, P.; Long, F.; Murshudov, G.; Scheres, S.H.W.; Ramakrishnan, V. Structure of the yeast mitochondrial large ribosomal subunit. *Science* 2014, *343*, 1485-1489.
17. Greber, B.J.; Boehringer, D.; Leibundgut, M.; Bieri, P.; Leitner, A.; Schmitz, N.; Aebersold, R.; Ban, N. The complete structure of the large subunit of the mammalian mitochondrial ribosome. *Nature* 2014, *515*, 283-286.
18. Kolesnikova, O.; Kazakova, H.; Comte, C.; Steinberg, S.; Kamenski, P.; Martin, R.P.; Tarassov, I.; Entelis, N. Selection of rna aptamers imported into yeast and human mitochondria. *Rna* 2010, *16*, 926-941.
19. Clayton, D.A. Mitochondrial DNA replication: What we know. *IUBMB life* 2003, *55*, 213-217.
20. Marroquin, L.D.; Hynes, J.; Dykens, J.A.; Jamieson, J.D.; Will, Y. Circumventing the crabtree effect: Replacing media glucose with galactose increases susceptibility of hepg2 cells to mitochondrial toxicants. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 2007, *97*, 539-547.
21. King, M.P.; Attardi, G. Human cells lacking mtdna: Repopulation with exogenous mitochondria by complementation. *Science* 1989, *246*, 500-503.
22. Kirby, D.M.; Rennie, K.J.; Smulders-Srinivasan, T.K.; Acin-Perez, R.; Whittington, M.; Enriquez, J.A.; Trevelyan, A.J.; Turnbull, D.M.; Lightowlers, R.N. Transmitochondrial embryonic stem cells containing pathogenic mtdna mutations are compromised in neuronal differentiation. *Cell proliferation* 2009, *42*, 413-424.
23. Dott, W.; Mistry, P.; Wright, J.; Cain, K.; Herbert, K.E. Modulation of mitochondrial bioenergetics in a skeletal muscle cell line model of mitochondrial toxicity. *Redox biology* 2014, *2*, 224-233.

24. Elkalaf, M.; Andel, M.; Trnka, J. Low glucose but not galactose enhances oxidative mitochondrial metabolism in c2c12 myoblasts and myotubes. *PloS one* 2013, 8, e70772.
25. Cannino, G.; El-Khoury, R.; Pirinen, M.; Hutz, B.; Rustin, P.; Jacobs, H.T.; Dufour, E. Glucose modulates respiratory complex i activity in response to acute mitochondrial dysfunction. *J Biol Chem* 2012, 287, 38729-38740.
26. Santra, S.; Gilkerson, R.W.; Davidson, M.; Schon, E.A. Ketogenic treatment reduces deleted mitochondrial dnas in cultured human cells. *Ann Neurol* 2004, 56, 662-669.
27. Desquiret-Dumas, V.; Gueguen, N.; Barth, M.; Chevrollier, A.; Hancock, S.; Wallace, D.C.; Amati-Bonneau, P.; Henrion, D.; Bonneau, D.; Reynier, P., et al. Metabolically induced heteroplasmy shifting and l-arginine treatment reduce the energetic defect in a neuronal-like model of melas. *Biochimica et biophysica acta* 2012, 1822, 1019-1029.
28. Markham, N.R.; Zuker, M. Unafold: Software for nucleic acid folding and hybridization. *Methods Mol Biol* 2008, 453, 3-31.
29. Szymanski, M.; Barciszewska, M.Z.; Erdmann, V.A.; Barciszewski, J. 5 s rrna: Structure and interactions. *The Biochemical journal* 2003, 371, 641-651.
30. Sugimoto, N.; Nakano, S.; Katoh, M.; Matsumura, A.; Nakamuta, H.; Ohmichi, T.; Yoneyama, M.; Sasaki, M. Thermodynamic parameters to predict stability of rna/DNA hybrid duplexes. *Biochemistry* 1995, 34, 11211-11216.



© 2017 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Résumé de thèse

Contexte scientifique du sujet :

Les mitochondries sont des organites essentiels des cellules eucaryotes de par leur participation à de nombreuses fonctions cellulaires cruciales. Parmi ces fonctions, la production d'énergie sous forme d'ATP qui se déroule au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale grâce au processus de phosphorylation oxydative, est de toute première importance. Treize sous-unités essentielles de cette chaîne respiratoire sont produites directement au sein des mitochondries grâce à la présence de multiples copies du génome mitochondrial qui, chez l'Homme, est une petite molécule d'ADN circulaire bicaténaire presque entièrement dévolue à la production de ces protéines.

Plus de 250 mutations pathogéniques de cet ADN mitochondrial (ADNmt) ont été mises en évidence jusqu'à présent, souvent associées à de sévères affections neuromusculaires. La plupart de ces mutations sont dites « hétéroplasmiques », ce qui signifie que les molécules d'ADNmt mutantes et sauvages coexistent au sein d'une même cellule. Ainsi, l'expression phénotypique de ces mutations est très étroitement liée au ratio existant entre le nombre de molécules des deux types (c.-à-d. le taux d'hétéroplasmie) et l'apparition des défauts de la chaîne respiratoire ainsi que les symptômes associés ne seront observés que lorsque ce ratio excède un certain seuil dit pathogénique.

Une stratégie thérapeutique intéressante pourrait alors consister en la diminution du taux d'hétéroplasmie au-dessous de ce seuil pathogénique et pour atteindre ce but, deux stratégies ont été proposées. Une première stratégie, appelée anti-répllicative, vise à altérer la réplication de l'ADNmt mutant grâce à l'hybridation spécifique de molécules importées dans les mitochondries. Une seconde stratégie, appelée anti-génomique, consiste quant à elle à détruire spécifiquement les molécules d'ADNmt mutantes grâce à l'adressage mitochondrial de molécules permettant un clivage ciblé de l'ADN (endonucléases de restriction, TALENs, Nucléases à doigt de zinc).

L'équipe « Trafic intracellulaire d'ARN et maladies mitochondriales » s'intéresse aux différents aspects du phénomène d'adressage d'ARN dans les mitochondries et tente d'exploiter ces voies d'import afin de mettre au point des stratégies de thérapie génique pour ces maladies causées par des mutations hétéroplasmiques de l'ADNmt.

Une des stratégies développées au sein du laboratoire consiste ainsi à utiliser la voie d'adressage mitochondrial de l'ARN ribosomique 5S (ARNr 5S) dans une approche anti-répllicative. L'ARNr 5S peut être en partie retrouvé dans les mitochondries de cellules humaines. Sa voie d'import mitochondrial ainsi que les déterminants structuraux permettant cet import ont été étudiés et décrits au sein du laboratoire. Il a également été démontré qu'une partie de cet ARN pouvait être supprimée ou remplacée par une courte séquence nucléotidique sans altérer son adressage mitochondrial. C'est grâce à ces informations que l'équipe a développé une stratégie anti-répllicative dans laquelle des ARNr 5S recombinants, porteurs de séquences pouvant s'hybrider spécifiquement à un ADNmt affecté par une large délétion, ont été modélisés. L'expression de ces molécules dans des cellules contenant environ 60% d'ADNmt mutants, bien que très faible, a permis l'obtention de diminutions du taux d'hétéroplasmie démontrant ainsi l'efficacité de cette stratégie.

Une seconde stratégie exploitant les voies d'import mitochondrial d'ARN pourrait quant à elle consister en l'utilisation du système CRISPR/Cas9 dans une approche anti-génomique. CRISPR/Cas9 est un puissant outil d'édition du génome et ses nombreuses applications sur le génome nucléaire ont démontré son efficacité. Jusqu'à présent ce système n'a jamais été appliqué à l'ADNmt pourtant, le développement d'un outil CRISPR/Cas9 mitochondrial pourrait permettre un progrès important dans la recherche fondamentale des mécanismes d'expression de ce génome. Son utilisation sur des cellules contenant des mutations hétéroplasmiques de l'ADNmt pourrait aussi permettre le clivage spécifique des génomes mutants ce qui devrait entraîner une diminution du taux d'hétéroplasmie.

Objectifs du doctorat :

Mon projet repose sur le développement de deux stratégies visant à moduler le taux d'hétéroplasmie de cellules présentant des mutations au sein de leur ADNmt.

I. Dans un premier temps, j'ai poursuivi les travaux de l'équipe sur le développement de la stratégie anti-répllicative basée sur l'exploitation de la voie d'adressage mitochondrial de l'ARNr 5S. En m'appuyant sur les données obtenues précédemment, mon projet présentait plusieurs objectifs :

- III. Optimiser les structures des ARNr 5S recombinants pour augmenter potentiellement leur effet anti-réplicatif.
- IV. Créer des lignées cellulaires permettant une plus forte expression des ARNr 5S recombinants afin d'obtenir des diminutions importantes et stables du taux d'hétéroplasmie.
- V. Etendre cette stratégie anti-répllicative à une mutation ponctuelle de l'ADNmt.

II. Dans un second temps, mes travaux ont eu pour objectif d'initier le développement d'une stratégie anti-génomique innovante reposant sur l'adressage mitochondrial des composants du système CRISPR/Cas9 afin de cliver spécifiquement des génomes mitochondriaux mutants. Pour cette partie, mes objectifs étaient :

- iv) Adresser les différents composants de l'outil CRISPR/Cas9 (ARNsg et nucléase Cas9) au sein des mitochondries de cellules humaines.
- v) Etudier les capacités de clivage de l'ADNmt par l'outil CRISPR/Cas9 *in vitro* et au sein de lysats mitochondriaux.
- vi) Analyser l'impact de ce système CRISPR/Cas9 mitochondrial sur l'ADNmt dans des cellules humaines en culture.

Résultats

Le premier pan de mon projet a eu pour but de poursuivre les travaux de l'équipe sur la mise au point d'une stratégie anti-répllicative utilisant la voie d'adressage mitochondrial de l'ARNr 5S.

Pour modéliser des ARNr 5S recombinants pouvant être importés dans les mitochondries humaines et altérer de manière efficace et spécifique la réplication d'un ADNmt mutant, j'ai produit *in silico* une banque d'ARNr 5S recombinants contenant des inserts anti-réplicatifs de taille variable. Par analyse bio-informatique, j'ai sélectionné les molécules dont les structures secondaires prédites et les températures de fusion vis-à-vis des génomes mitochondriaux mutants et sauvages semblaient les plus adaptées à un import mitochondrial et une hybridation spécifique. J'ai ensuite validé *in vitro* les capacités d'hybridation spécifique des ARNr 5S recombinants sélectionnés. Ces premières étapes ont été à la fois réalisées pour

un ADNmt mutant affecté par une large délétion (cellules cybrides KSS) et pour un ADNmt contenant une mutation ponctuelle (cellules cybrides ND5).

Dans le but d'augmenter l'expression des ARNr 5S recombinants au sein des cellules porteuses d'ADNmt mutants, j'ai utilisé le système Flp-InTM T-RexTM (Invitrogen) qui permet la génération de lignées cellulaires stables dont le gène d'intérêt est localisé dans une région favorable à son expression. Ce système m'a ainsi permis de créer 9 lignées cellulaires cybrides KSS exprimant les différents ARNr 5S recombinants sélectionnés précédemment, ainsi que 7 lignées cellulaires cybrides ND5. Malgré l'expression plus importante des différents ARNr 5S recombinants, aucune des lignées cellulaires KSS produites n'a démontré une variation significative de son taux d'hétéroplasmie. Afin de donner un avantage sélectif aux cellules où l'expression des ARNr 5S recombinants aurait un impact sur le niveau d'ADNmt muté, les lignées cellulaires ont été placées dans un milieu dépourvu de glucose. Grâce à ces conditions de culture où la production d'énergie devient entièrement dépendante de la phosphorylation oxydative mitochondriale, j'ai pu observer des diminutions significatives de l'hétéroplasmie dans les deux lignées cellulaires KSS où l'expression des molécules recombinantes semble la plus importante.

Les lignées cellulaires cybrides ND5 ont également été cultivées pendant plusieurs semaines en présence et en absence de glucose, et les conditions de culture sélectives semblent avoir le même impact sur le taux d'hétéroplasmie. Néanmoins, les résultats obtenus doivent être reproduits afin de confirmer ces premières tendances.

Le second pan de mes travaux de thèse a eu pour objet de développer une stratégie anti-génomique innovante basée sur l'adressage mitochondrial de l'outil CRISPR/Cas9 afin de cliver spécifiquement les molécules d'ADNmt mutantes.

Pour adresser la nucléase Cas9 dans les mitochondries de cellules humaines, j'ai modifié un plasmide permettant son expression, en supprimant un signal d'adressage nucléaire et en ajoutant un signal de localisation mitochondriale à l'extrémité N-terminale de la protéine. Des analyses par microscopie confocale et par western blot ont permis de démontrer l'expression de la protéine MTS-Cas9 résultante, ainsi que sa localisation au sein de la matrice mitochondriale à proximité de l'ADNmt.

Puis, j'ai modélisé plusieurs séries d'ARNsg (ARN single-guide) portant des déterminants d'import mitochondrial et ciblant spécifiquement, soit l'ADNmt mutant affecté

par une large délétion, soit l'ADNmt sauvage. L'analyse des fractions cellulaires obtenues après transfection des cellules humaines en culture avec les différents ARNsg a permis d'observer un enrichissement de ceux-ci dans la fraction mitochondriale, suggérant que ces ARNsg modifiés peuvent être importés dans les mitochondries.

J'ai démontré par des tests *in vitro* que la protéine MTS-Cas9 et les ARNsg permettent l'obtention de clivages spécifiques de l'ADNmt ciblé. Grâce à des tests de clivage réalisés à partir de lysats mitochondriaux, j'ai également pu observer que cette protéine est bien active en présence d'ARNsg après import mitochondrial et qu'elle peut cliver l'ADNmt sous sa forme de nucléoïde de façon spécifique.

J'ai alors appliqué ce système CRISPR/Cas9 sur différents types cellulaires. Afin d'optimiser le protocole de transfection, j'ai créé une lignée cellulaire d'expression stable et inductible de la protéine MTS-Cas9. Les différentes transfusions de cette lignée sauvage avec un seul ARNsg n'ont pas permis d'observer une diminution de la quantité d'ADNmt. Finalement, nous avons transfecté les cellules avec deux ARNsg ciblant deux régions distinctes de l'ADNmt. Ces nouvelles conditions permettent l'obtention de diminutions de la quantité d'ADNmt suggérant une activité du système CRISPR/Cas9 au sein des mitochondries.

Conclusions et perspectives :

Au cours de ma thèse, j'ai tout d'abord poursuivi les travaux de l'équipe sur la stratégie anti-répliquative basée sur l'utilisation de la voie d'adressage mitochondrial de l'ARNr 5S afin de l'optimiser et l'étendre à une mutation ponctuelle de l'ADNmt. Malgré une sélection des molécules les plus intéressantes et une augmentation de leur expression au sein des cellules cybrides KSS, les ARNr 5S recombinants ne permettent pas de diminuer l'hétéroplasmie dans les conditions de culture normales. En revanche, des conditions sélectives de culture (absence de glucose), permettent l'obtention de diminution de l'hétéroplasmie dans les lignées où l'expression des ARNr 5S recombinants est la plus importante.

L'absence d'effet sur le taux d'hétéroplasmie observé dans les conditions normales de culture pourrait s'expliquer par un taux d'import mitochondrial des ARNr 5S qui, malgré la plus forte proportion de molécules recombinantes dans les cellules, resterait un facteur limitant pour le développement de cette stratégie anti-répliquative. Dans de futures expériences, les différents facteurs protéiques d'import mitochondrial de l'ARNr 5S pourraient

ainsi être sur-exprimés pour voir si l'import des ARN peut être augmenté et ainsi mener à des diminutions plus importantes de l'hétéroplasmie. L'application de cette stratégie sur d'autres modèles, tels que les cellules souches embryonnaires *transmitochondriales* qui peuvent être différenciées en types cellulaires spécifiques, permettrait aussi de s'approcher un peu plus des conditions retrouvées au sein de l'organisme. Enfin, l'étude de la fonction mitochondriale de l'ARNr 5S, qui n'a toujours pas été élucidée, pourrait également apporter des éléments importants en vue de l'optimisation de cette stratégie anti-répllicative.

Une seconde partie de ma thèse a été consacrée au développement d'une stratégie anti-génomique visant à adresser l'outil CRISPR/Cas9 au sein des mitochondries de cellules humaines. J'ai ainsi démontré que les composants du système CRISPR/Cas9 peuvent être dirigés efficacement vers les mitochondries. Le système CRISPR/Cas9 mitochondrial peut également mener à un clivage spécifique de l'ADNmt sous sa forme de nucléoïde *in vitro*. Malheureusement, l'application de ce système CRISPR/Cas9 mitochondrial sur des cellules cybrides ne permet pas de modifier leur taux d'hétéroplasmie, mais la transfection de cellules avec des ARNsg ciblant deux régions distinctes du génome mitochondrial permet de diminuer la quantité d'ADNmt au sein de celles-ci. Ces résultats représentent la première indication de l'action du système CRISPR/Cas9 au sein des mitochondries.

Dans la continuité de ces travaux, il faudra confirmer l'action de l'outil CRISPR/Cas9 mitochondrial sur l'ADNmt par des méthodes de détection des coupures double brin. La spécificité de clivage de l'ADNmt par ce système devra également être analysée afin de déterminer s'il est possible de l'utiliser pour modifier le taux d'hétéroplasmie de cellules cybrides. Les capacités de coupure d'ADN simple et double brin qu'offre le système CRISPR/Cas9 pourraient par la suite être utilisées dans l'étude des mécanismes de réparation et d'expression du génome mitochondrial.

Publications et communications :

Publications

- Stable expression of anti-replicative recombinant 5S rRNA molecules modulates the mtDNA heteroplasmy in a glucose-dependent manner. *Romuald Loutre, Anne-Marie Heckel, Damien Jeandard, Nina Entelis and Ivan Tarassov.* (En cours de soumission).

- Development of a CRISPR/Cas9 tool targeting mitochondrial DNA. *Romuald Loutre, Anne-Marie Heckel, Nina Entelis and Ivan Tarassov.* (Manuscrit en cours de préparation)

Communications orales

- Modeling gene therapy by RNA import. *Romuald Loutre.* Summer School LabEx MitoCross (Strasbourg, France). Juillet 2014.
- Heteroplasmy shifting in mice *transmitochondrial* embryonic stem cells due to cultivation in low-glucose conditions. *Romuald Loutre, Anne-Marie Heckel, Isabel Martínez Carrascoso, Rebeca Acín-Pérez, José Antonio Enríquez, Ivan Tarassov et Nina Entelis.* Targeting Mitochondria (Berlin, Allemagne). Octobre 2015.
- A mitochondrially targeted CRISPR/Cas9 system as a potential way to treat mitochondrial DNA mutations associated disorders. *Romuald Loutre.* Health and Life Sciences Doctoral School Days (Strasbourg, France). Mars 2016.

Communications par affiches

- 5S rRNA as a tool to decrease the heteroplasmy level of pathogenic mutations in human mtDNA. *Romuald Loutre, Anne-Marie Heckel, Nina Entelis and Ivan Tarassov.* Euromit (Tampere, Finlande). Juin 2014.
- Exploitation of the natural mitochondrial import pathways to modulate the heteroplasmy level of pathogenic mutations in the mtDNA. *Romuald Loutre, Anne-Marie Heckel, Damien Jeandard, Nina Entelis et Ivan Tarassov.* Meetochondrie (Guidel-plage, France). Mai 2015.
- Exploitation of the natural mitochondrial import pathways to modulate the heteroplasmy level of pathogenic mutations in the mtDNA. *Anne-Marie Heckel, Romuald Loutre, Damien Jeandard, Nina Entelis et Ivan Tarassov.* Targeting Mitochondria (Berlin, Allemagne). Octobre 2015.
- Development of a CRISPR/Cas9 tool targeting mitochondrial DNA. *Romuald Loutre, Anne-Marie Heckel, Nina Entelis and Ivan Tarassov.* Meetochondrie (Biarritz, France). Mai 2017.

Exploitation des voies d'adressage mitochondrial d'ARN à des fins thérapeutiques

Résumé

Les mitochondries sont des organites possédant leur propre génome qui peut être l'objet de mutations, souvent associées à de graves maladies neuromusculaires. La plupart des mutations de l'ADN mitochondrial (ADNmt) sont hétéroplasmiques, ce qui signifie que les molécules mutantes et sauvages coexistent dans une même cellule. Ce projet de thèse a été consacré au développement de deux stratégies qui visent à diminuer la proportion d'ADNmt mutant en utilisant les voies d'import mitochondrial d'ARN. Nous avons tout d'abord utilisé une stratégie anti-répllicative qui vise à altérer la réplication de l'ADNmt mutant. Nous démontrons que l'expression d'ARNr 5S contenant des séquences anti-répliquatives permet de diminuer le taux d'hétéroplasmie dans des conditions sélectives de culture. Puis, nous avons développé un système CRISPR/Cas9 mitochondrial pour cliver l'ADNmt. La nucléase Cas9 et des ARNsg modifiés peuvent être redirigés vers les mitochondries. L'introduction de deux ARNsg ciblant des régions distinctes de l'ADNmt provoque des déplétions de ce génome, ce qui pourrait constituer la première indication d'un effet de CRISPR/Cas9 sur l'ADNmt.

Mitochondrie, ADN mitochondrial, Hétéroplasmie, Import mitochondrial, CRISPR/Cas9.

Résumé en anglais

Mitochondria are organelles containing their own genome which can be affected by mutations often associated with severe neuromuscular disorders. Most of the mitochondrial DNA (mtDNA) mutations are heteroplasmic, meaning that mutant and wild-type molecules coexist in a same cell. The objective of this thesis project consists in the development of two strategies to decrease mutant mtDNA proportion by use of RNA mitochondrial import pathway. We first applied an anti-replicative strategy aiming to alter mutant mtDNA replication. We demonstrated that the expression of 5S rRNA containing anti-replicative sequences allows to decrease the heteroplasmy level in selective culture conditions. Then, we developed a mitochondrial CRISPR/Cas9 system to cleave mtDNA. Modified Cas9 nuclease and sgRNAs can be imported into mitochondria. Delivery of two sgRNAs targeting distinct regions of the mitochondrial genome induced mtDNA depletion, thus providing a first indication of a CRISPR/Cas9 effect on mtDNA.

Mitochondria, Mitochondrial DNA, Heteroplasmy, Mitochondrial import, CRISPR/Cas9.