



OEX1, une exonuclease/flap endonuclease nécessaire à la stabilité du génome mitochondrial d'*arabidopsis thaliana*

Déborah Schatz-Daas

► To cite this version:

Déborah Schatz-Daas. OEX1, une exonuclease/flap endonuclease nécessaire à la stabilité du génome mitochondrial d'*arabidopsis thaliana*. Biologie végétale. Université de Strasbourg, 2021. Français. NNT : 2021STRAJ016 . tel-03992664

HAL Id: tel-03992664

<https://theses.hal.science/tel-03992664>

Submitted on 16 Feb 2023

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

Institut de Biologie Moléculaire des Plantes – CNRS – UPR2357

THÈSE DE DOCTORAT

présentée par :

Déborah SCHATZ-DAAS

soutenue le : **24 juin 2021**

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

Discipline/ Spécialité : Sciences du vivant / Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

OEX1, une exonucléase/flap-endonucléase nécessaire à la stabilité du génome mitochondrial *d'Arabidopsis thaliana*

THÈSE dirigée par :

Dr. GUALBERTO José Manuel Directeur de thèse CNRS, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Dr. LURIN Claire	Rapportrice externe	INRA, Université Paris-Saclay
Dr. PAGES Vincent	Rapporteur externe	CNRS, Université d'Aix-Marseille

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Dr. TARASSOV Ivan	Examineur interne	CNRS, Université de Strasbourg
--------------------------	-------------------	--------------------------------

INVITE :

Dr. LOTFI Frédérique	Co-encadrante, invité	Université de Strasbourg
-----------------------------	-----------------------	--------------------------

Je remercie sincèrement toutes les personnes ayant participé de près ou de loin à cette thèse, il y en a tant, je ne pourrai pas citer tout le monde mais je vous suis sincèrement reconnaissante.

En premier lieu, je tiens à remercier les docteurs Claire Lurin, Vincent Pagès et Ivan Tarassov pour avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse.

Je remercie le Labex Mitocross pour avoir financé ma thèse et l'Unistra pour avoir financé mes deux années de monitorat. Un merci tout particulier à toute l'équipe de la composante Génétique pour m'avoir initiée à l'enseignement et donné le courage de monter sur les planches. Merci de m'avoir permis de vivre cette expérience si enrichissante.

Je remercie également mon directeur de thèse José Gualberto ainsi que mes mentors Frédérique Lotfi et André Dietrich. Déjà, merci de m'avoir donné cette chance en Master, puis de m'avoir proposé cette thèse, pour ça je ne vous remercierai jamais assez ! Merci d'avoir pris soin de la « petite plantule » que j'étais et de m'avoir permis de pousser à vos côtés. Merci à vous trois pour toutes ces discussions, scientifiques ou non, merci pour tout votre savoir et votre expérience, vos conseils en or. Merci José pour toutes ces fois où il fallait "encore plus diluer l'ADN" et où ça marchait, pour toutes ces fois où tu répondais à mes mails jusqu'à 2h du matin. Merci aussi de m'avoir laissé tant de liberté dans les manip. Merci Frédérique pour ton expertise sur la biochimie, les tests d'activité et sur les perles d'élèves et surtout merci pour cette phrase : *"Il n'y a que ceux qui ne font rien qui ne font pas d'erreurs"*. Elle a eu beaucoup d'impact sur ma confiance. Merci André pour m'avoir appris à être consciencieuse (et pas mal de blagues de haut niveau). Merci pour votre patience, merci d'avoir supporté mon enthousiasme un peu trop envahissant et surtout merci pour toute votre gentillesse et votre bienveillance.

De façon générale, je tiens à remercier sincèrement toute l'équipe passée et présente qui a fait de mon expérience au 312 ce qu'elle est aujourd'hui. Vous avez tous été une pierre importante de cette thèse. En premier lieu merci à Arnaud et Nicolas d'avoir formé avec moi (malgré moi) ce trio infernal champions. Les trois années passées à vos côtés sont passées aussi vite qu'une bille d'agar au 312. L'ambiance, vos conseils, nos discussions et surtout nos

fous rires m'ont été très précieux. Un énorme merci à Pierre qui a initié OEX1 avec Khalid, à Clémentine pour ta gentillesse et tous tes conseils et à Denisa, italienne malgré elle, nos discussions vont me manquer. Merci également à tous les stagiaires que j'ai pu encadrer ou coacher : Elisa, Emilie, Elsa et Xavier ; j'ai tellement appris grâce à vous. Encore merci à Rebecca et Xavier (pardon Ravier), ces quelques mois avec vous étaient ... parfait, n'est ce pas ? Enfin, merci aux membres actuels avec qui j'aurais aimé passer plus de temps, Anaïs, Julie. Merci pour vos rires et nos discussions très productives du matin. Merci Anaïs pour ces manip que tu as terminées pendant que je rédigeais et qui m'ont permis de finir proprement certaines parties. A votre tour d'être les petites pousses du labo, je ne doute pas un instant que vous serez de super chercheuses. And thank you Rokas, these few months were great, I wish we had more time together playing Word of Excel! (Sorry it's the only sentence in English, you know the rest will be baguette fromage and vin). Et encore une fois merci à José et Frédérique de nous accepter tels que nous sommes.

Merci à vous tous d'avoir été des petits soleils au 312 !

Merci à toutes les personnes de l'IBMP pour leur sympathie, merci Anne, Hélène, Nicolas, Magda, Herrade, Sebastien, Mathilde et tous les autres. Merci à tous ceux qui m'ont conseillé et aidé dans mes manip, Anthony, Ester, Sandrine, Malek et bien d'autres. Un merci tout particulier à Marc Bichara et Dominique Gagliardi pour leurs conseils lors de ma mi-thèse, ils ont été précieux. Merci à Géraldine pour nos discussions et surtout de m'avoir rappelé que *"C'est sur l'intranet"*.

Un énorme merci à mes amis, votre présence a été si précieuse ces dernières années. Merci à ceux, qui de collègues de master sont devenus des amis proches. Merci pour cette formidable aventure qu'on a vécu ensemble. Merci Pierre, Florent, Nicolas, Caroline (ce thé à 3h du matin en master) et Yannick (d'avoir visé la gare) d'avoir ensoleillé mes années de Master et de thèse. Yannick pour ces longues soirées "révisions", Caro d'avoir été une épaule si solide tout au long de la thèse. Merci Flore pour ta relecture in-extrémis et si rapide, les Spritz et ta bonne humeur rayonnante ! Vous êtes une part importante de cette aventure.

Merci à la team Harmonia mundi, Jean-pascal, Benoit (Melthas le fameux), Audrey, Ludovic x2, Samuel, Oriane, et Dimitri pour ce que vous êtes et pour ces soirées en Azeroth. Merci en

particulier à Khanji, sa sagesse nous manque profondément. Merci Bruno, Sarah, Paul, Zwicky, Nicolas et Chamalow pour ces soirées du mardi qui n'étaient pas forcément un mardi mais qui étaient toujours un moment de plaisir ensemble. Merci à toi Marina pour ton soutien même à l'autre bout du monde. Dans un an on te rejoint !

Je remercie du fond du cœur ma famille qui m'a toujours soutenue et surtout mes parents qui m'ont suivie dans ma folle idée de faire une thèse. Merci d'avoir cru en moi, d'avoir été là malgré mes échecs et merci de m'avoir donné le courage et ce terrible défaut qu'est l'obstination. Voilà où ça m'a menée de ne jamais abandonner. C'est grâce à vous si j'en suis là.

Je remercie du fond du cœur Simon, qui depuis 15 ans me suis dans tous mes délires, tous mes projets, surtout celui de faire une thèse. Merci pour ta patience (et il en a fallu), ton calme, ton réconfort et tes encouragements. Merci pour ton soutien jour après jour, dans les bons et les mauvais moments. Cette thèse tu l'as vécu avec moi, les hauts et les bas, les « *oui oui ce soir je rentre tôt* » pour m'attendre jusqu'à 22 h finalement. Sans toi je ne serai pas là. Maman, Papa et Simon, cette thèse c'est aussi un peu la vôtre.

Je tiens à remercier l'équipe du 509. Merci à Anne-Catherine d'avoir parlé des stages d'été à l'IBMP il y a 12 ans, et à Etienne Herzog de m'avoir acceptée. Merci au 509 de m'avoir donné ce goût pour la recherche (Morgane et Kinda je marche dans vos pas).

Je remercie toutes les teams que j'ai pu rejoindre pendant ma thèse, que ce soit pour l'IBMPday, IBMPnews ou les IBMP breakfast seminar. Merci pour votre accueil, les bons moments passés ensemble qui ont su mêler apprentissage et convivialité.

Je finis en remerciant une dernière fois toutes les personnes ayant pris part à cette thèse d'une façon ou d'une autre. Collègue, amis, famille, mari et chats. La thèse est une récompense individuelle mais c'est surtout un travail d'équipe dans lequel chaque contribution qu'elle soit

scientifique ou non est essentielle. Vous avez fait de ma thèse ce qu'elle a été, et pour cela je vous remercie sincèrement du fond du cœur.

Aujourd'hui, et bien c'est le jour de ma soutenance de thèse ! Mais hélas 10 ans d'IBMP ce fut un temps trop court à passer en compagnie de si excellents et si admirables hobbits... Je ne connais pas la moitié d'entre vous autant que je le voudrais, mais j'aime moins la moitié d'entre vous à moitié moins que vous ne le méritez ! Adapted from *Tolkien et al., 2001*.

誰でも富士山を一度登ることはセージで、誰でもそれを二回行うことは馬鹿です

" Il est sage pour quiconque de gravir le mont Fuji une fois, et il est insensé pour quiconque de faire
un doctorat. "

Liste des abréviations

6-4 PP	Pyrimidine (6-4) primidone
AAA	ATPases Associées à diverses Activités cellulaires
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ADNcp, ADN mt	ADN chloroplastique, ADN mitochondrial
ADNdb, ADN sb	ADN double brin, ADN simple brin
ADP	Adénosine diphosphate
AOX1	Alternative oxydase 1
AP	Apurinique
APS	Persulfate d'ammonium
ARN	Acide ribonucléique
ARNt	ARN de transfert
ARNr	ARN ribosomique
A-T-C-G	Adénine, Thymine, Cytosine et Guanine
ATP	Adénosine triphosphate
BER	Réparation par excision de base (" <i>Base Excision Repair</i> ")
BET	Bromure d'éthidium
BIR	Réplication induite par cassure (" <i>Break Induced Replication</i> ")
BSA	Albumine de sérum bovin
°C	Degré Celsius
CaMV	Virus de la mosaïque du chou-fleur (" <i>Cauliflower Mosaic Virus</i> ")
CIP	Ciprofloxacine
cm, mm, nm	Centimètre, millimètre, nanomètre
CMS	Stérilité mâle cytoplasmique (" <i>Cytoplasmic Male Sterility</i> ")
Col-0	Ecotype Columbia
CPD	Dimère cyclobutanique de pyrimidines
CTAB	Bromure de cetyltriméthylammonium
Da, kDa	Dalton, kiloDalton
DDR	" <i>DNA-Damage Response</i> "
D-loop	" <i>Displacement-loop</i> "
DO	Densité optique
DSB	Cassure double brin (" <i>Double-Stranded Break</i> ")
DSBR	Réparation des cassures double brin (" <i>Double-Stranded Break Repair</i> ")
DTT	Dithiothréitol
DUE	" <i>DNA Unwinding Element</i> "
ECL	" <i>Enhanced Chemical Luminescence</i> "
ECT	Chaîne de transport d'électrons
EDTA	Ethylène diamine tétra-acétate de sodium

eGFP	<i>"enhanced Green Florescent Protein"</i>
FADH	Flavine adénine dinucléotide
FECA	Premier ancêtre commun aux eucaryote
g	Unité d'accélération centrifuge
g, kg, mg, µg, ng	Gramme (kilo, milli, micro, nano)
h, min, s	Heure, minute, seconde
HA	<i>"Human influenza hemagglutinin"</i>
HJ	Jonction de Holliday (<i>"Holliday Junction"</i>)
HR	Recombinaison homologue (<i>"Homologous Recombination"</i>)
IPTG	Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
L, mL, µL	Litre, millilitre, microlitre
LB	Milieu de Luria Bertani
LECA	Dernier ancêtre commun aux eucaryotes
Ler	Ecotype Landsberg
LSC	<i>"Large Single Copy region"</i>
M, mM, µM,	Molaire, millimolaire, micromolaire
MIM	membrane interne mitochondrial
MM-BIR	<i>"Microhomology-Mediated BIR"</i>
MMEJ	<i>"Microhomology-Mediated End-Joining"</i>
MMR	Réparation des mésappariements (<i>"MisMatch Repair"</i>)
MOM	Membrane externe mitochondriale
MRO	<i>"Mitochondrion-Related Organelles"</i>
MS	Milieu de Murashige et Skoog
NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NASC	Nottingham Arabidopsis Stock Center
NER	Réparation par excision de nucléotide (<i>"Nucleotide Excision Repair"</i>)
NER-GGR	Réparation globale du génome du NER
NER-TCR	Réparation couplée à la transcription du NER
NHEJ	<i>"Non-Homologous End Joining"</i>
MPP	<i>"Mitochondrial Processing Peptidase"</i>
Ni-NTA	Nickel -acide nitrilotriacétique
OSB	<i>"Organellar Single-stranded DNA-Binding protein"</i>
Orf	Cadre de lecture ouverte (<i>"Opening reading frame"</i>)
OXPPOS	Phosphorylation oxydative
pb, kb	Paire de base, kilo paire de bases
PAM (séquence)	motif adjacent d'espaceur
PCR	réaction de polymérisation en chaîne (<i>"Polymerase Chain Reaction"</i>)
pH	Potentiel d'hydrogène
FADH	Flavine adénine dinucléotide

p/v	Poids sur volume
PSI, PSII	Photosystème I, photosystème II
qPCR	PCR quantitative
RDR	Réplication dépendante de la recombinaison
RER	Réparation par excision de ribonucléotide
RI	Rayonnement ionisant
RNase A / H	Ribonuclease A / H
rNTP	Ribonucléotide triphosphate
ROS	Espèce réactive de l'oxygène (" <i>Reactive OxygenSpecies</i> ")
rpm	Rotation par minute
RR	Réponse rétrograde
RT	Transcription inverse (" <i>Reverse Transcription</i> ")
Rubisco	Ribulose biphosphate carboxylase
SD	<i>"Synthetic Defined"</i>
SDS	Dodécylsulfate de sodium
SDSA	<i>"Synthesis-Dependent Strand Annealing"</i>
SNP	<i>"Single Nucleotide Polymorphism"</i>
SOC	<i>"Super Optimal broth with Catabolite repression"</i>
SSA	<i>"Single Strand Annealing"</i>
SSB	Protéine de liaison à l'ADN simple brin
SSC	<i>"Small Single Copy region"</i>
TAM	Mutagenèse associée à la transcription
T-DNA	ADN de transfert
TE	Tris-EDTA
TEM	Microscope électronique à transmission
TEMED	Tétraméthyléthylènediamine
TIC	<i>"Translocon of the Inner Chloroplast membrane"</i>
TIM	<i>"Translocon of the Inner Mitochondrion membrane"</i>
Tm	Température de fusion (" <i>melting temperature</i> ")
TLS	Translèsion
TOC	<i>"Translocon of the Outer Chloroplast membrane"</i>
TOM	<i>"Translocon of the Outer Mitochondrion membrane"</i>
TREX	<i>"Transcription-Export"</i>
UV A/B	Ultraviolet A/B
VDAC	<i>"Voltage-Dependent Anion Channel"</i>
v/v	Volume sur volume
V	Volt
YEP	<i>"Yeast Extract Peptone"</i>
YPD	<i>"Yeast Peptone Dextrose"</i>
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside
X-Gluc	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide

Table des matières

Introduction	6
I. Vue d'ensemble de la Mitochondrie et du Chloroplaste	7
I.1 Structure et rôles des organelles.....	7
I.1.a Les mitochondries	7
I.1.b Les chloroplastes.....	11
I.1.c Les conséquences d'un dysfonctionnement des organelles	13
I.2. Les origines : la théorie endosymbiotique	15
I.3 L'évolution des génomes organellaires	17
I.4 Structure et organisation des génomes organellaires.....	18
II. La réplication des génomes organellaires.....	22
II.1 La réplication de l'ADN, notions générales	22
II.1.a Chez les bactéries.....	22
II.1.b Chez le bactériophage T7.....	23
II.1.c Le mécanisme de "translesion synthesis" (TLS)	24
II.2 La réplication de l'ADNmt et de l'ADNcp.....	25
II.2.a La réplication de l'ADN mitochondrial des plantes	25
II.2.b La réplication de l'ADN chloroplastique des plantes supérieures.....	26
II.3 Les ADN polymérases organellaires des plantes	27
II.4 L'élimination des amorces d'ARN.....	27
III. Les mécanismes de lésions de l'ADN	29
III.1 L'exposition aux rayonnements ionisants	29
III.2 L'exposition aux UV	30
III.3 Dommages liés à la fixation de molécules réactives sur l'ADN	31
III.4 Dommages liés à l'exposition aux espèces réactives de l'oxygène (ROS)	32
III.5 Les lésions liées à la réplication.....	34
III.5.a Cassures double brin	34
III.5.b L'incorporation de ribonucléotides dans l'ADN.	34
III.6 Les R-loop générées lors de la transcription	35
IV. Les mécanismes impliqués dans la réparation de l'ADN	37
IV.1 Réparation des lésions de type modifications de bases	37
IV.1.a La réparation par photo-réactivation	37
IV.1.b La réparation par excision de nucléotides (NER)	38
IV.1.c La réparation de mésappariement de bases (MMR)	40
IV.1.d La réparation par excision de ribonucléotides	41
IV.1.e La réparation par excision de base	42
<i>Le BER dans la mitochondrie végétale</i>	<i>43</i>
IV.2 Réparation de cassures double-brin par NHEJ / MMEJ.....	44
IV.3 Réparation des cassures double brin par recombinaison homologue.....	45
IV.3.a Mécanismes et facteurs, l'exemple du DSBR.....	45
IV.3.b Cas particuliers	47
IV.3.b.i La voie du SSA.....	47
IV.3.b.ii La voie du SDSA	48
IV.3.b.iii Les voies du BIR et du MMBIR.....	48
Objectifs de la thèse	50
Avant-propos.....	52

I. Contexte de l'étude	53
II. Structure des protéines OEX1 et OEX2	53
Chapitre 1 : Etude de OEX1	55
I. Caractérisation du gène <i>OEX1</i> et de sa protéine	56
I.1 Localisation subcellulaire de la protéine OEX1 par transformation stable	56
I.2 Caractérisation du mutant d'insertion T-DNA.....	56
I.2.a Description du phénotype macromoléculaire	56
I.2.b Observation de la structure cellulaire au microscope électronique à transmission.....	57
I.3 Etude des effets de la mutation sur le génome organellaire	58
I.3.a Les mutants <i>oex1-1</i> montrent une augmentation du taux de recombinaison	58
I.3.b L'absence d'OEX1 a un effet sur la stabilité du génome	59
I.4 Rétrocroisement du mutant <i>oex1-1</i>	61
I.5 Complémentation du mutant <i>oex1-1</i>	62
I.6 Hémi-complémentations du mutant <i>oex1-1</i>	63
I.7 Production d'un anticorps spécifique à OEX1	65
I.8 Analyse de l'expression d' <i>OEX1</i> grâce au gène rapporteur GUS	65
I.9 Analyse de l'expression de <i>OEX1</i> par RT-qPCR et par western blot	66
II. Etude de l'interactome de OEX1	67
III. Caractérisation de l'activité de OEX1	69
III.1 Production de protéines recombinantes pour les tests d'activité	69
III.1.a Constructions et expression des protéines.....	69
III.1.b Purification sur colonne de Ni-NTA agarose suivi de filtration sur gel.....	70
III.1.c Purification de protéines recombinantes pour les tests d'activité.....	71
III.2 Tests d'activité de rOEX1 sur différentes structures d'ADN.....	71
III.2.a. Primo-résultats et optimisation des conditions	72
III.2.b Caractérisation de l'activité 5'-3' exonucléase	73
III.2.c Activité de rOEX1 sur des substrats de type flap	75
III.2.d Activité de rOEX1 sur de l'ADN simple brin	76
III.2.e Activité de rOEX1 sur un ADN double brin possédant une extrémité 5'-sortante.....	76
III.2.f Extension d'un gap dans l'ADN par une activité 5'-3' exonucléase	77
III.3 Tests d'activité de rOEX1 sur différentes structures contenant de l'ARN	78
III.3.a Activité de rOEX1a sur des hybrides ADN:ARN	79
III.3.b Activité de rOEX1a sur l'ARN simple brin.....	80
III.3.c Activité de rOEX1a sur une structure mimant un fragment d'Okasaki	80
III.3.d Activité de rOEX1a sur les R-loop.....	81
III.4 Comparaison de l'affinité de rOEX1a pour les hybrides et les ADN	82
III.5 Test de l'implication de OEX1 dans la dégradation des R-loop <i>in vivo</i> par DRIP	83
Chapitre 2 : Etude de OEX2	85
I. Génération d'un mutant <i>oex2</i>	86
II. Phénotype des mutants <i>oex2</i>.....	87
III. Application d'un stress génotoxique sur les mutants <i>oex2</i>	87
IV. Etude du double mutant <i>oex1 oex2</i>	88
V. Production et purification de OEX2.....	89
Discussion :.....	91

I. Avant-propos:	92
II. L'Absence de OEX1 est critique pour la mitochondrie	92
III. L'implication de OEX1 dans la réplication et les mécanismes de maintenance de l'ADN mitochondrial	96
III.1 Implication de OEX1 dans les mécanismes du BER et du RER	96
III.2 Implication de OEX1 dans la recombinaison homologue	98
III.3 Implication de OEX1 dans la maturation des fragments d'Okazaki	99
III.4 Implication de OEX1 dans l'élimination des R-loop	101
IV. Caractérisation de OEX2	102
V. Conclusions	104
Matériel	105
I. Matériel bactérien	106
I.1 La souche GV3101 d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	106
I.2 La souche TOP10 d' <i>Escherichia coli</i>	106
I.3 La souche BL21 (DE3) d' <i>Escherichia coli</i>	106
I.4 La souche Rosetta (DE3) pLysS d' <i>Escherichia coli</i>	107
I.5 La souche ArcticExpress (DE3) d' <i>Escherichia coli</i>	107
II. La levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i> de souche AH109	107
III. Matériel végétal	108
III.1 Conditions de culture des plantes d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	108
III.2 Mutant d'insertion d'ADN-T <i>oex1</i> d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	108
IV. Milieux de culture	108
IV.1 Milieu YPD	108
IV.2 Milieu SD	108
IV.3 Milieu MS	109
V. Vecteurs plasmidiques et outils génétiques	109
V.1 pGEM-T Easy	109
V.2 pDONR/Zeo	109
V.3 pGWB13, pGWB14 et pGWB604	110
V.4 pGADgwT7 et pGBKgwT7	110
V.5 pMDC162	111
V.6 pET28a	111
V.7 pKAMA-ITACHI Red	111
V.8 Gènes de synthèse	112
V.9 Oligonucléotides	112
VI. Outils informatiques	112
VII. Microscopie	113
Méthodes	114
I. Méthodes relatives aux bactéries	115
I.1 Transformation d' <i>Escherichia coli</i> par choc thermique	115
I.2 Préparation d'agrobactéries thermo-compétentes	115
I.3 Transformation d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i> par choc thermique	116
I.4 Sélection des bactéries transformées avec le vecteur pGEM®-T (Promega®)	116

I.5 Préparation de glycérol stocks	116
II. Méthodes relatives aux levures	117
II.1 Préparation de levures chimio-compétentes	117
II.2 Transformation de levures par choc thermique.....	117
II.3 Test d'interaction entre deux protéines par la technique du double hybride de levure	117
III. Méthodes relatives aux plantes	118
III.1 Etude de l'activité d'un promoteur par fusion au gène rapporteur GUS	118
III.2 Transformation transitoire de cellules végétales par biolistique	119
III.3 Agrotransformation de plants d' <i>Arabidopsis thaliana</i> par la méthode du "floral-dip"	120
III.4 Sélection par antibiotiques des plantes transformées.....	120
III.5 Sélection des plantes transformées par résistance au glufosinate	121
III.6 Stérilisation des graines d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	121
III.7 Induction d'un stress génotoxique par la ciprofloxacine	122
III.8 Croisements génétiques de deux plantes d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	123
III.9 Création d'un mutant par la technologie CRISPR/Cas9.....	123
IV. Méthodes relatives aux acides nucléiques	124
IV.1 Électrophorèse sur gel d'agarose	124
IV.2 Quantification par analyse spectrophotométrique.....	125
IV.3 Précipitation à l'éthanol	125
IV.4 Immunoprécipitation des hybrides ARN:ADN (DRIP).....	125
V. Méthodes spécifiques à l'ADN	127
V.1 Extraction d'ADN de plante par la méthode CTAB.....	127
V.2 Elimination des ARN par un traitement à la RNase A	128
V.3 Amplification d'une séquence d'ADN par PCR :	128
V.4 Purification de produits PCR :	128
V.5 PCR quantitative avec SYBR Green.....	129
V.6 Séquençage d'ADN.....	129
V.7 Digestion d'ADN par enzymes de restriction	130
V.8 Ligation de deux fragments d'ADN	130
V.8.a Ligation d'un fragment dans un vecteur linéarisé par une enzyme de restriction	130
V.8.b Ligation d'un fragment dans le vecteur pGEM®-T Easy	130
V.9 Clonage <i>via</i> la technologie Gateway	131
V.10 Préparation d'ADN plasmidique	132
VI. Méthodes spécifiques à l'ARN	133
VI.1 Extraction d'ARN à partir de matériel végétal	133
VI.2 Traitement des ARN à la DNase	133
VI.3 Réaction de transcription inverse	134
VII. Méthodes relatives aux protéines	134
VII.1 Extraction de protéines à partir de matériel végétal	134
VII.2 Séparation des protéines par électrophorèse sur gel en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)	134
VII.3 Coloration d'un gel de protéines au bleu de Coomassie.....	135
VII.4 Immunodétection des protéines.....	135
VII.5 Quantification des protéines.....	136
VII.6 Surproduction d'une protéine dans <i>Escherichia coli</i>	137
VII.7 Lyse des bactéries	137
VII.7.a Par sonication	137
VII.7.b Au Microfluidizer	137
VII.8 Purification de la protéine d'intérêt par chromatographie d'affinité	138

VII.8.a Purification par chromatographie d'affinité sur ions métalliques immobilisés (IMAC) puis gel filtration (GF)	138
VII.8.b Purification par "step-gradient" sur colonne de Ni-NTA	138
VII.9 Concentration des protéines.....	139
VIII. Méthodes relatives aux tests d'activité enzymatique.....	140
VIII.1 Marquage d'un ADN simple brin à son extrémité 5'	140
VIII.2 Marquage de l'ADN à l'extrémité 3'	140
VIII.3 Marquage des ARN en 3'	141
VIII.4 Elimination des nucléotides non-incorporés par filtration sur gel.....	141
VIII.5 Hybridation des acides nucléiques.....	142
VIII.6 Purification des substrats radiomarqués ou analyse des tests d'activité par électrophorèse sur gel de polyacrylamide non-dénaturant	142
VIII.7 Tests d'activité	143
VIII.8 Génération de mutants catalytiques par mutagenèse dirigée.....	144
IX. Méthode relative aux organelles : purification de mitochondries de plantes d'<i>Arabidopsis thaliana</i>.....	145
Bibliographie	146

Introduction

I. Vue d'ensemble de la Mitochondrie et du Chloroplaste

Bien qu'il existe des exceptions chez certains procaryotes, une des caractéristiques des cellules eucaryotes est la présence de compartiments cellulaires délimités par des membranes appelés organites ou organelles, tels que le peroxysome, le réticulum endoplasmique, le chloroplaste et la mitochondrie (Gabaldón and Pittis, 2015; Kerfeld et al., 2005). Dans cette thèse lorsque nous parlerons d'organelles, nous nous référerons à la mitochondrie et au chloroplaste uniquement.

I.1 Structure et rôles des organelles

I.1.a Les mitochondries

Les mitochondries sont de petits organites présents dans le cytoplasme des cellules eucaryotes dont la taille varie généralement de 2 à 8 μm . Leur nombre par cellule varie grandement en fonction de l'organisme étudié mais aussi du type cellulaire et de son besoin en énergie. On estime qu'une cellule eucaryote peut posséder de quelques mitochondries à plusieurs milliers ; les tissus demandeurs en énergie comme les muscles ou les tissus en développement possédant un plus grand nombre de mitochondries que les autres au sein d'un même organisme (D'Erchia et al., 2015).

Les mitochondries sont très dynamiques et leur déplacement est organisé autour du réseau de microfilaments d'actine (Doniwa et al., 2007; Zheng et al., 2009) et de microtubules dans des cellules comme les neurones de mammifères (Saxton and Hollenbeck, 2012). Elles maintiennent un équilibre constant balançant entre la fusion et la fission permettant la régulation de leur taille ainsi que la réponse à certains stress. Cette dynamique permet un échange constant de contenu entre les mitochondries à travers l'établissement d'un réseau complexe décrit chez les animaux et chez les levures. Chez ces dernières le réseau peut s'étendre à toutes les mitochondries, changeant leur conformation et permettant ainsi de former ainsi un unique réseau continu, on parle alors d'un état d'hyperfusion (Hoitzing et al., 2015). Contrairement aux levures, chez les plantes, seuls des gènes liés à la fission des mitochondries ont été identifiés. Cependant, une étude menée sur les cellules d'oignon a montré que les mitochondries des plantes sont également capables de fusion. Contrairement

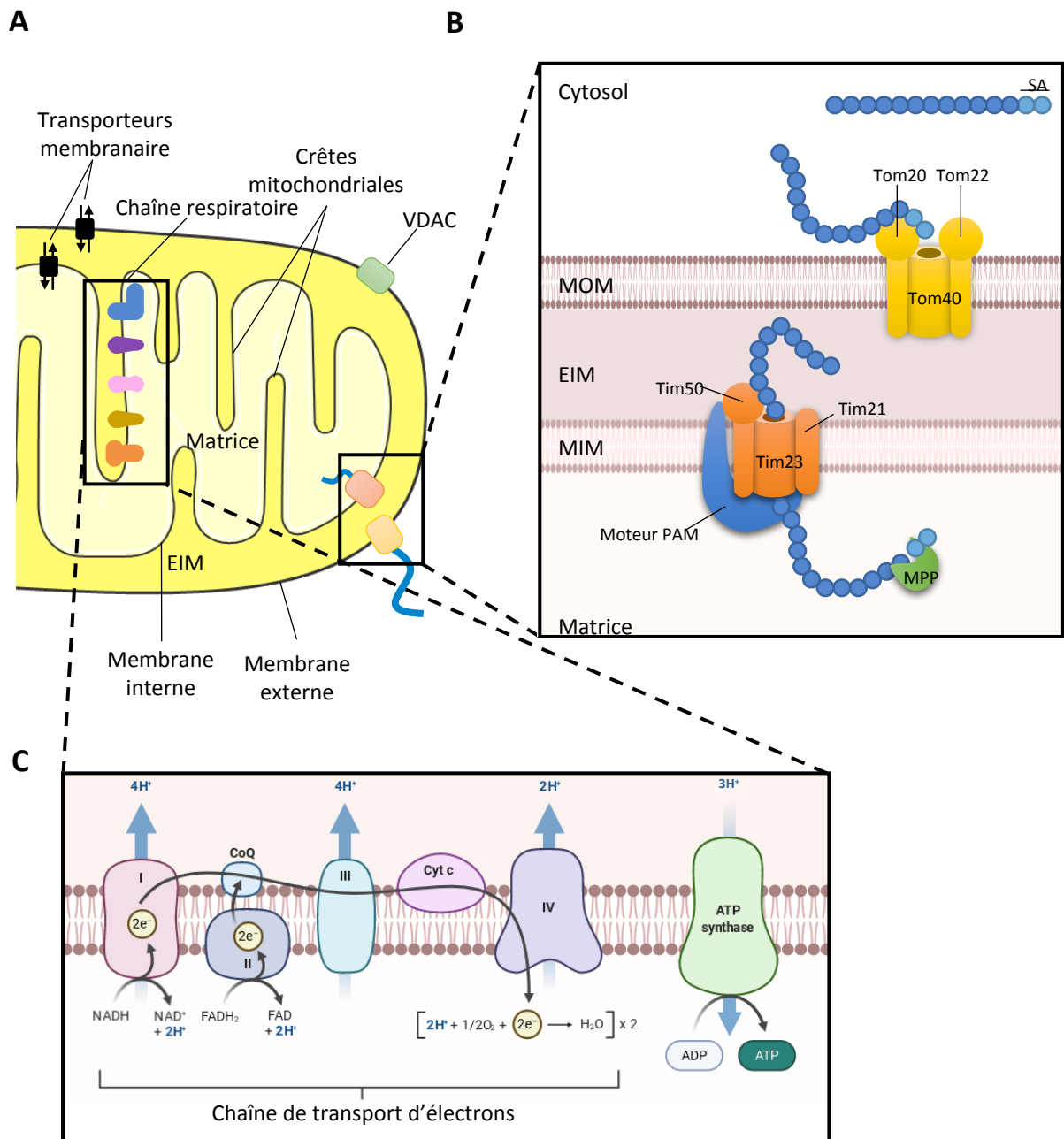


Figure I1. Représentation simplifiée de la structure de la mitochondrie

(A) La mitochondrie se compose d'une double membrane qui délimitent un espace intermembranaire et qui entourent la matrice soluble. Ces membranes sont traversées par des complexes protéiques (VDAC, TIM/TOM, transporteurs) permettant l'import d'éléments et de protéines. La membrane interne forme des invaginations appelées crêtes mitochondriales. C'est sur ces crêtes que l'on retrouve les complexes de la chaîne respiratoire. (B) Détails d'un des processus d'import de protéines dans la mitochondrie. (C) Détails du fonctionnement de la chaîne respiratoire et des complexes qui la composent, permettant à l'aide d'un gradient de protons, la phosphorylation de l'ADP en ATP par l'ATP synthase. (<https://biorender.com>)

MOM : membrane externe ; EIM : espace inter-membranaire ; MIM : membrane interne ; SA : séquence d'adressage ; Co Q : Coenzyme Q ; Cyt c : Cytochrome C

à ce qui est observé dans les cellules de levures et d'animaux, ces fusions de mitochondries semblent transitoires, dans la mesure où ni la forme ni la quantité des mitochondries observées ne semblent être modifiées, mais dans cette étude l'ensemble des mitochondries ont échangé leur contenu en une à deux heures (Arimura et al., 2004). Plus récemment, des mitochondries en état de fusion ont été observées au microscope électronique à transmission chez une algue verte, la lentille d'eau, ainsi qu'une plante à fleur, dans des conditions de stress à basses températures (Steiner et al., 2020). Cette dynamique de fusion/fission et l'établissement de ce réseau ont plusieurs utilités, elles permettent d'une part d'augmenter l'efficacité de production d'énergie et la résistance à certains stress (Hoitzing et al., 2015; Steiner et al., 2020) et d'autre part la complémentation entre mitochondries d'une même cellule en cas de mutation d'un gène essentiel. Ainsi, la mitochondrie dont l'ADN est endommagé fusionne alors à une mitochondrie "saine", permettant ainsi à la première de retrouver un génome non altéré (Schon and Gilkerson, 2010). Enfin, il a été montré notamment chez la levure, que les mitochondries abimées ne fusionnaient que peu, permettant ainsi une sélection des mitochondries saines et l'élimination par mitophagie de celles qui sont altérées (Hoitzing et al., 2015; Twig et al., 2008).

La mitochondrie est séparée du cytoplasme de la cellule grâce à sa membrane externe. A l'intérieur, une membrane interne présentant de nombreuses invaginations nommées crêtes délimite une zone interne qui est la matrice et un espace inter-membranaire. La membrane externe (MOM) est composée, à ratio égal, de lipides et de protéines. Les protéines sont majoritairement des porines permettant l'échange de composés entre le cytoplasme et la mitochondrie. Une des principales protéines "canal" est la VDAC, pour "Voltage-Dependant Anion Channel", impliquée dans le transport d'ions, de nucléotides, d'acides gras et de petits métabolites. Il a également été montré que c'est par les transporteurs VDAC que certains ARNt cytosoliques sont importés dans les mitochondries de plantes (Colombini, 2016; Salinas et al., 2006). La membrane interne (MIM) est quant à elle riche en protéines (75% de protéines contre 25 % de lipides), elle est particulièrement imperméable aux ions et aux métabolites hydrosolubles en comparaison à la membrane externe (Fontanesi, 2015) (Figure 11A). Elle comprend de nombreux transporteurs spécifiques permettant le passage de petites métabolites, et c'est sur la MIM que sont assemblés les complexes de la phosphorylation oxydative (OXPHOS).

La double membrane est traversée par le complexe TIM-TOM, pour Translocase de la membrane interne-Translocase de la membrane externe. C'est par cet important complexe que transitent les protéines dont les gènes sont codés par le noyau et adressées à la matrice mitochondriale (Pfanner and Meijer, 1997). Ces protéines possèdent un signal d'adressage situé à leur extrémité N-terminale qui sera clivé après import dans la mitochondrie. Un système similaire existe chez le chloroplaste, il est nommé TIC-TOC (Jarvis and Soll, 2001). La première étape du transport mitochondrial par le complexe TIM-TOM est la reconnaissance de la séquence d'adressage par les protéines Tom20 et Tom22, puis la protéine est envoyée vers la protéine canal Tom40. Après translocation à travers Tom40, les protéines sont prises en charge par le complexe TIM23 composé des sous-unités Tim50, Tim23 et Tim21. Tim 50 est le récepteur qui lie la séquence d'adressage des pré-protéines, il coopère avec la sous-unité régulatrice Tim21 et la protéine Tim23 qui forme un canal. Le canal est alors activé et s'ouvre pour que la pré-protéine traverse la membrane interne. Le potentiel de membrane est nécessaire pour la translocation mais n'est pas suffisant, le moteur PAM est indispensable, et la protéine HSP70 forme le cœur de ce moteur. Enfin, dans la matrice, le signal d'adressage est clivé à l'aide des protéines MPP ("Mitochondrial Processing Peptidase"). Les protéines adressées à d'autres compartiments de la mitochondrie suivent un processus différent (Pfanner and Meijer, 1997) (Figure I1B).

La présence de cardiolipides dans la membrane interne (MIM) rappelle celles des bactéries (Schlame, 2008) confortant la thèse de leur origine bactérienne. Ils lui confèrent une imperméabilité limitant le passage libre des ions, notamment des protons, une propriété nécessaire pour maintenir la différence de potentiel entre la matrice et l'espace intermembranaire (O'Rourke, 2007). Les crêtes mitochondriales permettent à la mitochondrie d'augmenter la surface disponible pour les complexes protéiques nécessaires à la phosphorylation oxydative, le rôle principal de la mitochondrie. Il permet la production d'énergie sous forme d'adénosine triphosphate (ATP) grâce à la formation d'un gradient de protons entre la matrice et l'espace intermembranaire. La chaîne respiratoire est composée de cinq complexes (Barros and McStay, 2020) (Figure I1C). Les complexes I et II sont composés de la NADH:ubiquinone oxydoréductase et de la succinate déshydrogénase qui transfèrent les électrons sur l'ubiquinone. Le complexe I permet en parallèle, par molécule de NADH oxydée, d'extraire 4 protons de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire (Cecchini, 2003; Sun et al., 2005; Zickermann et al., 2008) Le complexe III permet le transfert d'électrons

vers le cytochrome c (Mitchell, 1975) et le transfert de 4 protons à travers la membrane interne. Le complexe IV, composé de la cytochrome C oxydase, pompe 2 protons de la matrice vers l'espace intermembranaire et permet le retour de deux électrons dans la matrice mitochondriale à travers la réduction de l'O₂ en H₂O (Mansilla et al., 2018). Le complexe V quant à lui est composé de l'ATP-synthase qui permet l'ajout d'un phosphate à une molécule d'ADP par passage de 3 protons de l'espace intermembranaire vers la matrice. Une voie alternative existe chez les plantes, les champignons et les protistes, elle implique l'Alternative Oxydase (AOX). Cette voie court-circuitée, au niveau du pool des quinones, deux sites de pompage de protons et catalyse la réduction de l'oxygène en eau sans générer de gradient de proton, contrairement au flux d'électrons de l'ubiquinone vers le complexe IV. Elle est donc très peu ou pas productrice d'ATP (Vanlerberghe, 2013). Il a été montré que les gènes codants pour l'AOX sont notamment surexprimés en conditions de stress. Son action, couplée à celle des NAD(P)H déshydrogénases alternatives, permet de moduler les fluctuations de la chaîne respiratoire et d'améliorer la tolérance aux stress. Ainsi, la régulation des gènes liés à cette voie alternative permet la régulation de la production d'ATP mais surtout d'éviter un état de trop forte réduction de la chaîne de transport d'électrons qui pourrait mener à la production d'espèces réactives d'oxygène (ROS) (Rasmusson et al., 2009).

Les mitochondries sont aussi le centre de la β -oxydation, procédé par lequel des acides gras sont dégradés pour former d'une part de l'acétyl-CoA nécessaire au cycle de Krebs, et d'autre part du NADH et du FADH₂, nécessaires à la chaîne de transport d'électrons (Houten and Wanders, 2010)

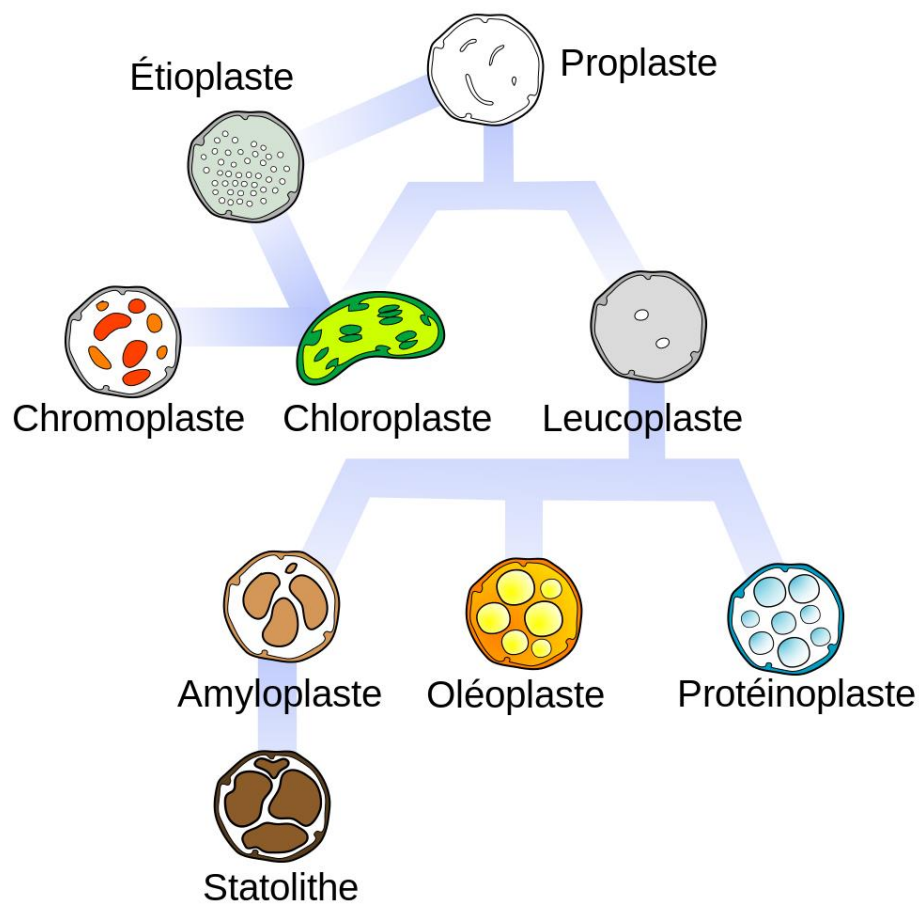
Elles ont également un rôle prépondérant dans la régulation de l'apoptose, une mort cellulaire programmée nécessaire, par exemple, lors du développement ou lorsque la cellule est malade afin de protéger les cellules voisines (Jeong and Seol, 2008) Elles sont également impliquées dans la régulation du cycle cellulaire et la génération des clusters fer-souffre (Goldberg et al., 2008; Mackenzie and McIntosh, 1999; Pesaresi et al., 2007) ainsi que dans la biosynthèse de la biotine et du folate chez les plantes (Rébeillé et al., 2007). Enfin, chez les plantes, le mécanisme de la photorespiration ne peut se faire entièrement dans le chloroplaste. Certains facteurs nécessaires comme la glycine-décarboxylase et la sérine-hydroxyméthyltransferase ne sont disponibles que dans la mitochondrie. Ainsi, la photorespiration nécessite une coordination entre la mitochondrie, le chloroplaste et le peroxysome (Bauwe et al., 2010).

Les mitochondries sont des organites cytosoliques retrouvés chez la quasi-totalité des eucaryotes. Certaines espèces, du fait de leur mode de vie particulier tels que les protistes parasites, possèdent des mitochondries diminuées ou mitochondrion-related organelles (MRO) (Makiuchi and Nozaki, 2014). Ce sont des compartiments cellulaires semblables aux mitochondries mais ne possédant pas certaines fonctions ou même de génome. Parmi eux, on trouve les mitosomes, les hydrogénosomes et des organelles appelées mitochondrion-like. Les mitosomes ont été identifiés pour la première fois en 1999 (Tovar et al., 1999). Présents chez des organismes anaérobies, ils sont composés de deux membranes. Contrairement aux mitochondries, les mitosomes ne sont pas capable de réaliser la phosphorylation oxydative et ne possèdent pas de génome organellaire (Léon-Avila and Tovar, 2004).

Les hydrogénosomes ont été découverts et purifiés pour la première fois en 1973 (Lindwiark and Muller, 1973). Tout comme les mitochondries ils sont composés de deux membranes, une interne et une externe, mais différent de ces dernières par leur mécanisme de production d'ATP. L'organite fourni de l'énergie à la cellule grâce à la voie métabolique fermentaire du pyruvate et produit ainsi de l'ATP et de l'hydrogène dont l'organite tire son nom (Muller, 1993). Ces organites ne sont pas considérés comme des mitochondries. La chaîne de transport d'électrons y est absente et les mitosomes, ainsi qu'une partie des hydrogénosomes, ne contiennent pas de génome, mais ils restent un compartiment cellulaire possédant une double membrane et capable d'assembler des clusters fer-souffre (Miller et al., 2018). Actuellement, les seuls eucaryotes identifiés comme ne possédant aucune trace de mitochondrie ou de gènes mitochondriaux dans le noyau sont les *Monocercomonoides* (Karnkowska et al., 2016)

1.1.b Les chloroplastes

Les plastes se présentent comme des compartiments cellulaires longiformes d'environ un micromètre de large pour 10 µm de long. Il existe différents types de plastes, dérivant de proplast, qui se différencient en fonction des conditions environnementales et développementales. Lorsque le proplaste des feuilles est exposé à la lumière, il se différencie en chloroplaste afin d'effectuer la photosynthèse. Si le proplaste n'est pas exposé à la lumière, il se différencie en étioplaste. Les proplastés présents dans des organes colorés tels que les pétales se différencient en chromoplastes et stockent les pigments du jaune au rouge. Dans des organes de réserves, les proplastés peuvent se différencier en amyloplastés, oléoplastés



De Wikipédia (wikipedia.org)

Figure I2. Présentation des différents type de plastes.

Les proplastes se différencient afin de se spécialiser dans une fonction. Les chloroplastes sont le siège de la photosynthèse, alors que les amyloplastes, oléoplastes et protéinoplastes sont des espaces de stockage. Selon les conditions environnementales et les besoins de la cellule, ceux-ci peuvent de différencier puis se spécialiser dans un autre type de plaste.

ou protéinoplastes afin de créer une espace de stockage de l'amidon, de lipides ou de protéines respectivement (Figure I2)(Botté and Maréchal, 2014; Pogson et al., 2015; Sadali et al., 2019). Les amyloplastes peuvent alors se spécialiser en statolithes qui sont capables de percevoir la gravité. Le leucoplaste quant à lui est impliqué dans la biosynthèse des acides gras ou des acides aminés. La particularité des plastes est qu'ils sont capables de se dé-différencier puis de se re-spécialiser en un type de plaste différent si les conditions le nécessitent. Dans cette thèse nous concentrons nos études sur les chloroplastes.

Les chloroplastes sont composés d'un stroma séparé du cytoplasme par une double membrane lipidique. Le stroma contient lui-même des compartiments supplémentaires nommés thylakoïdes qui sont composés d'un lumen entouré d'une membrane. Ces thylakoïdes peuvent être empilés et forment ainsi des grana. C'est dans la membrane des thylakoïdes que sont ancrés les complexes principaux de la photosynthèse. Tout comme dans le cas de la mitochondrie, une grande partie des protéines nécessaires au fonctionnement du chloroplaste est codée par le noyau et envoyée à l'organelle, le plus souvent grâce à un signal d'adressage situé en N-terminal de la protéine. Similairement au complexe d'import de protéines "TIM-TOM" de la mitochondrie, on retrouve chez le chloroplaste le complexe TIC-TOC (Chen and Li, 2017).

C'est dans la membrane des thylakoïdes que sont ancrés les complexes principaux nécessaires à la photosynthèse, qui est une activité essentielle de la vie sur terre. D'une part car elle permet aux organismes d'utiliser l'énergie lumineuse pour transformer de l'ADP en ATP et le dioxyde de carbone en une molécule organique assimilable par l'organisme : le glucose, et d'autre part car elle est à l'origine de l'oxygène sur terre nécessaire à la vie de la plupart des organismes (Dismukes et al., 2001). Elle se déroule en deux phases, la phase lumineuse dépendante de l'apport en photons qui permet la formation d'ATP et NADPH et la phase sombre utilisant les produits de la phase précédente pour absorber et réduire le dioxyde de carbone afin de former des composés organiques. La première phase se déroule au niveau des thylakoïdes et la deuxième dans le stroma. Dans le principe, le photosystème II (PSII), situé dans les grana, agit comme une antenne réceptrice qui utilise l'énergie lumineuse à une longueur d'onde de 680 nm et l'eau présente dans le lumen pour en extraire les protons et former du dioxygène. Cette étape permet notamment de libérer un électron énergétique qui est transporté sur une chaîne d'accepteurs d'électron jusqu'à la plastocyanine. Durant le processus, 2 protons sont pompés du stroma vers la lumière du thylakoïde. La plastocyanine

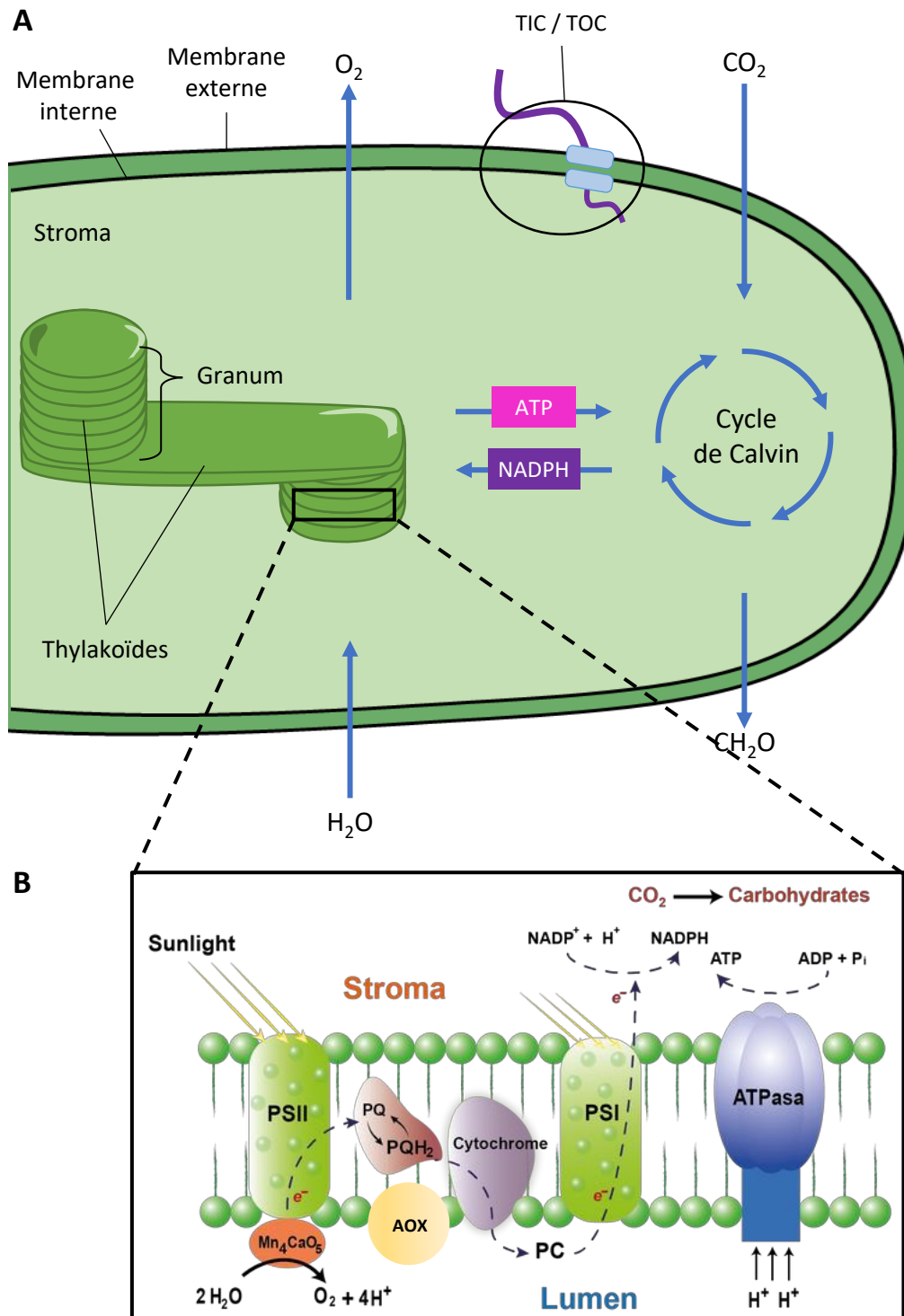


Figure I3. Représentation schématique de la structure du chloroplaste

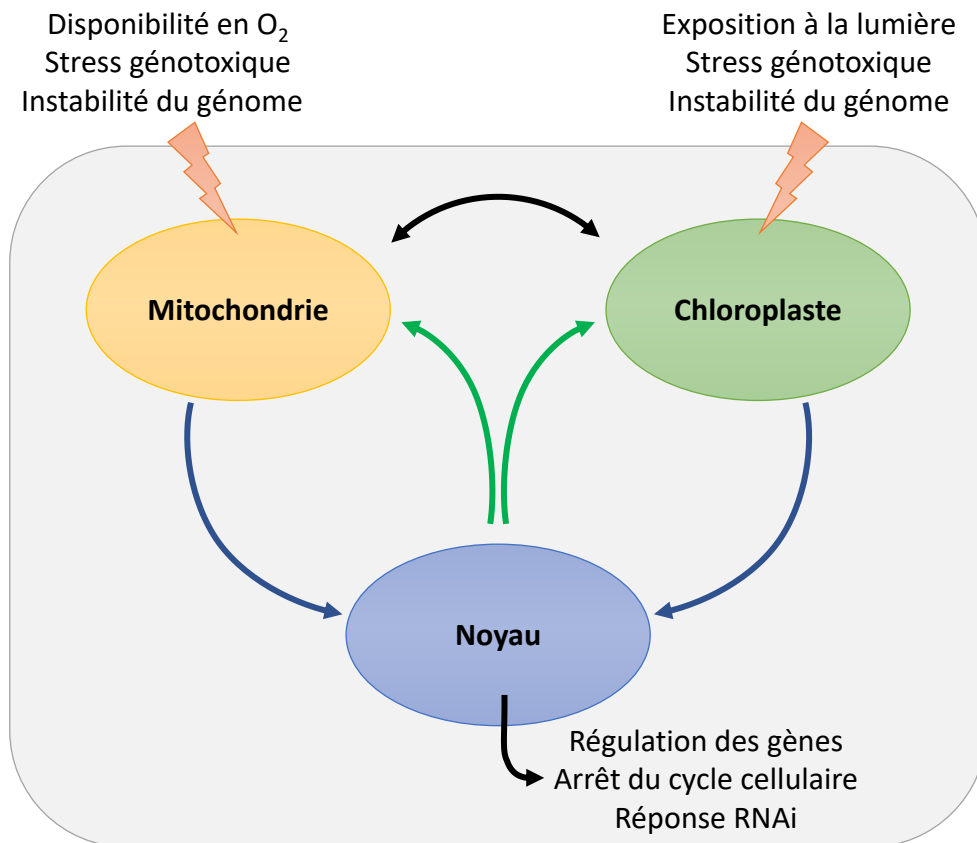
(A) Le chloroplaste se compose d'une double membrane délimitant un espace intermembranaire. Ces membranes sont traversées par les complexes de transport protéiques TIC/TOC. La membrane interne entoure le stroma qui contient des compartiments appelés thylakoïdes. C'est dans le lumen de ces derniers qu'a lieu la photosynthèse. Inspiré de Johnson, 2016 (B) Schéma récapitulatif de la phase lumineuse de la photosynthèse qui permet de générer de l'énergie sous forme d'ATP et de NADPH (lumenlearning.com).

transfère l'électron au photosystème I (PSI) qui, sous rayonnements lumineux à 700 nm, libère un nouvel électron énergétique qui, transitant par une chaîne de transporteurs d'électrons, lui permet de réduire le NADPH en NADPH₂. Les protons contenus dans le lumen générés par ces étapes sont relâchés vers le stroma à travers une ATP-synthase permettant la réduction d'ADP en ATP. L'énergie produite sous forme de NADPH et d'ATP est alors utilisée pour alimenter la phase sombre durant laquelle le CO₂ est transformé en molécules organiques pouvant servir à la production de glucose, d'acides gras et d'acides aminés (Figure I3).

Les chloroplastes sont également capables de se déplacer au sein des cellules du mésophylle en fonction de l'exposition à la lumière. Cette particularité leur permet d'optimiser le rendement de la photosynthèse en se dirigeant vers la source de lumière lorsque celle-ci est faible. C'est également un système de protection lorsque l'exposition à la lumière est trop intense. En effet, si les chloroplastes sont trop exposés à la lumière ils génèrent des ROS en excès pouvant altérer son génome. Chez les plantes supérieures, ce sont deux protéines appelées phototrophines qui régulent ce mouvement (Dismukes et al., 2001). Les chloroplastes envoient également un signal rétrograde au noyau lui indiquant de réguler la production de certaines protéines en fonction du taux d'ensoleillement (Li et al., 2009).

I.1.c Les conséquences d'un dysfonctionnement des organelles

De par leurs rôles dans des fonctions cellulaires essentielles comme la production d'énergie, les dysfonctionnements des organelles peuvent avoir de graves conséquences sur l'organisme. Chez les hommes, de nombreuses maladies neurodégénératives sont associées aux mitochondries telles que la maladie de Parkinson ou la chorée de Huntington (Lee et al., 2009; Zhou et al., 2018). Ils sont également mis en avant comme ayant un rôle sur le développement de cellules oncogènes (Ju et al., 2014). Chez les plantes, un dysfonctionnement des mitochondries peut engendrer des plantes faibles, stériles, présentant un retard de croissance voire une létalité embryonnaire. Celui-ci peut avoir plusieurs origines comme par exemple la mutation d'un gène nucléaire codant pour une protéine organellaire impliquée dans des mécanismes de réparation ou de réplication de l'ADNmt qui impactera la maintenance du génome. Ainsi, la mutation du gène nucléaire codant pour la protéine RADA, un facteur possédant un rôle clé lors de la recombinaison homologue, entraîne un sévère retard de croissance (Chevigny et al., 2019). De même, la mutation simultanée des deux gènes codant pour les ADN polymérase organellaires POL1A et POL1B entraîne une létalité



D'après Woodson and Chory 2008

Figure I4. Représentation schématique de la communication entre les compartiments cellulaires

Les compartiments cellulaires perçoivent différents signaux exogènes et endogènes comme l'exposition à la lumière, les ROS, les dommages aux génomes ou la disponibilité en oxygène. La communication cellulaire permet aux organelles d'informer le noyau de son état et à ce dernier de répondre afin de moduler les activités des chloroplastes et des mitochondries. Les signaux rétrogrades sont représentés par des flèches bleues et les signaux antérogrades par des flèches vertes. *D'après Woodson and Chory 2008.*

embryonnaire (Parent et al., 2011). Mais les dysfonctionnements peuvent aussi être dus à la création de gènes chimeriques (Marienfeld and Newton, 1994) ou de phases de lecture ouvertes (*orf*) résultant de recombinaisons ectopiques. Ces gènes chimeriques et ces *orf* peuvent produire des protéines toxiques pour la mitochondrie. Elles sont notamment une des causes de la stérilité mâle cytoplasmique (CMS) (Stamper et al., 1987). Enfin on peut citer les dysfonctionnements dus à des conditions environnementales, tels que la surexposition aux rayons lumineux ou le manque de substrats pour la phosphorylation oxydative.

La stérilité mâle cytoplasmique se distingue du phénotype de stérilité classique retrouvé dans certains mutants de gènes codant pour des protéines adressées aux organelles. C'est une stérilité n'affectant pas le développement général de la plante, ni les organes femelles mais elle est provoquée par une inaptitude de la fleur à produire du pollen ou des anthères fonctionnelles. Comme son nom l'indique, dans la CMS le phénotype est transmis par l'information génétique du cytoplasme. On distingue trois types de CMS, en fonction de la cause de la stérilité. La stérilité de type sporophytique est caractérisée par une absence de pollen due à une déficience des cellules nutritives de l'anthère (tapetum). La stérilité liée aux mécanismes de développement de la fleur induisant une absence des organes mâles est appelée homéotique. Enfin la CMS due à une déficience lors de la gamétogenèse du pollen est appelée stérilité mâle gamétophytique (Carlsson et al., 2008; Du et al., 2019; Pring et al., 1999). Le phénotype de CMS est largement utilisé en agronomie, il permet une facilitation des croisements entre plusieurs variétés de plantes se reproduisant par autofécondation. Les fleurs ne produisant pas de pollen viable, l'étape d'émasculature des plantes est évitée, le rendement des croisements est accru et la sélection facilitée (Guo and Liu, 2012). La CMS permet également le maintien des lignées pour les plantes de type allogames, évitant ainsi le brassage génétique provoqué par la pollinisation par d'autres variétés.

Les dysfonctionnements des organelles pouvant avoir des conséquences délétères, la cellule possède un réseau de communication entre les organelles et le noyau pour rapidement répondre aux stress. Ainsi, les organelles peuvent générer des signaux rétrogrades vers le noyau qui auront pour conséquence de reprogrammer le métabolisme et la croissance des cellules (Figure 14). Chez les animaux, les réponses rétrogrades (RR) ont été largement étudiées, elles sont déclenchées par différents facteurs de stress mitochondriaux, comme la perturbation des complexes de la OXPHOS, la perte du potentiel de la membrane mitochondriale, des défauts de repliement / d'assemblage des protéines et des mutations

dans l'ADNmt (Quirós et al., 2016). Ainsi, le noyau va répondre par l'induction de cascades de signalisation, de facteurs de régulation du cycle cellulaire (Owusu-Ansah et al., 2008) mais aussi des voies d'interférences ARN (Mao et al., 2020). Chez les plantes de nombreuses études ont été réalisées pour comprendre les voies de communication entre le chloroplaste et le noyau. Elles ont notamment identifié les signaux qui régulent l'étape dite de "contrôle biogénique" prenant place durant les premières étapes de développement des chloroplastes. Les études récentes explorent plus largement les signaux envoyés par les chloroplastes, notamment au stade pleinement actif (Grübler et al., 2021; Kleine and Leister, 2016; Pogson et al., 2015). Les réarrangements de l'ADNcp déclenchent également des signaux rétrogrades. Ainsi, à la suite de la perte du gène codant pour la protéine MSH1, impliquée dans la maintenance du génome, on observe un remodelage épigénétique en lien avec une plasticité accrue de la croissance des plantes (Virdi et al., 2015; Yang et al., 2020a). Une surexpression de gènes reliés aux stress abiotiques et de facteurs inhibiteurs du cycle cellulaires tels que SMR5 et SMR7 ont également été observés lorsqu'une instabilité du génome chloroplastique est induite, dans le triple mutant *reca1 why1 why3* (Duan et al., 2020).

I.2. Les origines : la théorie endosymbiotique

Parmi les organelles de la cellule, seuls la mitochondrie et le chloroplaste possèdent un génome qui code pour une partie des facteurs nécessaires à leurs activités, en faisant des organites semi-autonomes. Cette particularité est l'héritage de leur origine procaryotique (Gray, 1999). Certains détails et la chronologie des événements sont toujours l'objet de discussions, mais les scientifiques s'accordent autour de la théorie endosymbiotique pour expliquer l'origine de ces deux compartiments (Sagan, 1967). D'après cette théorie, un micro-organisme aurait endocyté une α -protéobactérie il y a environ 1,5 milliard d'années. Cet eucaryote primaire aurait bien plus tard lui-même endocyté une cyanobactérie et ces deux bactéries auraient co-évolué avec la cellule hôte vers la mitochondrie et le chloroplaste, respectivement. La présence d'ADN dans ces organites ainsi que leurs doubles membranes sont considérées comme de solides arguments en faveur de cette théorie (Sagan, 1967). Si les scientifiques s'accordent sur la nature de l'organisme endocyté (une α -protéobactérie pour la mitochondrie), il subsiste encore des doutes sur la nature du second endosymbionte qui pourrait être une bactérie, un eucaryote primaire ou une archée selon les différentes

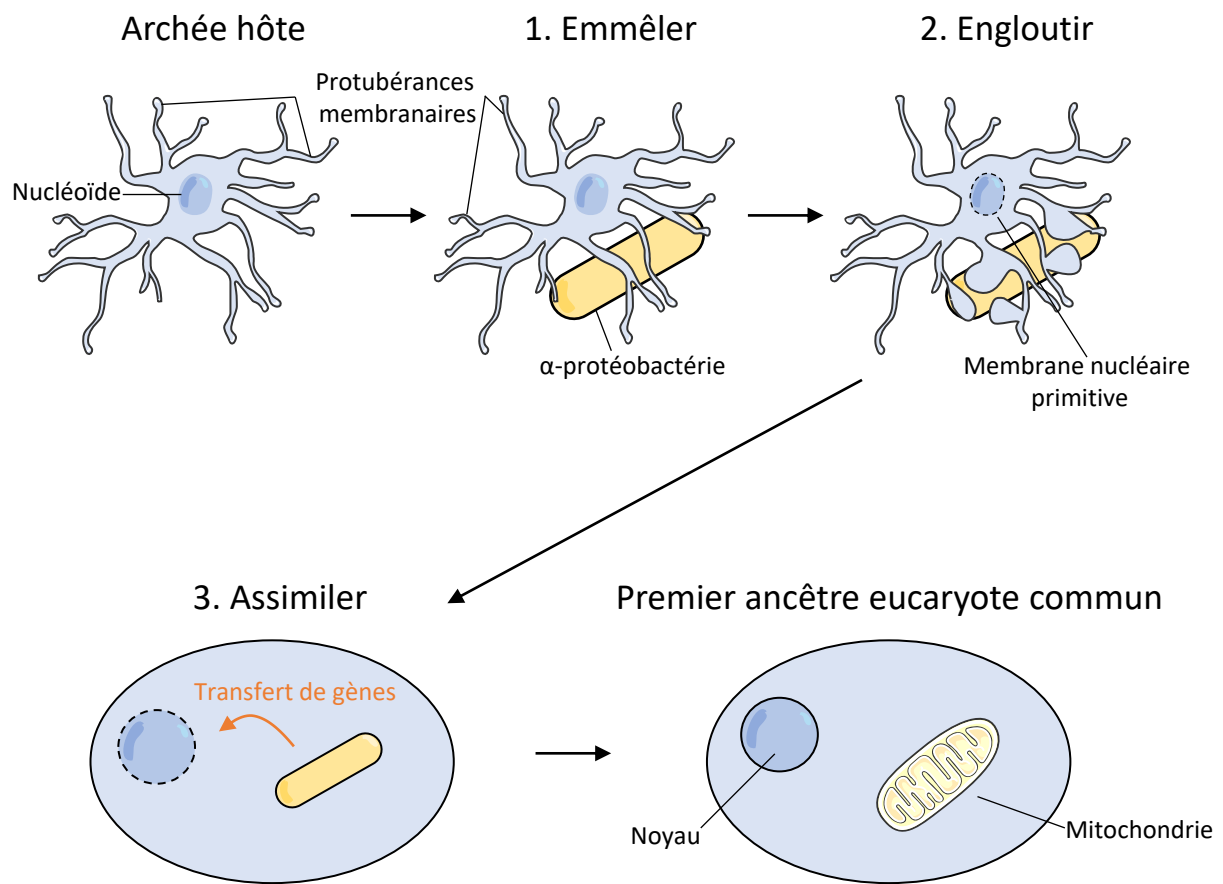


Figure I5. Schéma synthétique représentant la théorie endosymbiotique selon le modèle E3 : Emmêler, Engloutir, Assimiler.

Une archée ancestrale proche de la famille des *Asgardarchaeota* englobe une α -protéobactérie aérobique avec ses protubérances membranaires. Un système d'échange de composés se met en place entre les deux organismes. L'archée finit par engloutir la bactérie jusqu'à l'assimiler. Les gènes devenus inutiles pour la bactérie sont soit perdus soit transférés au noyau qui s'est formé progressivement, générant ainsi le premier ancêtre eucaryote commun.

Schéma réalisé à partir de Imachi et al., 2020

hypothèses (Wang and Wu, 2015). La théorie considérant l'endosymbiose par un eucaryote primaire souligne l'incapacité des bactéries et des archées à effectuer une phagocytose nécessaire à l'intégration de l' α -protéobactérie. Cette hypothèse considère alors les mitochondries comme la dernière étape de formation du dernier ancêtre commun eucaryote appelé LECA ("*Last Eukaryote Common Ancestor*"). Cette théorie est appelée celle du mito-last, en opposition avec celle du mito-early qui place l'évènement de l'endosymbiose avec une archée comme une des premières étapes de l'eucaryogenèse (Poole and Gribaldo, 2014). L'eucaryogenèse étant la période durant laquelle le microorganisme primaire a évolué jusqu'à l'état d'eucaryote actuel. Elle est située entre la formation du premier ancêtre commun eucaryote (FECA) et la formation du LECA. La récente découverte d'un nouveau groupe d'archées nommées *Asgardarchaeota* a permis ces dernières années de faire évoluer les hypothèses. Les études portant sur ces archées montrent qu'elles partagent des traits communs avec les eucaryotes, comme l'existence de profilines, des protéines impliquées dans la régulation des microfilaments d'actine, suggérant les débuts du cytosquelette (Akil and Robinson, 2018). De plus, les profilines jouent un rôle dans les mécanismes de phagocytose que l'on suppose être à l'origine de l'endosymbiose, mais dont on ne trouve aucune trace chez les procaryotes. Plusieurs observations vont cependant à l'encontre de cette hypothèse. Bien que les *Asgardarchaeota* possèdent des gènes codant pour des protéines retrouvées chez les eucaryotes, ces archées sont trop petites (500 nm de diamètre) et manquent de certains facteurs essentiels à cette opération pour être capables de phagocytose (Burns et al., 2018). Ainsi, une nouvelle hypothèse est proposée depuis quelques années, elle décrit l'endosymbiose non pas comme le fruit d'un évènement unique de phagocytose, mais comme progressive et comptant trois étapes nommées le modèle E³ pour "*Entangle-Engulf-Endogenize*", ou "*Emmêler-Engloutir-Assimiler*" (Imachi et al., 2020) (Figure 15). Cette hypothèse met l'accent sur une eucaryogenèse progressive et compatible avec les données actuelles sur les procaryotes. Chez les archées de type *Asgardarchaeota*, des protubérances membranaires qui pourraient entourer la bactérie à endocyter ont été observées au microscope. Ces filaments pourraient permettre d'établir un premier lien entre les deux organismes. L'endocytose se fait alors progressivement. Les futures études de ce groupe permettront certainement une avancée dans la compréhension du passé des eucaryotes et des mitochondries. En effet, en 2020, une équipe a pour la première fois réussi à cultiver une

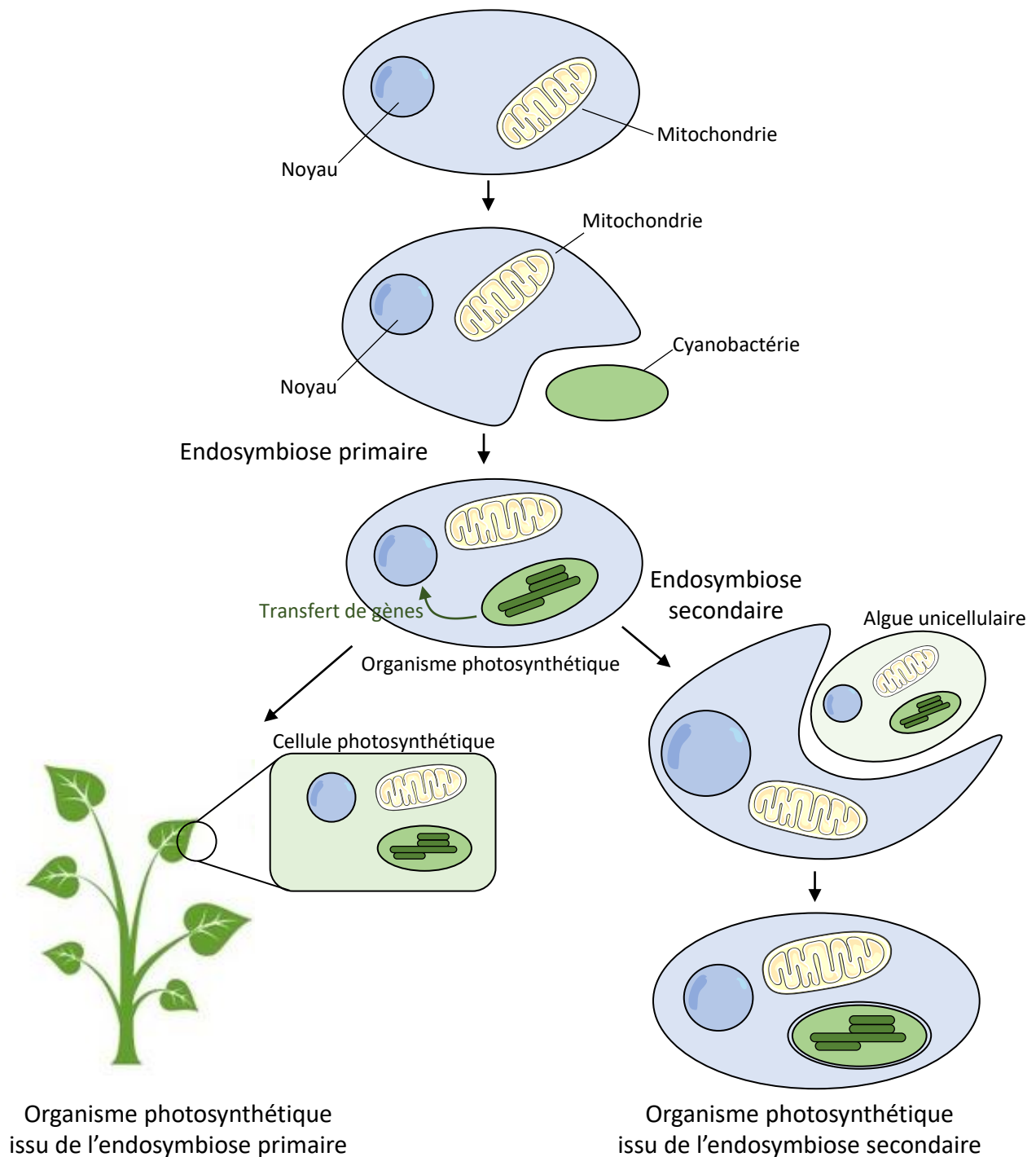


Figure I6. Schéma représentant les évènements d'endosymbiose primaire et secondaire.

Une endosymbiose a eu lieu entre un eucaryote ancestral et une cyanobactérie. Une partie du génome de cette dernière devenant inutile, des gènes sont soit perdus soit transférés vers le noyau, formant les premiers organismes photosynthétiques. Certains d'entre eux endocytent à nouveau une algue unicellulaire et c'est de cette endosymbiose secondaire que proviennent par exemple les euglènes ou les dinoflagellés. Une endosymbiose tertiaire est mise en cause dans la formation d'espèces comme les *lepidodinium*.

souche de ces archées (*Candidatus Prometheoarchaeum syntrophicum*) en laboratoire, ouvrant ainsi la possibilité de nouvelles analyses (Imachi et al., 2020).

L'origine des chloroplastes est plus tardive que celle des mitochondries, conduisant à des embranchements d'eucaryotes ne possédant pas de plastes. Par observation et comparaison des plastes retrouvés dans les organismes contemporains, on considère plusieurs événements d'endosymbiose. Le premier est le plus connu, il est souvent le seul évoqué lorsque l'on parle de l'origine des chloroplastes et s'agit de l'endosymbiose d'une cyanobactérie avec un eucaryote primaire. La présence de certaines protéines typiques des cyanobactéries dans la membrane externe des chloroplastes confirme cette théorie (Sommer et al., 2011). Les plastes retrouvés chez les plantes terrestres et les algues vertes découlent de cette endosymbiose. Un second événement appelé endosymbiose secondaire décrit l'endocytose d'un eucaryote contenant déjà un plaste (une algue unicellulaire) par un eucaryote non photosynthétique (Figure I6). De la même manière, on décrit des événements d'endosymbiose tertiaire menant à certains clades comme *Dinophysis*. Cette thèse est notamment appuyée par la présence de trois à quatre membranes autour du plaste : en plus de la double membrane présente chez tous les plastes, on y retrouve la membrane plasmique du premier hôte et celle du dernier hôte (McFadden, 2001).

I.3 L'évolution des génomes organellaires

Une fois les deux organismes intégrés par l'eucaryote en formation, certaines fonctions de l' α -protéobactérie et de la cyanobactérie sont devenues soit inutiles, du fait du milieu protecteur qu'offre l'hôte, soit redondantes avec les fonctions exercées par l'hôte. Ainsi, au cours de l'évolution, la mitochondrie et le chloroplaste en devenir ont perdu une grande partie des gènes pour lesquels ils codaient à l'origine (Adams and Palmer, 2003). D'autres gènes, nécessaires à l'activité des organelles, ont été transférés vers le noyau. Ils y sont transcrits puis traduits dans le cytoplasme. Les protéines sont ensuite adressées aux organelles cibles. Ce transfert de gènes vers le noyau peut s'expliquer par deux avantages. Le premier est la forte production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) par les activités des organelles, pouvant altérer leurs génomes. Ces ROS sont produits par la chaîne respiratoire mitochondriale et la machinerie de photosynthèse du chloroplaste. Ainsi, le transfert de gènes vers le noyau protégerait ces génomes. Le second avantage est une plus grande facilité de contrôle et de

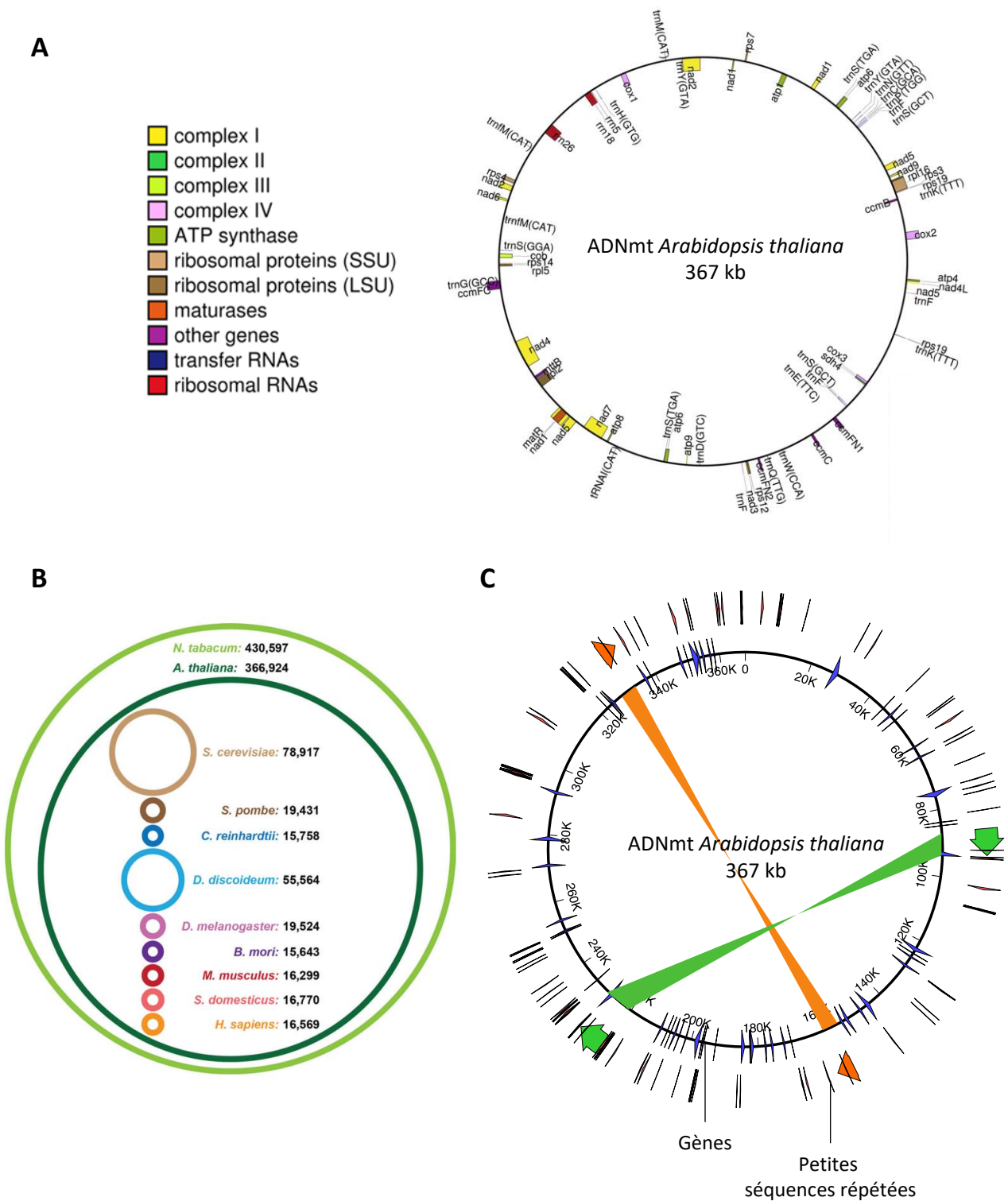


Figure 17. Représentations schématiques sous forme circulaire du génome mitochondrial d'*A. thaliana*.

(A) Représentation indiquant les gènes présents dans l'ADNmt. Ils codent pour des ARNt, les complexes de la chaîne respiratoire et les facteurs nécessaires à la traduction. (B) Comparaison de la taille des génomes mitochondriaux de plusieurs organismes modèles (D'après Morley et Nielsen, 2017) (C) Carte du génome mitochondrial d'*Arabidopsis thaliana* représentant les gènes, les grandes séquences répétées en vert et orange, ainsi que les petites séquences répétées (50 à 500 pb).

régulation des gènes par le noyau. La cellule peut ainsi directement moduler l'activité des organelles en fonction des besoins et des conditions exogènes, par induction ou répression des gènes. Les transferts de gènes des organelles au noyau sont des mécanismes complexes et longs à mettre en place. La première étape est le transfert d'une séquence d'ADN de l'organelle vers le noyau, puis l'intégration dans le génome. Cette intégration se faisant probablement de façon aléatoire, les chances que la séquence s'insère dans un gène nucléaire, le rendant ainsi inactif, sont non-négligeables. L'insertion n'est alors pas conservée. Si le gène est intégré dans une séquence de façon non délétère, celui-ci doit être transcrit et doit intégrer un signal d'adressage au bon compartiment cellulaire. Il faut également acquérir un mécanisme de régulation permettant de moduler l'expression de ces gènes en fonction des besoins. Enfin, le gène redondant situé dans les organelles peut-être inactivé ou délété à travers les nombreux événements de recombinaison qui y ont lieu (Blanchard and Lynch, 2000; Brennicke et al., 1993; Huang et al., 2003). Les événements de transfert de gènes ne sont cependant pas unidirectionnels. On retrouve par exemple dans le génome mitochondrial d'*A. thaliana* plusieurs séquences d'origine chloroplastique, nucléaire mais aussi d'origine virale (Marienfeld et al., 1999).

I.4 Structure et organisation des génomes organellaires

Les génomes mitochondriaux sont relativement constants en termes de contenu. Par exemple, le génome humain code pour 37 gènes (22 ARNt, 2 ARN ribosomiques et 13 protéines) et l'ADNmt d'*A. thaliana* pour 57 gènes (22 ARNt, 3 ARN ribosomiques et 32 protéines)(Anderson et al., 1981; Unseld et al., 1997). Ces gènes codent principalement pour des éléments de la chaîne de transport d'électrons et de la machinerie de traduction mitochondriale, les autres facteurs nécessaires à l'activité de l'organelle étant codés par le noyau et adressés à la mitochondrie (Figure I7A). Si l'on compare le génome mitochondrial aux génomes des *Rickettsiales*, des bactéries considérées comme les plus proches de la mitochondrie, on observe une réduction de 98,5 % de la taille et de 95 % du nombre de séquences codantes (Roger et al., 2017). Bien que le nombre de gènes soit relativement constant, la taille des génomes mitochondriaux est très variable d'un organisme à un autre. L'ADN mitochondrial (ADNmt) des animaux est très petit et condensé. Chez l'homme, l'ADNmt est long de 16,5 kb, il est composé presque exclusivement de séquences codantes et est

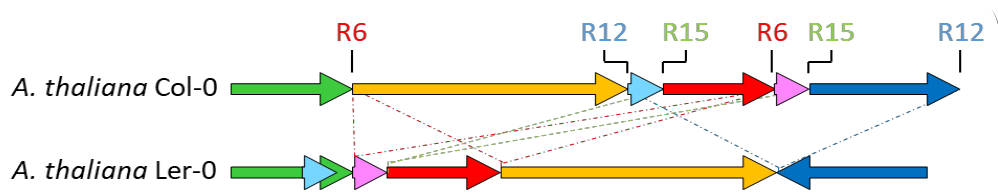
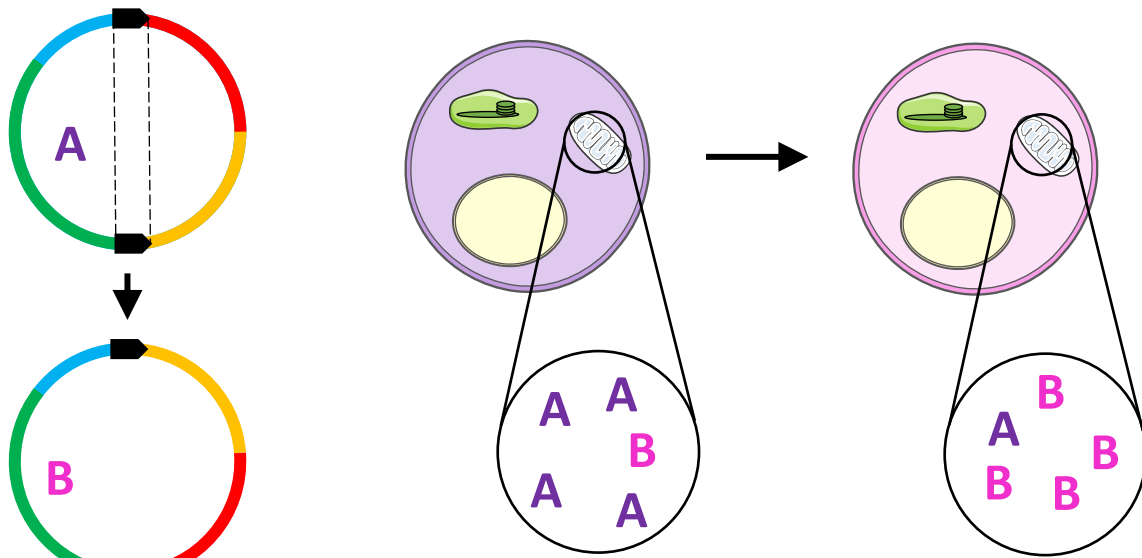
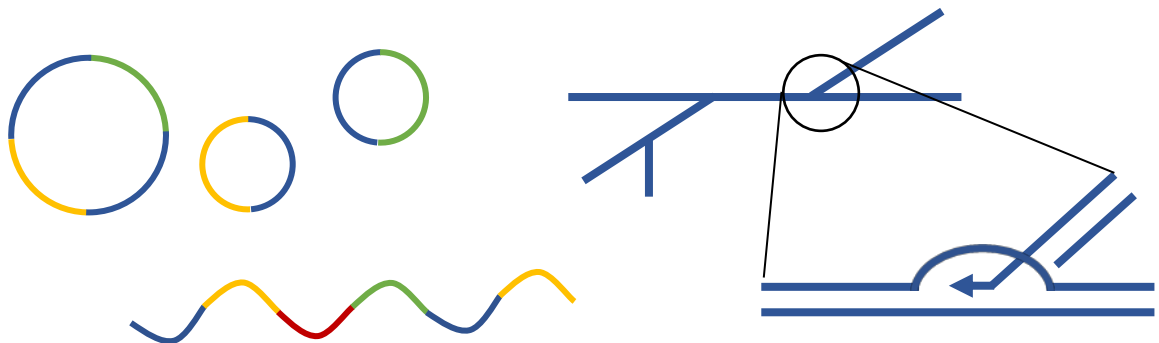
A**B****C**

Figure 18. Les séquences répétées de l'ADNmT sont responsables de l'évolution rapide du génome.

(A) La comparaison des séquences des ADNmT des écotypes Columbia (Col-0) et Landsberg (Ler-0) d'*A. thaliana* montrent une réorganisation de séquences bordées par des séquences répétées. Tiré de Kühn & Gualberto 2012. (B) Une recombinaison entre deux séquences répétée peut produire un génome alternatif présent en d'infimes quantités dans la mitochondrie. Suite à un shift stœchiométrique, ce génome peut devenir prédominant. (C) L'ADNmT peut se trouver sous forme de sous-génomes circulaires, sous forme linéaire concatémérique et sous forme branchée (possiblement des intermédiaires de recombinaison).

dépourvu de séquences répétées (Anderson et al., 1981). L'ADN mitochondrial des levures quant à lui est variable, l'ADNmt de *Saccharomyces cerevisiae* compte environ 78 kb alors que celui de *Saccharomyces pombe* ne compte que 19 kb, et contrairement à l'ADNmt des animaux celui des levures contient des introns. L'ADNmt des plantes terrestres en revanche est bien plus grand pour un nombre de gènes similaire (37 pour l'homme, 57 pour l'*Arabidopsis*). Il varie en général de 200 à 700 kb mais peut atteindre des tailles bien plus grandes comme chez certaines espèces de Silène où l'ADNmt mesure plus de 11Mb (Sloan et al., 2012; Wu et al., 2015). Les plantes modèles *A. thaliana* et *Nicotiana tabacum* possèdent des ADNmt de 367 et 430 kb respectivement (Morley and Nielsen, 2017) (Figure I7B). Cette différence de taille s'explique par la richesse des ADNmt de plantes en séquences non-codantes très variables entre les espèces. On y trouve également un grand nombre de séquences répétées pouvant être impliquées dans des événements de recombinaison de façon plus ou moins fréquente selon leur taille (Kubo and Newton, 2008). Ces séquences répétées peuvent être classées en trois catégories : les grandes séquences répétées dont la taille est supérieure à 500 pb, celles de taille moyenne comprises entre 50 et 500 pb et les microhomologies dont la taille est inférieure à 50 pb. Le génome mitochondrial d'*A. thaliana* contient deux grandes paires de séquences répétées de 6,5 et 4,2 kb qui recombinent fréquemment. Comme pour la plupart des mitogénomes des plantes supérieures, la recombinaison entre ces grandes séquences répétées engendre une réorganisation de l'information génétique de la mitochondrie dans des sous-génomes qui sont interconvertibles entre eux par recombinaison. L'ADNmt des plantes est également riche en séquences répétées de taille moyenne et en microhomologies qui peuvent être impliquées dans des événements de recombinaison illégitimes (Gualberto et al., 2014; Klein et al., 1994) (Figure I7C). Ces recombinaisons ectopiques sont réprimées par des mécanismes de surveillance car elles peuvent être délétères pour la stabilité du génome mitochondrial et donc pour la mitochondrie. Mais elles sont aussi responsables de l'évolution rapide des génomes mitochondriaux de plantes. Si l'ADNmt évolue lentement en termes de séquence, les réarrangements entre paires de séquences répétées sont fréquents et s'observent entre deux écotypes d'une même espèce. La comparaison des cartes des séquences des ADNmt d'*A. thaliana* des écotypes Columbia (Col-0) et Landsberg (Ler-0) témoigne de cette réorganisation par recombinaison (Kühn and Gualberto, 2012) (Figure I8A). Des réarrangements peuvent également être observés au sein d'une même plante et, lors de recombinaisons entre petites séquences répétées ou entre microhomologies, il peut y avoir

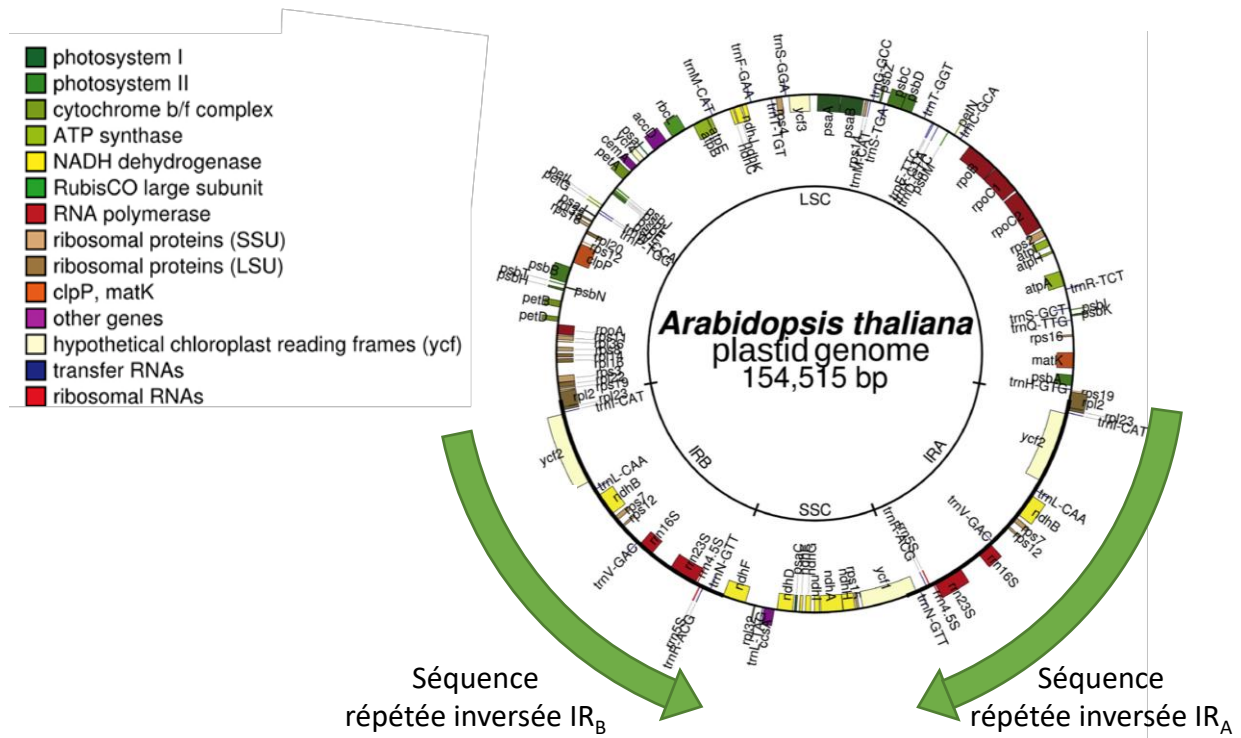


Figure I9. Représentation schématique, sous forme circulaire, du génome chloroplastique d'*A. thaliana*.

Représentation du contenu génique de l'ADNcp. Il code pour des ARNt, des complexes impliqués dans la photosynthèse et mécanismes de transcription et de traduction. Les deux séquences répétées inversées sont indiquées par des flèches vertes. *Johnston et al., 2019.*

formation de sous-génomes alternatifs qui coexistent en hétéroplasmie avec la forme prédominante du mitogénome. A l'origine, présents en d'infimes quantités dans la cellule, ils peuvent devenir la forme prédominante par suite d'une amplification clonale aussi connue comme "shift stœchiométrique" (Figure I8B) (Small et al., 1989; Wallet et al., 2015). Ces réarrangements sont un facteur de la plasticité et de l'évolution des mitogénomes des plantes. Des plantes atteintes de stérilité mâle cytoplasmique (CMS), une stérilité venant de la mitochondrie, peuvent retrouver leur fertilité après un "shift stœchiométrique" (Janska et al., 1998; Kubo and Newton, 2008).

La présence de ces nombreuses séquences répétées complexifie le séquençage et la cartographie de ces génomes. L'ADNmt de plante est encore souvent représenté dans les manuels comme un ADN circulaire unique appelé "master circle". Il est pourtant admis depuis longtemps que l'ADNmt de plantes peut exister sous plusieurs conformations qui coexistent. Il peut se trouver sous forme linéaire et/ou concatémérique, mais aussi sous formes branchées, qui seraient possiblement des intermédiaires de recombinaison (Figure I8C). Les formes circulaires existent également, mais sont de petite taille (Backert et al., 1996a, 1997; Stupar et al., 2001).

Tout comme dans le cas de la mitochondrie, une partie des gènes originellement dans le chloroplaste ont été perdus ou ont migré vers le noyau. Le contenu génique de l'ADNcp d'une espèce à l'autre est plus variable que pour la mitochondrie. Ainsi, l'algue rouge *Porphyra purpurea* code encore pour 253 gènes alors que certains protistes ne codent plus que pour une trentaine (Douglas and Penny, 1999; Wilson and Williamson, 1997). Le génome chloroplastique d'*A. thaliana* code pour 111 gènes : 77 protéines, 30 ARNt et 4 ARN ribosomiques. Ces gènes codent pour des facteurs impliqués dans la transcription, la traduction et pour des complexes nécessaires à la photosynthèse. Le génome chloroplastique d'*Arabidopsis* possède une grande paire de séquences répétées de 26 kb, en orientation inversée, qui divisent le génome en deux sections : la "Large Single Copy" (LSC) et la "Small Single Copy" (SSC) (Figure I9). Cette paire de séquences répétées recombine fréquemment, si bien que deux isoformes de l'ADNcp co-existent à proportions égales (Palmer, 1983). Les moyennes et petites séquences répétées étant bien moins présentes dans les génomes chloroplastiques que dans les mitochondriaux, les réarrangements sont moins fréquents (Sato et al., 1999).

Les génomes mitochondriaux et chloroplastiques ne sont pas sous forme libre, ils sont contenus dans des complexes nucléoprotéiques appelés nucléoïdes. Les nucléoïdes forment une sorte de compartiment mais ne sont pas délimités par une membrane. Bien que l'on ait réussi à isoler des nucléoïdes de mitochondries végétales, leur composition n'est aujourd'hui pas totalement résolue (Dai et al., 2005; Dillon and Dorman, 2010; Kucej and Butow, 2007). Plusieurs études ont cependant montré que les génomes contenus dans des nucléoïdes isolés sont capables de transcription et de réplication, indiquant que ces compartiments comprennent probablement les facteurs nécessaires à ces mécanismes. Ces études ont notamment montré la présence des ADN polymérases, de l'hélicase répliquative TWINKLE, des protéines de liaison à l'ADN simple-brin (SSB) ainsi que d'une gyrase et des protéines de type RecA (Gualberto and Kühn, 2014; Majeran et al., 2012). Ces protéines sont également impliquées dans la recombinaison homologue, le principal mécanisme de réparation des cassures double brin de l'ADNmt chez les plantes (Maréchal and Brisson, 2010). Les nucléoïdes sont possiblement le siège de la maturation des ARN et le site d'assemblage des ribosomes (Bohne, 2014). Dans le nucléoïde chloroplastique, des protéines d'ancrage à la membrane ont été identifiées, pouvant signifier qu'il est lié à la membrane (Melonek et al., 2012).

Les mécanismes de la division des organelles et de la ségrégation de leur génome ne sont pas encore complètement compris. Il a été montré que les mitochondries et les chloroplastes se divisent à la manière de leurs plus proches organismes connus, les α -protéobactéries et les cyanobactéries, par formation d'un anneau contractile par FtsZ, une protéine structuralement proche de la tubuline (Whitley et al., 2021). Chez les algues, l'homologue de FtsZ semble impliqué dans les mécanismes de division. Chez les plantes supérieures on retrouve deux homologues : FtsZ1 et FtsZ2 impliqués dans la division des chloroplastes (Vitha et al., 2001) mais pas des mitochondries. Une étude a montré que chez l'*Arabidopsis* un des facteurs impliqués dans leur division serait ADL2b, une protéine similaire de Dnm1p et Drp1 qui sont des protéines proches de la dynamine (Arimura and Tsutsumi, 2002). Cependant, les mécanismes de ségrégation de l'ADNmt des plantes n'est pas encore compris. Un des points qui nécessite de l'attention est le faible nombre de copies de l'ADNm par cellule. Il a été calculé que chez les plantes chaque mitochondrie contiendrait en moyenne moins d'une copie de l'ADNmt (Preuten et al., 2010) contrairement à la mitochondrie animale où on estime le nombre de copies à 5 en moyenne (Satoh and Kuroiwa, 1991), rendant les mécanismes de répartition de ce génome difficile à évaluer. Bien que l'on manque encore d'information, des

d'études montrent que la recombinaison homologue est importante pour le bon déroulement de la ségrégation de l'ADNmt (Chevigny et al., 2019; Wallet et al., 2015).

II. La réplication des génomes organellaires

II.1 La réplication de l'ADN, notions générales

II.1.a Chez les bactéries

La réplication de l'ADN est le mécanisme par lequel un génome est dupliqué en deux copies les plus fidèles possible afin de permettre la transmission de l'information génétique aux cellules/organites filles lors de la division cellulaire. Bien que certains facteurs diffèrent entre les organismes, le processus global est très conservé, notamment entre les eucaryotes, suggérant que les facteurs de la réplication du génome eucaryote sont apparus dans la même période que le LECA et ont très peu divergé depuis. La réplication est dite semi-conservatrice car chaque molécule d'ADN formée possède un brin d'ADN originel ainsi qu'un brin néoformé. Cette propriété semi-conservatrice a été observée et décrite dès 1958 chez *E. coli* à travers l'étude de la densité de l'ADN radiomarké dans les bactéries filles (Meselson and Stahl, 1958). Chez les bactéries, l'initiation de la réplication se fait à partir d'une origine de réplication appelée OriC. Cette région du génome varie en séquence et en taille entre les bactéries (Messer, 2002). Les OriC contiennent toutes des sites de liaison pour des protéines, une région riche en A-T pour l'ouverture de l'ADN (région DUE), ainsi qu'une série de séquences répétées appelées boîtes à DnaA permettant la reconnaissance de cette séquence par l'hélicase DnaA (Wolanski et al., 2015). Les facteurs de la famille des DnaA sont des protéines de type AAA+ (ATPases Associées à diverses Activités cellulaires) possédant un domaine Walker impliqué dans la liaison au phosphate de l'ATP, à l'hydrolyse de celui-ci et permettant la translocation de macromolécules. Dans un premier temps les DnaA reconnaissent l'origine de réplication et s'y fixent en formant des filaments hélicoïdaux. Les DnaA consomment de l'énergie sous forme d'ATP pour dissocier les deux brins au niveau de séquences riches en A-T (Sekimizu et al., 1987; Speck and Messer, 2001). Elles recrutent ensuite le complexe DnaB/DnaC sous forme hexamérique, qui est composé de l'hélicase DnaB, chargée d'ouvrir l'ADN lors de la réplication, et de la protéine cofacteur DnaC. Cette dernière agit comme un répresseur de DnaB,

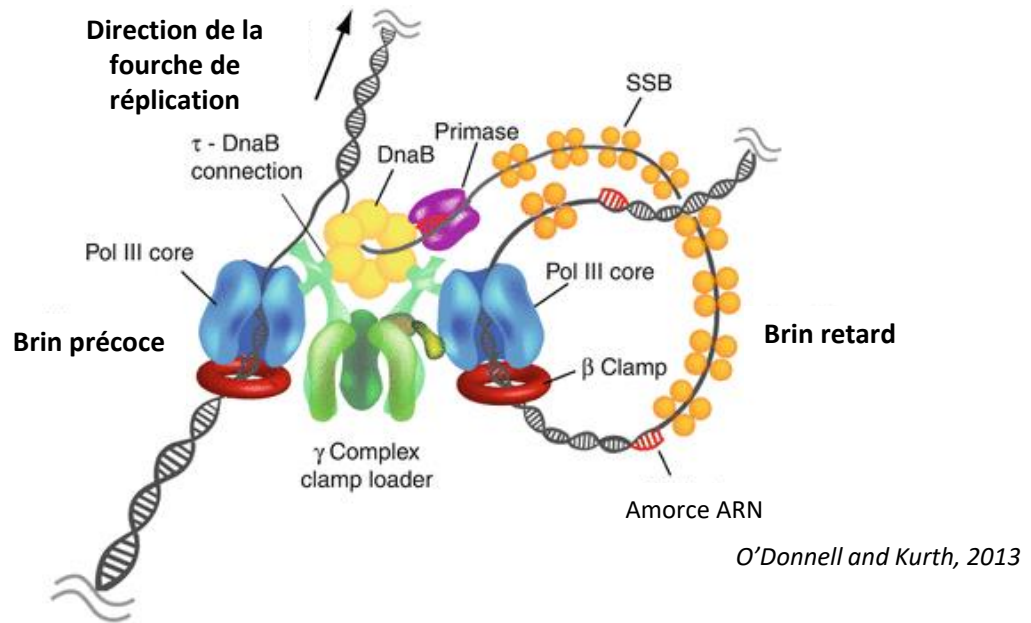
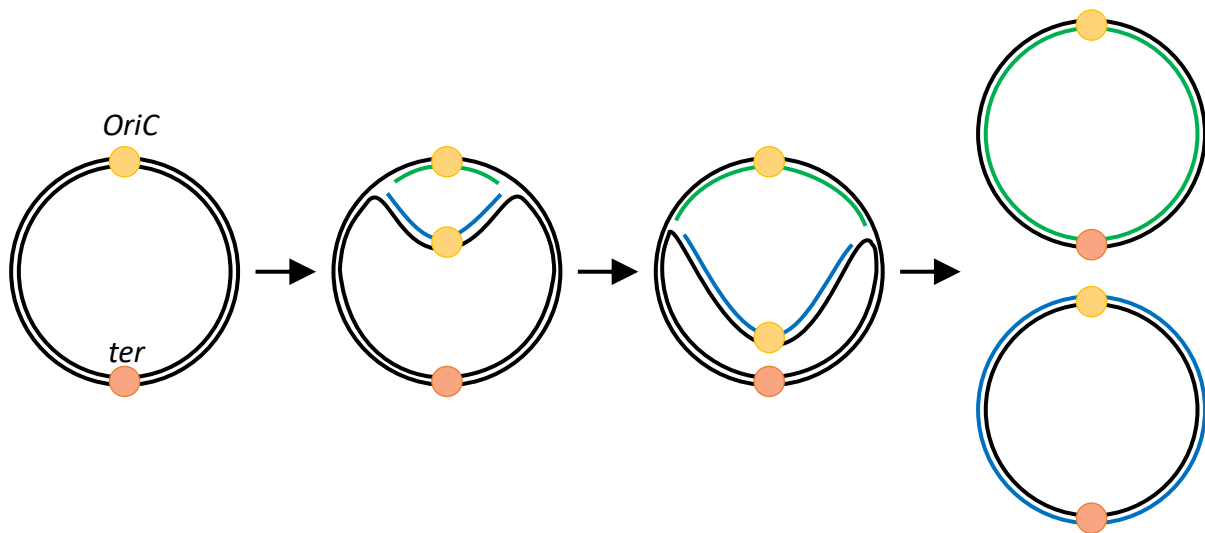
A**B**

Figure I10. Représentation schématique de la réplication d'un génome bactérien

(A) Schéma d'une fourche de réplication dupliquant le génome bactérien. Une fois la réplication initiée par DnaA, l'hélicase DnaB est recrutée et ouvre l'ADN. La primase DnaG synthétise les amorces ARN utilisées par l'ADN polymérase III associée au β -Clamp pour synthétiser le brin complémentaire. Des SSB se fixent à l'ADN simple brin attendant d'être pris en charge par l'ADN polymérase III afin de le protéger et d'empêcher la formation de structures secondaires (*O'Donnell and Kurth, 2013*). (B) Modèle représentant la division bactérienne bidirectionnelle. Les deux fourches de réplication démarrent de l'origine de réplication (*OriC*) et progressent en sens opposés se rejoignant au niveau du signal de terminaison (*ter*).

permettant son activation lorsqu'elle s'en détache. L'ADN polymérase étant incapable de synthétiser le brin complémentaire sans amorce, DnaB recrute DnaG, une primase chargée de synthétiser des amorces ARN sur l'ADN simple brin (ADNsb) (Davey et al., 2002; Kaplan and O'Donnell, 2002). L'ADN polymérase III se fixe sur ces amorces puis synthétise, de 5' en 3', des brins d'ADN complémentaires aux brins parentaux. La synthèse d'ADN est continue sur un brin (brin précoce) car l'ADN polymérase va dans le même sens que l'hélicase, mais elle est discontinue sur l'autre brin, générant des fragments d'Okasaki. Chez les bactéries les fragments d'Okazaki atteignent 1 à 2 kb de long (Balakrishnan and Bambara, 2013a). Un complexe "clamp loader" lie la ADN polymérase III qu'il va charger, avec un β -Clamp, sur les amorces ARN au fur et à mesure de leur synthèse. Au cours du processus, des protéines de liaison à l'ADNsb (SSB) se fixent le long des brins déroulés. Elles permettent de protéger l'ADNsb, mais facilitent aussi le détachement de la primase par le clamp loader pour laisser la place à l'ADN polymérase (Bogutzki et al., 2019) (Figure I10A). Sur le brin précoce elle peut synthétiser jusqu'à 86 kb avant de se décrocher, alors que sur le brin retard elle est stoppée au niveau de l'amorce ARN suivante (Georgescu et al., 2010; Hedglin et al., 2013). Les deux fourches de réplication progressent alors le long du chromosome bactérien jusqu'à former deux génomes complets identiques (Figure I10B). La réplication s'arrête à un site de terminaison ou lorsque 2 fourches de réplication se rencontrent.

II.1.b Chez le bactériophage T7

Le génome du bactériophage T7 possède une origine de réplication principale ainsi que des origines secondaires utilisées peu fréquemment ou lorsque la principale est altérée (Tamanoi et al., 1980). Cette origine principale se trouve en position 17 du génome et contient une région riche en A-T (79 %) comme chez les bactéries (Saito et al., 1980). Chez le phage, il n'y a pas de protéine dédiée à la reconnaissance de l'origine de réplication, comme l'est DnaA chez la bactérie. L'origine de réplication contient à la place un promoteur de l'ARN polymérase T7 à partir duquel la première amorce est synthétisée. Cette amorce est utilisée par l'ADN polymérase T7 (gp5 pour gène phage 5) afin d'initier la réplication (Saito et al., 1980). Les amorces suivantes du brin retard sont synthétisées au niveau de certaines séquences par le complexe composé de six protéines gp4, une primase/hélicase (Lee et al., 1998; Mendelman et al., 1994; Zhu et al., 2010). Le complexe de réplication du phage T7 est très minimaliste, il est composé de l'ARN polymérase générant les premières amorces ARN, gp5 chargée de la

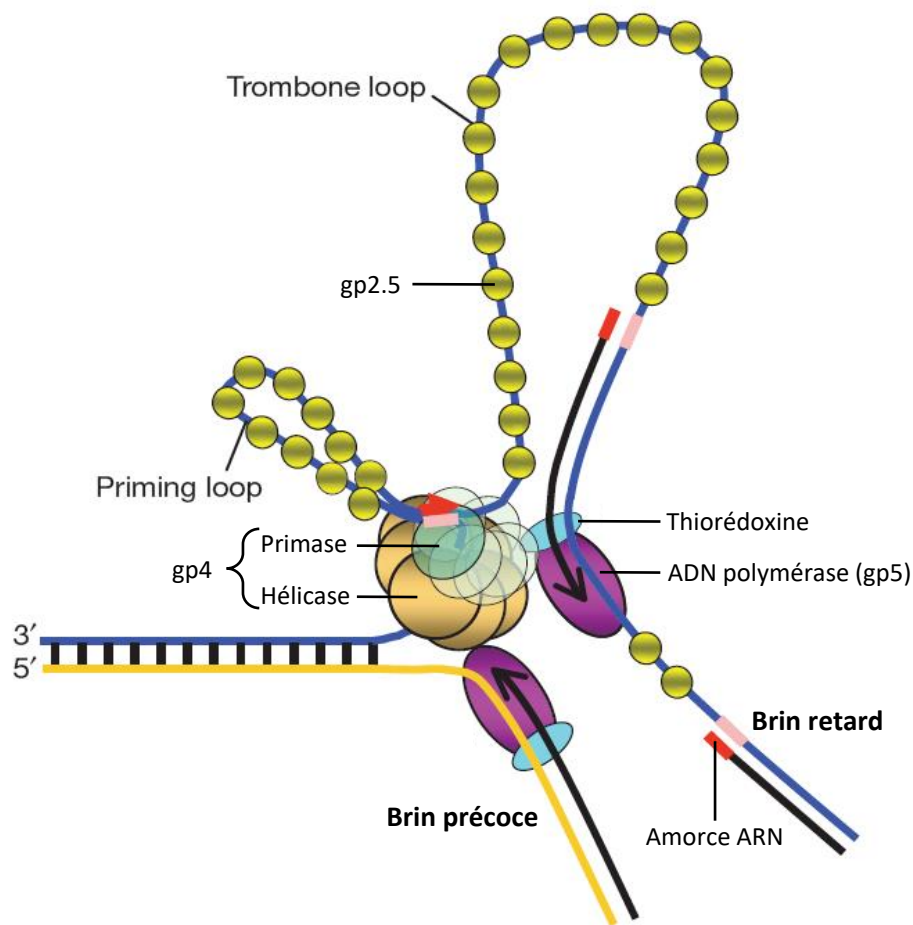
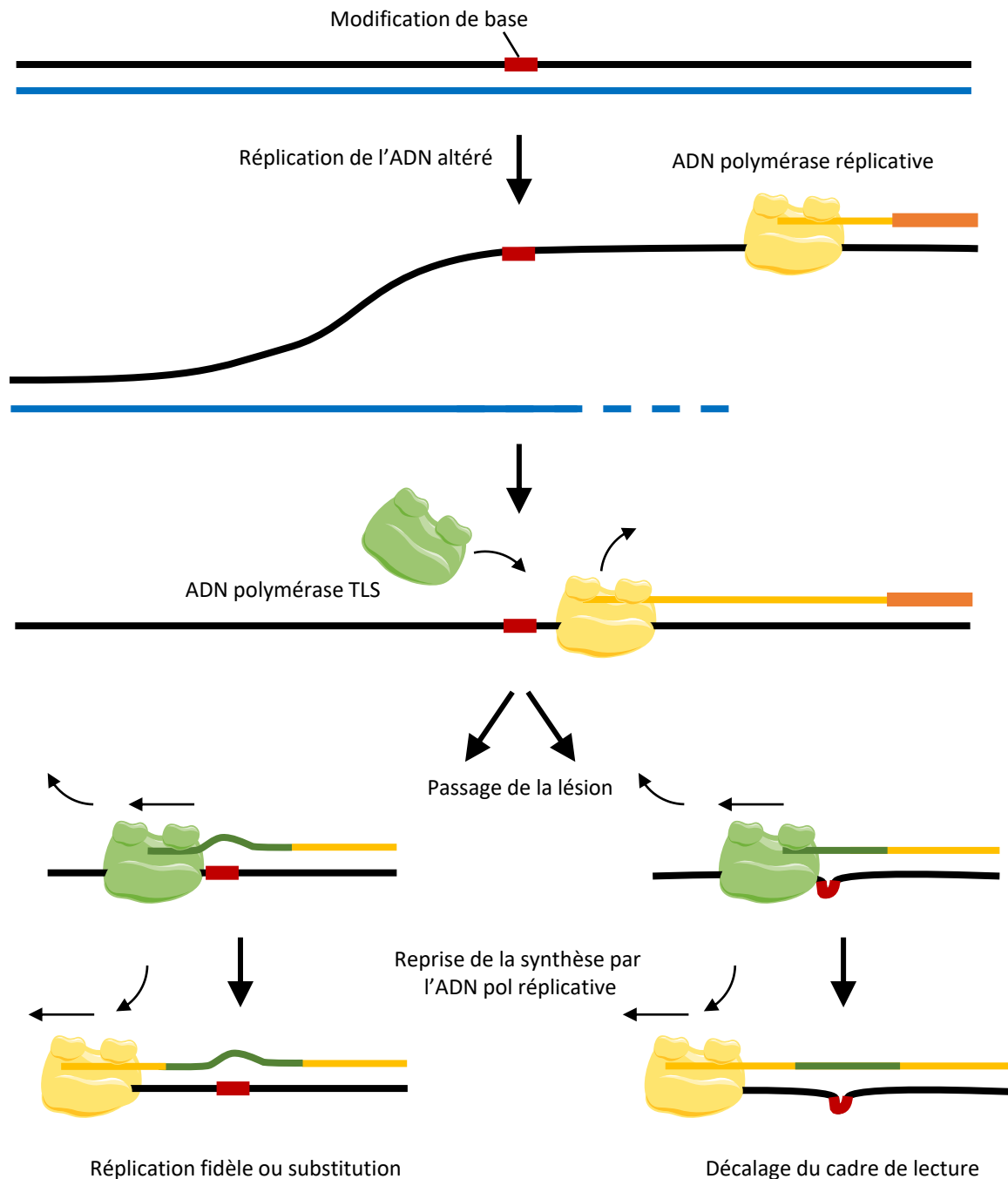


Figure I11. Représentation de la fourche répliquative du bactériophage T7

Schéma d'une fourche de répliquant dupliquant le génome du bactériophage T7 et des facteurs qui lui sont associés. Gp4 composée d'une partie hélicase et d'un partie primase ouvre l'ADN et synthétise l'amorce ARN. Les éléments de la fourche de répliquant interagissant entre eux, l'avancement de la fourche durant la synthèse de l'amorce forme une "priming loop" qui sera relâchée dans la "trombone loop " une fois la synthèse de l'amorce achevée. L'ADN polymérase T7 associée à la thiorédoxine bactérienne synthétise l'ADN complémentaire aux deux brins. L'ADN sous forme simple brin est recouvert par gp2.5 afin de le protéger et d'empêcher la formation de structures secondaires.



D'après Pagès et Fuchs., 2002

Figure I12. Schéma simplifié du mécanisme de translésion (TLS)

Lorsque l'ADN polymérase est bloquée par une lésion dans l'ADN, le mécanisme de translésion (TLS) se met en place. L'ADN polymérase répliquative se détache pour laisser place à une ADN polymérase plus permissive qui va passer outre la lésion. Deux voies sont possibles, la première implique l'insertion d'un nucléotide en face de la base modifiée, pouvant ainsi répliquer l'ADN avec ou sans mutation ponctuelle. La seconde voie incorpore des nucléotides sans prendre en compte la base modifiée, conduisant à un décalage du cadre de lecture. D'après *Pagès et Fuchs, 2002*.

réplication, gp4 qui ouvre l'ADN et génère des amorces ARN et de gp2.5, une protéine de type SSB non homologue aux SSB bactériennes qui se fixe à l'ADNsb pour le protéger et favoriser l'avancement de la fourche de réplication (Kulczyk and Richardson, 2016). L'association obligatoire de gp5 avec la thioredoxine A (une protéine codée par l'hôte du phage) permet d'assurer que la réplication ait lieu uniquement au sein d'un hôte (Zhu et al., 2010) (Figure I11).

II.1.c Le mécanisme de "translesion synthesis" (TLS)

Les ADN polymérases répliquatives ont la nécessité d'être précises et fidèles. Lorsque la fourche de réplication rencontre une déformation structurale de l'ADN, comme les dimères de thymine, elle effectue une pause qui peut être très délétère pour le génome car source de cassure double brin (Bierne and Michel, 1994). C'est pourquoi la cellule possède de nombreux mécanismes de réparation de l'ADN très performants. Cependant, il arrive que des altérations ne soient pas détectées ou réparées, la cellule peut alors mettre en place un mécanisme dit de translésion (TLS) permettant à la fourche répliquative de forcer le passage et évitant ainsi de s'effondrer. Lorsque la bulle de réplication bloque, la polymérase répliquative se détache laissant la place à une polymérase plus tolérante aux déformations de l'ADN, afin de passer à travers la lésion (Figure I12). La TLS permet ainsi d'éviter de graves dommages à l'ADN, mais ce mécanisme augmente également le taux de mutation autour de la lésion. La polymérase chargée de passer la lésion est plus permissive et donc moins fidèle. Sur la courte distance qu'elle parcourt avant qu'elle ne soit remplacée par la polymérase répliquative, elle peut incorporer un mauvais nucléotide. De plus, ce mécanisme ne supprime pas la lésion qui sera donc transmise à l'un des génomes néoformés. Ces mutations peuvent être délétères mais aussi actrices de l'évolution des génomes (Kunz et al., 2000; Pagès and Fuchs, 2002). Chez les eucaryotes, les ADN polymérases pouvant être impliquées dans les mécanismes de TLS sont nombreuses. Chez les plantes par exemple, on en compte quatre principales que l'on peut diviser en deux groupes, selon les lésions à outrepasser. Les Pol ζ , Pol η , et Rev1 sont associées aux lésions induites par les UV et les rayonnement ionisants (Nakagawa et al., 2011b, 2011a), alors que la pol λ est associée à la translésion de 8-oxoguanine résultant d'une exposition aux ROS (Amoroso et al., 2011). Chez les bactéries, les ADN polymérases pol V et pol IV sont considérées comme les polymérases de translésion principales. D'après (Fujii and Fuchs, 2020), la pol V se dissocie rapidement après avoir passé la lésion, limitant les erreurs d'incorporation dues à sa faible fidélité. Pol V en revanche a été montrée comme se liant aux

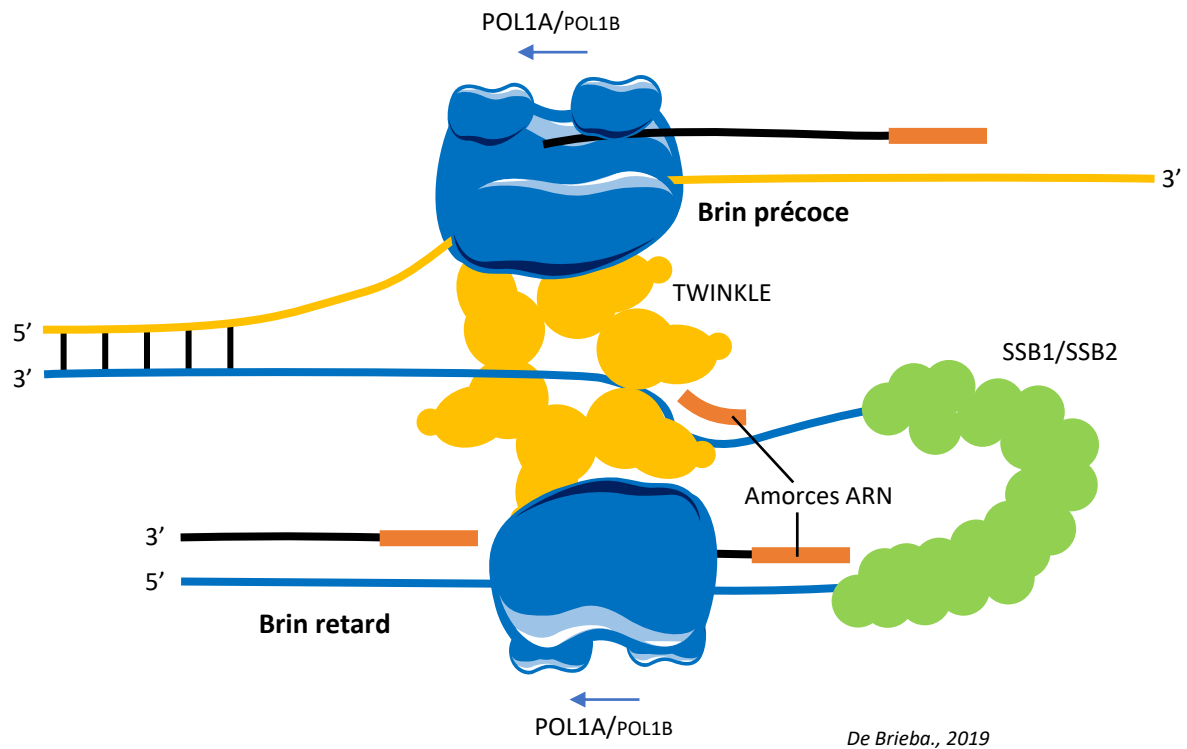


Figure I13. Modèle possible pour la fourche répliquative dans le mitochondries de plante.

Schéma d'une fourche de réplication dupliquant le mitogénome d'*A. thaliana* et des facteurs qui lui sont associés. L'hélicase/primase TWINKLE, similaire à la gp4 phagique ouvre l'ADN et synthétise les amorces sur le brin retard. L'ARN polymérase de type phagique RPOT synthétise l'amorce ARN du brin précoce qui est utilisée par l'ADN polymérase pour synthétiser le brin complémentaire. C'est probablement POL1A principalement qui est en charge de cette fonction, mais POL1B peut aussi supporter cette activité. Les facteurs SSB se lient à l'ADN simple brin pour le protéger et l'empêcher de former des structures secondaires. Figure adaptée de De Briebe., 2019.

filaments RecA mis en place sur la section simple brin de l'ADN. Elle est ainsi liée plus stablement à l'ADN et continuera la polymérisation jusqu'à être remplacée par la Pol III, augmentant ainsi le risque de mutations (Fujii and Fuchs, 2009, 2020). La Pol II était auparavant considérée comme capable de translesion, cependant des études ont montré qu'elle possède la même capacité de translesion que les ADN polymérases I et III impliquées dans la réparation et la réplication. Elle permet cependant le "passage" d'une lésion G-AAF (une guanine liée à une acétylaminofluorène) en provoquant un décalage du cadre de lecture (Becherel and Fuchs, 2001; Paz-Elizur et al., 1996). Le complexe protéique RecBCD permet également de stabiliser la fourche de réplication, améliorant l'action des polymérases (Laureti et al., 2017).

II.2 La réplication de l'ADNmt et de l'ADNcp

Les ADN mitochondriaux et chloroplastiques sont empaquetés dans des structures appelées nucléoïdes, qui contiennent les facteurs nécessaires à la transcription, la réplication ainsi que des facteurs impliqués dans la maintenance du génome (Gualberto and Kühn, 2014; Pfalz and Pfannschmidt, 2013). C'est à travers l'étude des facteurs présents dans les organelles et les données concernant la structure de ces génomes que des hypothèses concernant leur réplication peuvent être posées.

II.2.a La réplication de l'ADN mitochondrial des plantes

La réplication de l'ADN mitochondrial est possiblement issue d'un mélange entre le système bactérien et le système phagique et il est fortement probable que plusieurs mécanismes de réplication coexistent, notamment du fait de la variété de structures de l'ADNmt observées (Backert et al., 1997).

Chez les mitochondries de plantes terrestres on trouve deux ADN polymérases codées par le noyau et adressées à la mitochondrie et au chloroplaste, appelés POL1A et POL1B chez *A. thaliana*. La présence de la primase/hélicase TWINKLE, homologue à la gp4 phagique ainsi que la présence des protéines SSB ont orienté les hypothèses vers un système de réplication proche de celui retrouvé dans le bactériophage T7 (Diray-Arce et al., 2013; Edmondson et al., 2005; Morley et al., 2019; Peralta-Castro et al., 2017) (Figure I13). Cette hypothèse est également appuyée par le fait que les ARN polymérases codées par le noyau et adressées à la

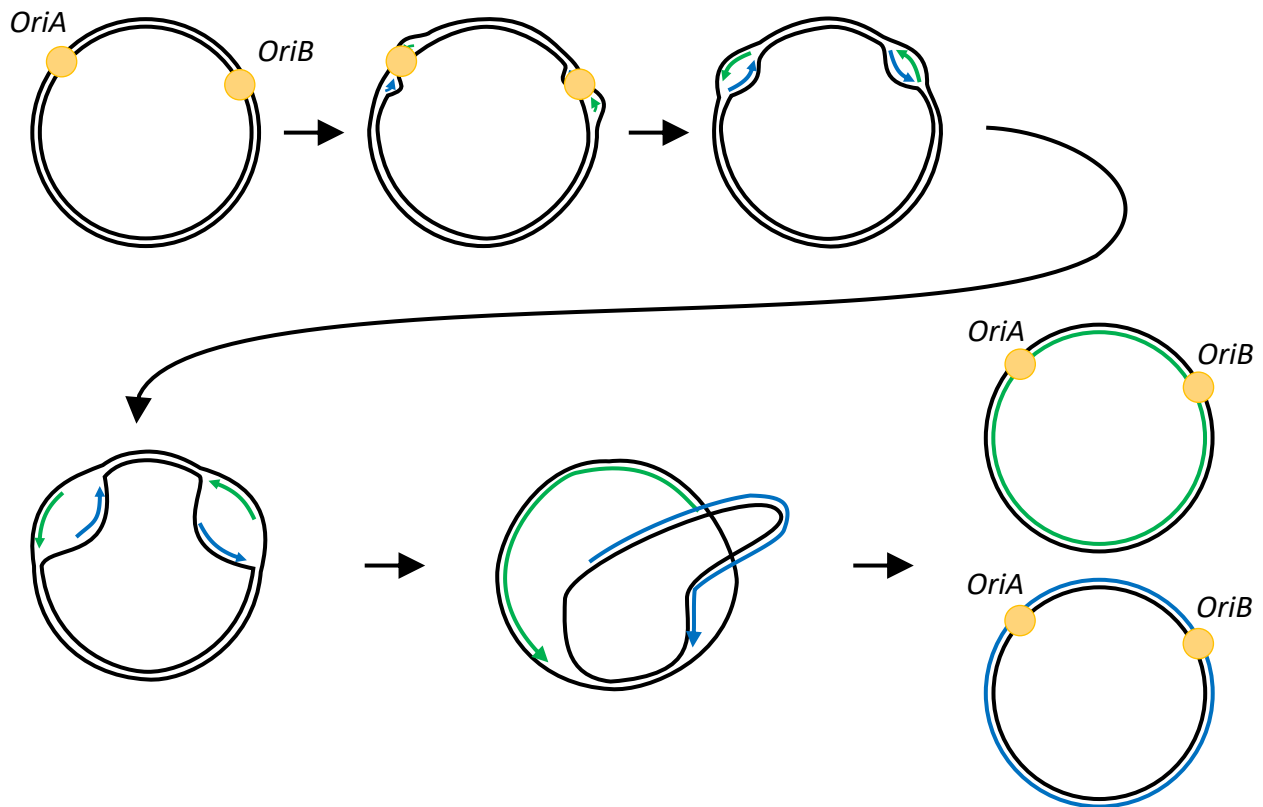


Figure I14. Réplication du génome chloroplastique selon le modèle de Cairns

La réplication débute à partir de deux origines de réplication par formation de paires de D-loop. Les D-loop s'étendent l'une vers l'autre créant ainsi une bulle de réplication. Elles progressent jusqu'à dupliquer chacun des brins originels.

mitochondrie sont d'origine phagique (Hedtke et al., 1997). Cependant il a été montré que bien que la TWINKLE de plantes soit capable de synthétiser des amorces ARN à partir de séquences précises, elle ne peut pas compléter la primase phagique ou bactérienne. Enfin, des plantes d'*A. thaliana* mutées sur le gène codant pour TWINKLE ont été reportées comme ne présentant aucun phénotype de croissance, ni d'instabilité du génome mitochondrial. Ce résultat suggère qu'une autre hélicase possède un rôle redondant à TWINKLE dans les mitochondries de plantes (Peralta-Castro et al., 2017). Cependant, des résultats non-publiés de notre laboratoire et par d'autres chercheurs suggèrent que les mutants de TWINKLE ne sont pas viables (information de José Gualberto et de Kristina Kühn). Chez le chénopode (*Chenopodium album*), des études de réplication d'un plasmide mitochondrial font état d'un système de "rolling-circle" démarrant la réplication à partir de R-loop, comme pour l'ADNmt de mitochondries de mammifères (Backert, 2002; Backert et al., 1996b; Ciesielski et al., 2016). Pourtant il est très improbable que seul ce type de réplication s'applique à l'ensemble des sous-génomes qui constituent l'ADNmt des plantes, du fait de la variété de leurs structures. Une hypothèse est que la mitochondrie de plante est capable de mettre en œuvre plusieurs mécanismes alternatifs de réplication du génome, notamment la réplication dépendante de la recombinaison (RDR), un mécanisme qui sera décrit ultérieurement comme la voie du BIR dans les systèmes de réparation de l'ADN par recombinaison homologue.

II.2.b La réplication de l'ADN chloroplastique des plantes supérieures

Grâce à des études par microscopie électronique à transmission, la réplication du génome chloroplastique a été étudiée très tôt. Les premières études chez le tabac et l'œnothère, deux plantes à fleur, font état de deux origines de réplication : Oria et Orib (Chiu and Sears, 1992; Kunnimalaiyaan and Nielsen, 1997). L'observation de D-loop sur le génome a conduit à l'hypothèse que la réplication se fait par déplacement de ces D-loop le long du génome (Kolodner+ and Tewari, 1975). Ces travaux ont depuis été complétés par l'étude des facteurs associés à la réplication présents dans les nucléoïdes chloroplastiques (Majeran et al., 2012; Melonek et al., 2016) ainsi que l'avancée des techniques à disposition (Figure I14). La purification et l'étude des nucléoïdes est facilitée chez le chloroplaste où, contrairement à la mitochondrie qui possède en moyenne moins d'une copie d'ADN mt par mitochondrie, chaque

chloroplaste compte une moyenne de 20 molécules d'ADNcp pour 4 à 5 nucléoïdes par organelle (Greiner et al., 2020).

II.3 Les ADN polymérases organellaires des plantes

Chez les plantes, deux ADN polymérases organellaires ont été identifiées. Elles sont codées par le noyau, toutes deux adressées à la mitochondrie et au chloroplaste et nommées POL1A et POL1B chez *Arabidopsis* (Mori et al., 2005; Ono et al., 2007). Des études leur prêtent une origine phagique, en raison notamment de leur activité liée à l'hélicase répllicative TWINKLE lors de la réplication (Morley et al., 2019) mais phylogénétiquement, elles dérivent de l'ADN polymérase I bactérienne (Kimura et al., 2002). Elles sont composées de deux domaines, le domaine polymérase ainsi qu'un domaine 3'-5' exonucléase essentiel à l'activité de relecture lors de la réplication. Ce dernier domaine, très actif, leur permet de compenser leur fidélité d'incorporation plus faible que la moyenne des ADN polymérases répllicative (Baruch-Torres and Brieba, 2017). Il a par ailleurs été démontrés qu'elles sont toutes deux capables de répliquer et de réparer l'ADN (Takeuchi et al., 2007). Leur région N-terminale est notamment impliquée dans l'interaction avec la primase/hélicase TWINKLE (Morley et al., 2019). Elles sont cependant chacune spécialisée en termes d'activité. Il a été montré, par induction de stress génotoxique dans des mutants des ADN polymérases, que les mutants *pol1B* présentent une sensibilité accrue à la ciprofloxacine contrairement aux mutants *pol1A* qui ne sont pas plus sensibles que les sauvages (Parent et al., 2011). Ainsi, la POL1A est décrite comme préférentiellement répllicative alors que POL1B est spécialisée dans les mécanismes de réparation de l'ADN (Parent et al., 2011). Il a récemment été montré que POL1A pouvait également participer à la réparation *via* la voie courte du BER qui sera décrite ultérieurement (Trasviña-Arenas et al., 2018). Enfin, POL1A et POL1B sont capables de transléSION lorsque la fourche de réplication est bloquée, expliquant l'intérêt d'une fidélité d'incorporation moins stricte (Baruch-Torres and Brieba, 2017).

I.4 L'élimination des amorces d'ARN

La réplication d'un génome passe par l'intégration d'amorces ARN par des ARN polymérases ou des primases, elles sont particulièrement nombreuses sur le brin retardé. Ces amorces, nécessaires à l'initiation de la réplication, doivent être éliminées car leur présence empêche

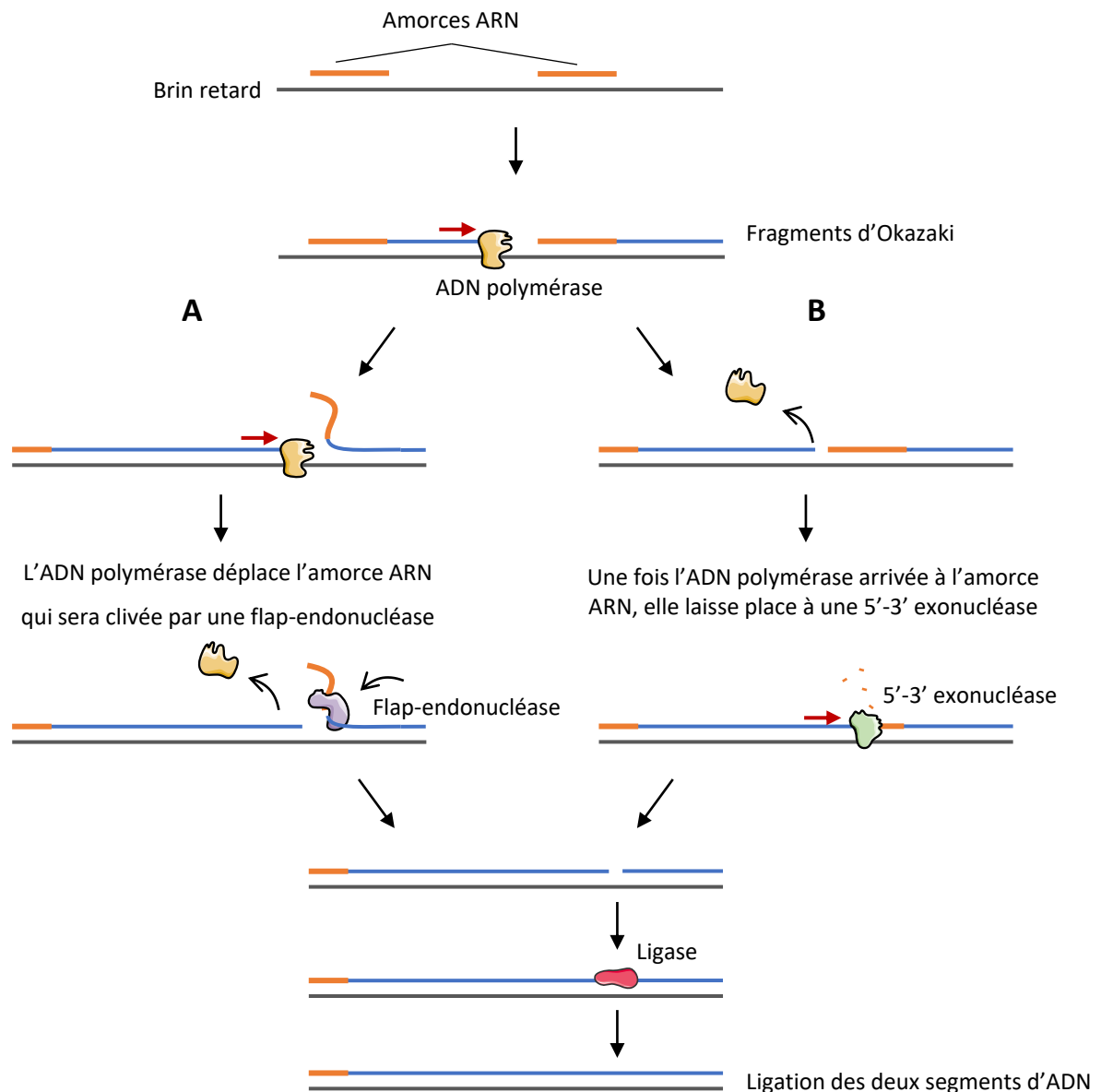


Figure I15. Mécanismes de maturation des fragments d'Okazaki.

Schéma simplifié des différents mécanismes de maturation des fragments d'Okazaki. Les facteurs impliqués diffèrent selon les espèces. Tout d'abord, l'ADN polymérase répliquative synthétise l'ADN complémentaire à partir des amorces ARN et lorsqu'elle rencontre l'amorce ARN suivante deux possibilités existent. **(A)** L'ADN polymérase déplace le brin ARN, générant une structure de type flap. Une flap-endonucléase est alors recrutée pour cliver le brin ARN et permettre la ligation des deux segments d'ADN. **(B)** L'ADN polymérase répliquative se détache puis (chez les bactéries) l'ADN polymérase I est recrutée pour dégrader l'ARN grâce à son activité 5'-3' exonucléase et synthétiser l'ADN complémentaire grâce à son domaine polymérase. Une ligase est alors recrutée pour liguer les deux segments d'ADN.

la ligation des brins et sont source d'instabilité du génome voire de létalité. Les mécanismes permettant leur maturation varient selon les organismes mais on peut distinguer deux modèles principaux (Figure I15).

Un premier modèle représentatif du mécanisme retrouvé chez les eucaryotes implique une activité de type flap-endonucléase : la polymérase continue la synthèse du brin d'ADN complémentaire, même à la rencontre de l'amorce ARN et en déplaçant celle-ci. Elle crée ainsi une structure à trois brins appelée flap dont la partie simple brin est clivée au niveau de l'embranchement par une enzyme de type flap-endonucléase, puis les deux brins sont liés par une ligase (Figure I15). L'enzyme principale impliquée dans ce mécanisme chez les eucaryotes est FEN1, pour Flap-Endonucléase 1 (Balakrishnan and Bambara, 2013b). Elle est retrouvée chez les levures, les animaux et les plantes. Il a également été montré qu'une seconde voie appelée voie longue existe chez les eucaryotes. Elle est suivie quand une hélicase (pif1 chez l'homme) se lie à la structure flap et agrandit la section en simple brin. Cette réaction permet à l'ADN polymérase de continuer la synthèse mais peut aussi d'engendrer la fixation de protéines de type SSB (RPA chez l'homme) ou la formation de structures secondaires sur l'ADN simple brin, empêchant FEN1 de reconnaître et cliver la structure. L'endonucléase Dna2 clive alors la partie ARN du simple brin laissant ainsi la place à FEN1 ou à une autre nucléase - comme EXO I, une 3'-5' exonucléase bactérienne dégradant l'ADN simple brin (Ramírez-Santos et al., 2009) - pour cliver le segment d'ADN restant (Bae et al., 2001).

Une autre façon d'éliminer les fragments d'Okazaki est retrouvée chez les bactéries. Selon ce modèle l'ADN polymérase III répliquative s'arrête lorsqu'elle rencontre le fragment d'Okazaki suivant. Elle se dissocie alors et laisse place à l'ADN polymérase I. Deux fonctions de l'ADN polymérase I vont alors alterner, l'activité 5'-3' exonucléase dégradant l'amorce ARN et l'activité polymérase qui remplit la lacune formée (Bhardwaj et al., 2018; Lovett, 2011) (Figure I15).

En réalité ces modèles ne sont pas strictement exclusifs aux eucaryotes ou aux procaryotes. Le premier modèle est également retrouvé chez les bactéries où la structure flap peut être clivée, par exemple, par le domaine 5'-3' nucléase de l'ADN polymérase I qui a aussi une activité flap-endonucléase (Lyamichev et al., 1993; Nagata et al., 2002). De plus chez les bactéries, EXO IX, une protéine similaire à FEN1, a été identifiée (Anstey-Gilbert et al., 2013).

En plus de ces mécanismes, un système de clivage similaire au second modèle existe, impliquant l'activité d'une ribonucléase H (RNase H) qui dégrade l'amorce ARN. Une ADN

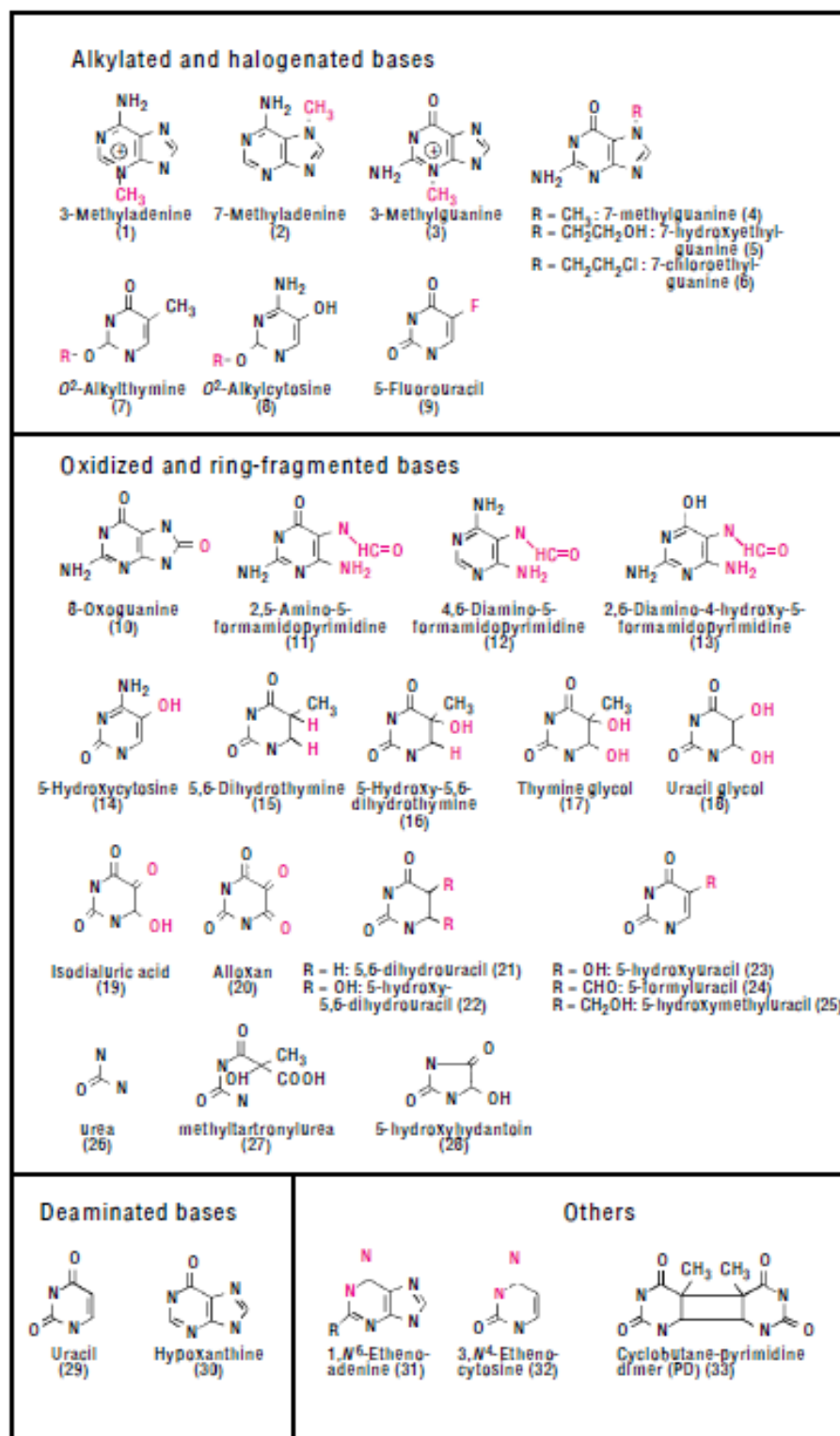


Figure I16. Représentation des différentes altération de bases.

D'après Krokan et al., 1997

polymérase comble alors la lacune et la ligase lie les deux brins. Les RNase H sont trouvées dans les bactéries, les levures, les plantes et les mammifères, suggérant que ce mécanisme est retrouvé partout (Hyjek et al., 2019; Randall et al., 2019). Chez le phage T7, gp6 impliquée dans la maturation des fragments d'Okazaki, possède une activité 5'-3' exonucléase ainsi qu'une activité flap-endonucléase (Mitsunobu et al., 2014a, 2014b).

Dans les mitochondries de plantes, aucune nucléase n'avait jusqu'alors été caractérisée hormis OEX1, une protéine possédant une activité 5'-3' exonucléase et adressée aux mitochondries. Son étude est l'objet de cette thèse.

III. Les mécanismes de lésions de l'ADN

Les génomes des organelles, comme le génome nucléaire, sont soumis à des stress pouvant être i) d'origine environnementale, comme l'exposition aux rayonnements ionisants, aux UV ou aux xénobiotiques, ii) d'origine métabolique, comme l'exposition à certaines espèces réactives d'oxygène (ROS) et iii) d'origine fonctionnelle, comme les erreurs commises par l'ADN polymérase lors de la réplication. L'accumulation de ces dommages entraîne un dysfonctionnement des organites pouvant mener à des troubles du développement de l'organisme, voire à des maladies graves chez l'homme. Il est donc nécessaire pour chaque génome de développer des mécanismes de réparation efficaces et adaptés aux lésions les plus fréquentes. Les différents type de dommages à l'ADN sont répertoriés en figure I16.

III.1 L'exposition aux rayonnements ionisants

Les rayonnements ionisants (RI) sont des rayonnements électromagnétiques capables d'ioniser les atomes qu'ils traversent par transfert d'énergie aux électrons. On les appelle plus couramment les rayonnements radioactifs. Il existe trois types de RI, les rayons α , β et γ . La radiation émise par la terre à laquelle les organismes sont exposés ne sont pas suffisants pour endommager l'ADN. L'exposition aux RI est le plus souvent causée par l'homme dans le cadre de soins, d'expérimentations ou d'accidents. Ils peuvent provoquer un large éventail de dommages comprenant les cassures double brin ou simple brin, la réticulation et la modification de bases. Ces dernières pouvant elles-mêmes engendrer des cassures double

brin, lors de la réplication. Dans les mitochondries, il a été montré que les radiations ionisantes induisaient une augmentation des ROS qui sont elles aussi source de dommages à l'ADN (Leach et al., 2001). La pluralité des lésions causées par les RI en font un danger pour la cellule car elle doit mobiliser plusieurs mécanismes de réparation pour les résoudre. De plus, l'augmentation de la production des ROS induit des dommages sur le long terme. En effet, un défaut de réparation de ces lésions peut mener à la mort cellulaire ou à des maladies comme les cancers chez les animaux (Little et al., 1998). Ce type de stress peut notamment être utilisé en laboratoire pour étudier les mécanismes de réparation de l'ADN, mais aussi en radiothérapie, où les RI sont utilisées pour détruire les cellules cancéreuses en bloquant leur capacité à se multiplier.

III.2 L'exposition aux UV

Les animaux comme les plantes ont besoin d'une exposition régulière aux rayons du soleil pour leur métabolisme. Chez l'homme, l'exposition au soleil permet la synthèse de la vitamine D et chez les plantes elle est l'élément de base de la photosynthèse. Cependant, les UV font partie du spectre d'émission du soleil et peuvent causer des dommages à l'ADN. Les plantes, par leur incapacité à se mouvoir ou se déplacer, sont d'autant plus exposées à ce stress d'origine exogène. Les UV se distinguent en trois types, en fonction de leur longueur d'onde d'émission, et chacun a une incidence différente sur la gravité des dommages causés. Ainsi, les UV-C dont la longueur d'onde se situe entre 100 et 280 nm sont les plus toxiques pour l'ADN dont le pic d'absorption est à environ 260 nm. Mais ils sont rarement la cause des lésions car bloqués par la couche d'ozone. La majeure partie des dommages causés à l'ADN proviennent des UV-B (290 à 320 nm) (Landry et al., 1997), alors que les UV-A (320 à 400 nm), quant à eux, sont plus abondants mais moins absorbés par l'ADN et donc moins nocifs. L'exposition aux UV-C entraîne le même type de dommages que celle aux UV-B, mais elle est plus nocive à dose équivalente. L'absorption par l'ADN de rayonnements UV provoque différentes lésions dont essentiellement des dimères cyclobutaniques de pyrimidines (CPD) (Becker and Wang, 1989) ainsi que des pyrimidines (6-4) pyrimidones (6-4PP). Soumis à des photons de longueur d'onde 320 nm, ces 6-4PP peuvent donner naissance à leurs isomères de Dewar (Batista et al., 2009). La formation de ces structures conduit à une rigidité au niveau de l'ADN et change légèrement sa conformation (Taylor et al., 1988; Yokoyama and Mizutani,

2014). Cette modification de structure peut engendrer des problèmes au niveau des interactions protéiques, en particulier lors de la transcription ou de la réplication durant lesquelles ces structures bloquent la progression des polymérases et peuvent engendrer des cassures dans l'ADN (Cordeiro-Stone et al., 1997; Mei Kwei et al., 2004).

Ces lésions sont retrouvées dans l'ADN nucléaire mais aussi dans l'ADN des organelles. Ainsi, des CDP et des 6-4PP ont été trouvés dans l'ADN chloroplastique de feuilles d'épinards exposées aux UV-B (Hada et al., 2000). D'autres expériences chez l'*Arabidopsis* ont montré la présence de CPD dans les ADN mitochondrial et chloroplastique de plantules traitées par les UV-B (Chen et al., 1996b) et dans l'ADN chloroplastique de plantules traitées aux UV-C (Petersen and Small, 2001). Si ces photoproduits dans l'ADN ne sont pas éliminés, ils peuvent générer des mutations. La mutation la plus courante induite par les UV-B est la transversion de C en T. Les UV induisent également d'autres types de lésions sur les bases de l'ADN, comme la formation de dimères d'adénine ou d'hydrate de cytosine. En laboratoire de recherche, les UV sont principalement utilisés pour l'induction de stress et de mutations, ou dans une optique de stérilisation (Begyn et al., 2020; She et al., 2020).

III.3 Dommages liés à la fixation de molécules réactives sur l'ADN

L'ADN est la cible de produits chimiques réactifs exogènes mais aussi de produits de métabolisation endogènes qui peuvent se fixer de façon covalente à l'ADN. Ceux-ci peuvent être de petite taille, comme les agents alkylants, ou de taille plus volumineuse. Les agents alkylants ajoutent des groupements alkyles à des groupes électronégatifs, et leur liaison à l'ADN se fait principalement au niveau des atomes d'azote des bases puriques. Ils peuvent induire la formation de liaisons inter-brins, qui vont empêcher la réplication et la transcription (Noll et al., 2006) et si la cellule ne dispose pas de mécanismes de réparation de l'ADN ils entraînent la mort de la cellule. La présence de ces groupements alkyles induit souvent des cassures simple- ou double-brin de l'ADN.

La fixation de molécules organiques plus volumineuses sur les bases de l'ADN entraîne la formation de nucléotides hypermodifiés appelés adduits (Bartsch, 1996). Ils peuvent être issus de la fixation d'intermédiaires réactifs formés lors de la métabolisation de composés organiques, ou de molécules endogènes activées comme les acides gras peroxydés (Nair and al., 2005). Chez les plantes, des adduits ont été observés dans l'ADN de cellules d'*Echinacea*

purpurea en culture exposées au benzo[a]pyrene (Rether et al., 1990) et de plants de haricot cultivés en présence de benzo[a]pyrene ou de benzène (Weber-Lotfi et al., 2005). Ces adduits peuvent modifier l'expression des gènes, engendrer des mutations (Beland and Poirier, 1993; Schofield and Hsieh, 2003), inhiber la réplication (Brown and Romano, 1989) et la transcription (Donahue et al., 1996) (Weber-Lotfi et al., 2010). Leur présence a été utilisée comme biomarqueur d'exposition des plantes à des polluants atmosphériques génotoxiques (Weber-Lotfi et al., 2005). La présence d'adduits dans l'ADN des organelles de plantes n'a pas été précisément étudiée, mais l'ADN mitochondrial des animaux est impacté (Beckman and Ames, 1996; Shamsuddin et al., 1987).

III.4 Dommages liés à l'exposition aux espèces réactives de l'oxygène (ROS)

Les espèces réactives d'oxygène (ROS) désignent des composés chimiques dont un atome d'oxygène possède des électrons de valence non-appariés qui lui confèrent un fort degré de réactivité. Elles comprennent le radical superoxyde (O_2^-), le radical hydroxyle ($\cdot OH$), les radicaux alcoyles ($RO\cdot$) ou peroxydes ($ROO\cdot$), l'ozone (O_3) ou encore le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Le radical superoxyde est le ROS qui possède la plus faible réactivité vis-à-vis des substrats bio-organiques. C'est sa forme protonée, le radical perhydroxyle ($HO_2\cdot$), qui semble être la forme dite active. Mais le radical superoxyde est capable de produire d'autres radicaux plus réactifs notamment *via* la réaction d'Haber-Weiss, catalysée par le Fe^{3+} , qui induit la formation de radicaux hydroxyles $\cdot OH$ lors de la réduction de H_2O_2 (Winterbourn, 1995).

Ce radical hydroxyle est l'oxydant le plus puissant. Les radicaux alcoyles ou peroxydes quant à eux sont des radicaux secondaires issus de l'oxydation de substrats organiques initiée par l'oxygène singulet (1O_2) ou par le radical hydroxyle. Le radical superoxyde peut également réagir avec le monoxyde d'azote, produit dans la cellule végétale lors de l'étape de dénitrification du cycle de l'azote, et donner naissance au peroxydinitrite $ONOO^-$. Le monoxyde d'azote et le peroxydinitrite sont des espèces réactives d'azote qui sont également capables de se fixer à l'ADN (Vandelle and Delledonne, 2011).

La réaction des radicaux hydroxyles avec l'ADN est susceptible de conduire à diverses lésions de l'ADN, comme l'oxydation des bases et des résidus des sucres, des cassures de chaîne par arrachement d'un atome d'hydrogène du 2-désoxyribose, des pontages ADN-protéines dans les nucléoprotéines, et la formation de sites abasiques. Les génomes chloroplastiques et

mitochondriaux sont la cible d'oxydation par les radicaux hydroxyles au niveau du sucre et des bases azotées, ce qui entraîne des délétions ou des mutations (Cadet et al., 1997; Demple and Harrison, 1994; Imlay, 2003; Møller et al., 2007).

Les ROS sont principalement produits par trois compartiments cellulaires : La mitochondrie, le chloroplaste et le peroxysome. Chez les plantes, le chloroplaste participe à la production de ROS qui sont source à la fois de signaux cellulaires mais aussi de stress pour son génome. Au cours de la photosynthèse, les photosystèmes I et II produisent un gradient de protons, et cette étape libère des radicaux superoxydes qui seront à leur tour transformés en H_2O_2 par la superoxyde dismutase (Asada et al., 2000). Le peroxyde d'hydrogène peut ensuite être réduit en radical hydroxyle par la réaction de Fenton. Ces réactions ont lieu pendant la phase claire de la photosynthèse. Des formes d'oxygène singulet (1O_2) sont également produites lorsque la chlorophylle, recevant un surplus d'énergie, est à son état d'excitation maximal (Khorobrykh et al., 2020). Certains stress comme de fortes lumières ou températures sont des facteurs aggravant la production de ROS (Pospíšil, 2016).

La mitochondrie est aussi responsable d'une large partie des ROS produits par la cellule, à travers les réactions qui ont lieu lors de la phosphorylation oxydative. Ils sont générés par la réduction de molécules d'oxygène (O_2) en radicaux superoxydes (O_2^-) puis en peroxyde d'hydrogène par l'action de la superoxyde dismutase (Murphy, 2009). Les activités des complexes II et III sont mentionnées comme les plus productrices de ROS (Chen et al., 2003; Quinlan et al., 2012). Environ 2% de l'oxygène consommé au niveau mitochondrial est transformé en radicaux superoxyde lors de la première réduction électronique de l'oxygène. Tout comme les chloroplastes, les mitochondries génèrent également des ROS dans un but de signalisation entre les compartiments cellulaires (Shadel and Horvath, 2015)

Le peroxysome est un organite au même titre que la mitochondrie et le chloroplaste, mais contrairement à ces derniers il ne contient pas d'ADN. Ses rôles principaux sont la métabolisation d'acides aminés et d'acides gras à chaîne longue. Il joue également un rôle prépondérant dans l'élimination des molécules d' H_2O_2 produites par la mitochondrie et le chloroplaste, par l'action de la catalase, produisant ainsi de l'oxygène et de l'eau ($H_2O_2 + H_2O_2 \rightleftharpoons O_2 + 2H_2O$) (de Duve and Baudhuin, 1966). Pourtant les peroxysomes sont aussi une source importante de ROS, notamment de peroxyde d'hydrogène, la forme la plus stable de ROS, et d'oxyde nitrique ($NO\cdot$), utilisé pour la signalisation cellulaire (del Río and López-Huertas, 2016; Sandalio and Romero-Puertas, 2015; Walker et al., 2018).

La production de ROS, notamment sous la forme de peroxyde d'hydrogène, est un mécanisme clé dans la communication entre les compartiments cellulaires. Cette voie est notamment utilisée pour signaler au noyau les stress de type abiotique, comme une lumière ou une température excessive (SUZUKI et al., 2012), ou encore les attaques de pathogènes (Waszczak et al., 2018). Les dommages oxydatifs de l'ADN peuvent bloquer la machinerie répliquative, ou entraîner des mutations par mésappariement de base (Salmon et al., 2004).

III.5 Les lésions liées à la réplication

III.5.a Cassures double brin

Les ADN polymérases en charge de la réplication sont par norme plus fidèles que les ADN polymérases impliquées dans la réparation ou la translesion. Certaines d'entre elles possèdent en plus un domaine 3'-5' exonucléase permettant la relecture et l'élimination d'une mauvaise incorporation. C'est le cas des ADN polymérases eucaryotiques pol δ et pol ϵ (Foley et al., 2019) ou encore de l'ADN pol III bactérienne (Scheuermann et al., 1983). Malgré cela, il arrive qu'un mésappariement généré lors de la réplication ne soit pas corrigé, il peut alors introduire une mutation ponctuelle définitivement si elle n'est pas corrigée avant le cycle de réplication suivant (Bullock et al., 2020). En plus des mésappariements la réplication peut être source de cassures double-brin. Comme nous l'avons décrit précédemment, la fourche de réplication peut être bloquée par diverses lésions et altérations du génome, mais aussi lorsqu'elle rentre en collision avec une première fourche de réplication pausée ou un complexe de transcription. Si la fourche de réplication est déstabilisée, elle peut provoquer des instabilités du génome à travers un génome partiellement répliqué et des cassures double brin (Alexander and Orr-Weaver, 2016; Ferreira and Cooper, 2004). Ces cassures, si elles ne sont pas réparées engendrent des remaniements du génome voire la mort cellulaire (Kaina, 2003).

III.5.b L'incorporation de ribonucléotides dans l'ADN.

Enfin, du fait de la surreprésentation des ribonucléotides triphosphate (rNTP) par rapport aux désoxyribonucléotides triphosphate (dNTP) (10 à 100 fois plus), les ADN polymérases répliquatives peuvent également insérer par erreur des ribonucléotides dans l'ADN. Ce défaut d'incorporation a lieu environ tous les 1000 nucléotides (Lee et al., 2012; Nick McElhinny et

al., 2010) et provoque à terme des mutations et l'instabilité du génome (Kellner and Luke, 2020; Schroeder et al., 2017).

III.6 Les R-loop générées lors de la transcription

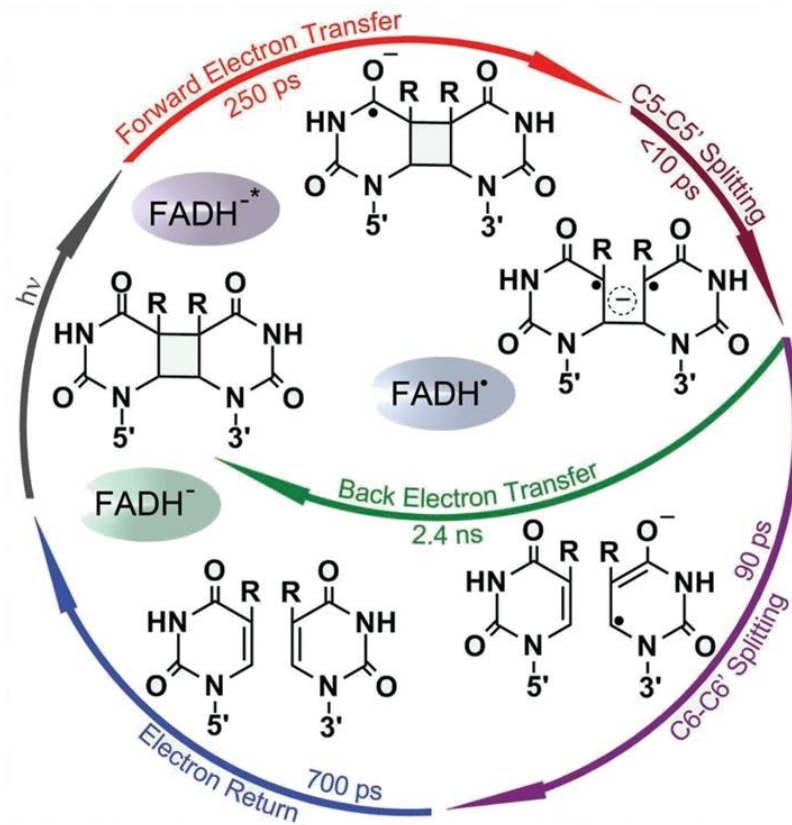
Les R-loop sont des structures à trois brins composées d'un hybride ADN:ARN et d'un troisième brin d'ADN non-apparié. Elles sont nommées ainsi à cause de leur similarité structurale avec les D-loop, mais comprenant une section ARN. Elles ont été observées pour la première fois *in vitro* en 1976 mais étaient considérées comme des artefacts d'expérimentation, jusqu'à ce qu'elles soient observées *in vivo* en 1995 (Drolet et al., 1995; Thomas et al., 1976). Les R-loop sont formées lors de la transcription, préférentiellement dans les régions à promoteurs forts et sont stimulées par une séquence riche en G-C (Ginno et al., 2012; Roy and Lieber, 2009). En conditions normales, lors de la transcription, l'ARN néoformé est relâché par un canal spécifique l'éloignant de son brin d'ADN matrice (Ehara et al., 2017; Yin and Steitz, 2004). L'ARN est ensuite pris en charge par divers facteurs de sorte qu'il ne peut pas se réhybrider à la section d'ADN qui lui est complémentaire. Chez les bactéries il est entouré des ribosomes puis rapidement dégradé. Chez les eucaryotes il est pris en charge par les complexes THO impliqués dans la maturation des ARN messagers et par les complexes TREX (Transcription-Export) chargés de l'exportation du noyau vers le cytoplasme (Hamperl and Cimprich, 2014; Katahira, 2012; Larochelle et al., 2012). L'ARN est ensuite pris en charge par des facteurs protéiques puis est envoyé hors du noyau. Cependant dans certaines conditions, notamment lorsque l'ARN polymérase est bloquée dans sa progression et fait une pause, la présence de lacunes ou de structures secondaires sur l'ADNsb permettent l'appariement de l'ARN néoformé au brin d'ADN matrice (Belotserkovskii et al., 2013; Roy et al., 2010).

Plusieurs rôles bénéfiques ont été décrits pour les R-loop, comme le changement de classe des immunoglobulines (Pavri, 2017) ou la régulation de l'expression des gènes. Des études ont également montré que la présence de R-loop était corrélée à un état décondensé de la chromatine et à une augmentation de la transcription des régions alentours, chez les mammifères (Boque-Sastre et al., 2015; Sanz et al., 2016). Cependant leur présence est également problématique puisqu'elles bloquent la progression des fourches de réplication et peuvent entraîner de l'instabilité du génome ou des cassures de l'ADN (Gan et al., 2011). Lors

de la transcription, l'ADN est exposé sous forme simple brin le rendant plus sensible car plus accessible aux agents mutagènes, tels que les ROS et les nucléases. Ce phénomène est connu sous le nom de mutagenèse associée à la transcription (TAM) (Ne Gaillard et al., 2013). La modification la plus fréquente est la désamination de cytosine en uracile, provoquant à terme une mutation de C vers T. Cette altération se produit jusqu'à 100 fois plus fréquemment sur de l'ADNsb que sur de l'ADNdb (Frederico et al., 1990). La bulle de transcription avançant le long de l'ADN, les brins sont rapidement hybridés à nouveau et donc protégés. La formation d'une R-loop empêche la ré-hybridation des deux brins, exposant ainsi l'ADNsb aux agents mutagènes. Une étude montre chez la levure un lien entre la mutation de la topoisomérase chargée de résoudre les R-loop et l'augmentation de mutations de C en T (Lippert et al., 2011). Chez l'homme, l'accumulation de R-loop peut aboutir à des maladies graves comme des cancers (Richard and Manley, 2017). Enfin, les R-loop peuvent initier des fourches de réplication ectopiques conduisant à des réarrangements génétiques, des cassures double brin et de l'instabilité du génome (Aguilera and García-Muse, 2012; Wimberly et al., 2013).

Afin d'assurer la stabilité du génome, il est nécessaire pour tous les organismes d'avoir au moins un mécanisme capable de résoudre les R-loop. La dégradation du brin ARN par une RNase est la voie privilégiée. Les RNases H sont présentes des bactéries aux eucaryotes ainsi que dans les mitochondries animales (Cerritelli and Crouch, 2009; Kochiwa et al., 2007; Posse et al., 2019). Ce sont des ribonucléases spécifiques de la dégradation du brin ARN dans un hybride ARN:ADN et ne reconnaissent ni l'ARN double brin ni l'ARN simple brin. Chez *E. coli*, lorsque le gène codant pour la RNaseH responsable de l'élimination des R-loop est muté, on observe une augmentation de la recombinaison à des sites ectopiques appelés *oriK* (Maduike et al., 2014). Le brin ARN peut également être détaché par une hélicase. Chez l'homme et la levure, la mutation des hélicases senataxine ou Sen1, résulte en une augmentation de l'accumulation de R-loop, indiquant leur rôle dans leur dégradation. De plus, il a été montré que la senataxine permettait la liaison de l'exoribonucléase 5'-3' XRN2 capable de dégrader l'ARN (Mischo et al., 2011; Skourti-Stathaki et al., 2011). Chez les bactéries, la RNase H1 est capable de dégrader l'ARN, alors que l'hélicase RecG a été montrée comme capable de résoudre des R-loop. La mutation simultanée de *rnhA* et *recG* est létale pour la bactérie (Hong et al., 1995; Vincent et al., 1996). Chez les bactéries l'association de l'ADN polymérase I et des exonucléases ExoV et ExoI permet également leur résolution (Kogoma et al., 1993). Enfin, on reporte également un rôle des topoisomérases dans la régulation des R-loop, mais elles

A



B

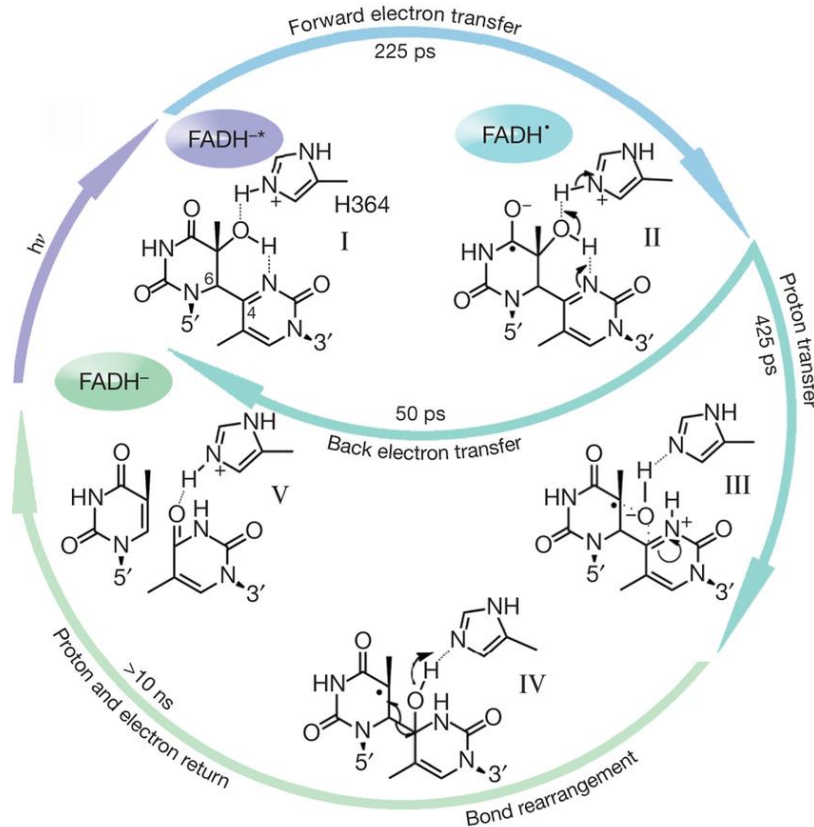


Figure I17. Cycles de réparation des lésions par les photolyases

(A) Photocycle d'une photolyase réparant les lésions de type dimères cyclobutyliques de pyrimidine (CDP). D'après Liu *et al.*, 2011. (B) Photocycle d'une photolyase réparant les lésions de type dimères (6-4) pyrimidine-pyrimidones. D'après Li *et al.*, 2010.

constituent un mécanisme alternatif secondaire, en comparaison à ceux décrits précédemment (el Hage et al., 2010; Manzo et al., 2018).

Dans le chloroplaste, il a été montré que la mutation du gène codant pour l'hélicase ADN:ARN RHON1 induisait une augmentation de R-loop dans le génome (Stoppel et al., 2012; Yang et al., 2020b). Comme décrit précédemment, chez les plantes aucune protéine portant une activité RNase H n'a été confirmée comme mitochondriale, or il est essentiel que ces structures soient résolues du fait de leur potentiel à induire des instabilités du génome. Même si la RNase H mitochondriale n'a pas encore été identifiée, l'hélicase RECG1, une protéine homologue de la RecG bactérienne, a été caractérisée comme mitochondriale chez *A. thaliana* (Wallet, 2016; Wallet et al., 2015).

IV. Les mécanismes impliqués dans la réparation de l'ADN

IV.1 Réparation des lésions de type modifications de bases

IV.1.a La réparation par photo-réactivation

Les photolyases sont des flavoprotéines capables de réparer les lésions de l'ADN dues à une exposition aux UV. Elles opèrent par clivage des liaisons covalentes formant des dimères de pyrimidine. Elles fonctionnent en association avec deux cofacteurs, le premier est une flavine, une molécule de FADH oscillant entre deux états : FADH[•] et FADH⁻. Le second est une antenne photoréceptrice capable de capter les photons et de les transférer à la lésion. Les photolyases passent par une étape de photo-activation, durant laquelle elles réduisent le FADH[•] en FADH⁻ grâce aux photons se trouvant dans le spectre du rouge (300 à 650 nm). Une fois activées, les photolyases peuvent reconnaître la lésion et s'y fixer. L'antenne photoréceptrice utilise des photons du spectre bleu/violet (300 à 450 nm) pour transférer un électron du NADH⁻ à la lésion et ainsi cliver la liaison covalente entre les deux bases (Brettel and Byrdin, 2010). Les photolyases sont spécifiques de la lésion ciblée, il existe ainsi deux types des photolyases en fonction du type de liaison entre les deux pyrimidines. Les CPD photolyases se chargent des dimères cyclobutyliques de pyrimidine (CDP) et les (6-4) photolyases des dimères 6-4PP (Glas et al., 2010) (Figure I17). Les photolyases de type CPD ont pour la première fois été identifiées chez les bactéries par le professeur Sancar (Sancar and Rupert, 1978), mais il aura fallu

attendre plus de 10 ans avant de détecter le second type de photolyases, capable de réparer les lésions de type dimères 6-4PP (Todo et al., 1993). Les photolyases sont présentes chez la plupart des organismes, des bactéries aux animaux. Chez les bactéries, seules les CPD photolyases avaient été identifiées jusqu'à présent. Une équipe vient cependant de mettre à jour la possibilité d'une photolyase bactérienne capable de réparer les deux types de lésions chez *Phingomonas sp.* (Marizcurrena et al., 2020). Les plantes quant à elles possèdent les deux types de photolyases. Des études attestent de leur présence dans la mitochondrie et le chloroplaste, chez le riz (Takahashi et al., 2011) et chez l'*Arabidopsis* (Katarzyna Banaś et al., 2018; Kleine et al., 2003). Cependant, certaines études montrent également une quasi-absence de la réparation des produits CPD dans ces organelles, suggérant qu'elles y jouent un rôle différent (Chen et al., 1996a; Hada et al., 2000). Chez les animaux, seuls les mammifères ne possèdent pas de photolyase fonctionnelle, mais possèdent à la place des cryptochromes, des protéines de la même famille que les photolyases mais sans activité de réparation de l'ADN (Müller and Carell, 2009). Les cryptochromes sont aussi retrouvés chez les plantes et ils sont, entre plusieurs fonctions, impliqués dans la régulation du rythme circadien (Battle and Jones, 2020; van der Horst et al., 1999).

IV.1.b La réparation par excision de nucléotides (NER)

La réparation par le mécanisme du NER ("Nucleotide Excision Repair") consiste en l'excision de nucléotides entiers par clivage d'un brin de l'ADN de part et d'autre de la lésion. Il concerne principalement des lésions qui déforment la structure de l'ADN, provoquées par une exposition aux UV, à des agents génotoxiques comme la cisplatine ou à des rayonnements ionisants (Christensen et al., 2008; Dronkert and Kanaar, 2001). Ce mécanisme est essentiel, l'inhibition de la voie du NER chez l'homme est notamment reliée à une augmentation des cancers (Jager et al., 2019).

Chez les bactéries, le complexe formé des facteurs UvrA, UvrB et UvrC est impliqué dans la reconnaissance de la lésion et sa réparation (van Houten et al., 2005). Un complexe composé de UvrA sous forme de dimère et de UvrB scanne le génome jusqu'à rencontrer une lésion. Le complexe change alors de conformation permettant à UvrC de former un complexe avec UvrB. UvrB agit en tant qu'ATPase conférant l'énergie nécessaire à UvrC pour exercer son activité nucléase (Shi et al., 1992; Zou et al., 1997). Lors du NER, le domaine N-terminal se charge de

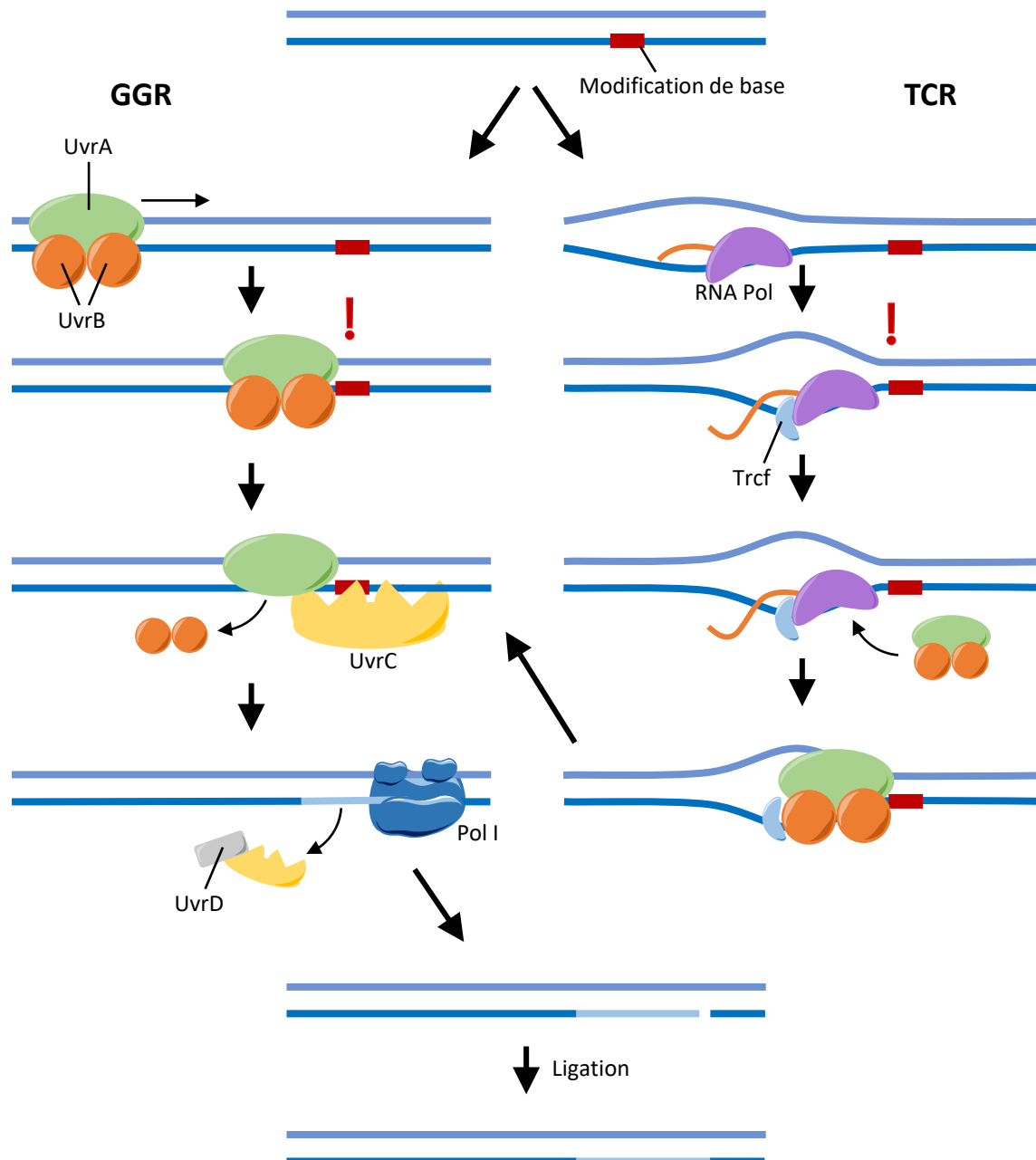


Figure I18. Mécanisme du NER chez la bactérie

Le NER peut suivre deux voies. La voie générale (GGR) durant laquelle un complexe UvrA/UvrB scanne l'ADN à la recherche d'une modification de base, il change alors de structure pour recruter UvrC qui clive de part et d'autre de la lésion. UvrD détache UvrC afin de laisser la place à l'ADN polymérase. La voie couplée à la réparation (TCR) a lieu lorsque l'ARN polymérase est stoppée par la base modifiée. Trcf recrute alors le complexe UvrA/UvrB et la voie rejoint celle du GGR. Les deux brins sont liés par la ligase.

cliver le brin d'ADN 4 à 5 nucléotides en 3' de la lésion et le domaine C-terminal clive 8 nucléotides en 5' de la lésion, formant un gap de 12 à 13 nucléotides (Moolenaar et al., 1997, 1998). Une fois l'incision opérée, l'hélicase UvrD est recrutée pour décrocher UvrC et laisse ainsi l'espace nécessaire au recrutement de l'ADN polymérase I qui va synthétiser les nucléotides manquants (Caron et al., 1985; Orren et al., 1992). Les deux fragments d'ADN sont liés par l'action de l'ADN ligase I. Récemment il a été montré que d'autres facteurs comme l'alkyltransférase étaient également capables de scanner l'ADN à la recherche d'une lésion précise (ici des alkylations de base) afin de recruter la machinerie du NER (Rill et al., 2020). Cette voie du NER est nommée réparation globale du génome (GGR) en opposition à la réparation couplée à la transcription (TCR). Chez la bactérie, la voie TCR est empruntée lorsque l'ARN polymérase est bloquée par une lésion formant une interaction forte. Le facteur de réparation couplé à la transcription Mfd (ou aussi TRCF, pour "Transcription Repair Coupling Factor") va alors recruter le complexe composé d'un dimère d'UvrA et d'une UvrB. Ce complexe change de conformation au contact de la lésion et recrute UvrC pour l'étape de clivage. Cette voie alternative est importante car elle a lieu dans les régions fortement transcrites et permet donc une réparation plus rapide des gènes essentiels pour la cellule (Ghodke et al., 2019; Selby and Sancar, 1993) (Figure I18).

L'homme ne possédant pas de photolyase, la réparation des dommages liés à une exposition aux UV repose principalement sur le NER. Deux voies alternatives du NER coexistent, mais contrairement aux procaryotes, elles n'impliquent pas les mêmes facteurs et sont indépendantes (Spivak, 2015). Dans la voie du GGR, le complexe XPC/RAD23b/CETN2 scanne le génome en permanence et peut directement reconnaître les lésions si elles altèrent suffisamment l'ADN. Si la lésion ne distord pas assez l'ADN, la lésion est d'abord reconnue par le complexe DDB1/DDB2 qui permettra la fixation de XPC sur le site de la lésion. (Alekseev et al., 2008; Cheon et al., 2019). Ce dernier peut alors recruter le facteur de transcription TFIIH, un complexe protéique composé, entre autres, des XPB et XPC, deux protéines capables d'activité hélicase et ATPase. Elles ont la charge d'ouvrir l'ADN afin de former une boucle de 20 nucléotides autour de la lésion (Li et al., 2015). L'extrémité 5' de la boucle est clivée par XPF et l'extrémité 3' par XPG. L'ADN polymérase $\text{pol}\delta$ synthétise les nucléotides manquants puis la ligase joint les extrémités de l'ADN. Lorsque l'ARN polymérase II est bloquée par une lésion, la voie du TCR se met en place, le facteur de transcription CSB et le complexe CSA sont

recrutés (Beerens et al., 2005). Enfin ce dernier recrute à son tour les protéines XAB2, HMGN1 et TFII, rejoignant ainsi la voie du GGR.

Chez les plantes, des photolyases sont présentes et réparent le même type de dommages que le NER et de ce fait ce dernier a peu été étudié. Pourtant, dès 1975, il a été montré que même en conditions d'obscurité les lésions générées par les UV étaient réparées par un mécanisme différent des photolyases (Howland, 1975), hypothèse qui a depuis été confirmée par d'autres expériences (Canturk et al., 2016). On évalue que les mécanismes du NER chez les plantes sont proches de ceux des animaux car des homologues de plusieurs facteurs ont été caractérisés (Kimura and Sakaguchi, 2006; Kunz et al., 2005). Certains facteurs clef semblent toutefois absents comme XPA, mais ils pourraient également ne pas avoir été identifiés du fait d'une trop grande divergence entre orthologues (Canturk et al., 2016).

Dans les mitochondries humaines et végétales, on a pour l'heure pas encore identifié de facteur pouvant être impliqué dans la voie du NER (Pascucci et al., 1997). On peut cependant noter qu'une protéine similaire au facteur Mfd bactérien a été retrouvée comme adressée au chloroplaste chez *A. thaliana* (Chevigny, 2019; Wallet, 2016). Le gène codant cette protéine est conservé dans toutes plantes terrestres et algues vertes. Cependant, le domaine d'interaction avec UvrAB n'est pas conservé dans cette protéine chloroplastique qui a peut-être évolué pour d'autres fonctions pas encore élucidées (Chevigny, 2019).

IV.1.c La réparation de mésappariement de bases (MMR)

Il ne s'agit pas ici de bases modifiées à proprement parler, mais de la réparation de mésappariements de bases par le mécanisme du "mismatch repair" (MMR). Ces erreurs sont principalement la conséquence d'erreurs d'incorporation de nucléotides par l'ADN polymérase (Ayala-García et al., 2018). Bien que la fidélité soit assurée et améliorée par l'activité de relecture du domaine 3'-5' exonucléase des ADN polymérases, le risque de mauvaise incorporation d'un nucléotide existe (Bębenek and Ziuzia-Graczyk, 2018). Ces mésappariements de bases sont difficiles à détecter pour les mécanismes de réparation, car ils ne déforment pas l'ADN. Cependant les mésappariements entraînent des mutations pouvant, par accumulation, être délétères pour la cellule (Edelmann et al., 1997). Lors de la réplication, les deux brins sont séparés et répliqués indépendamment. Dans le cas d'un mésappariement, une des copies du génome sera intègre tandis que l'autre aura

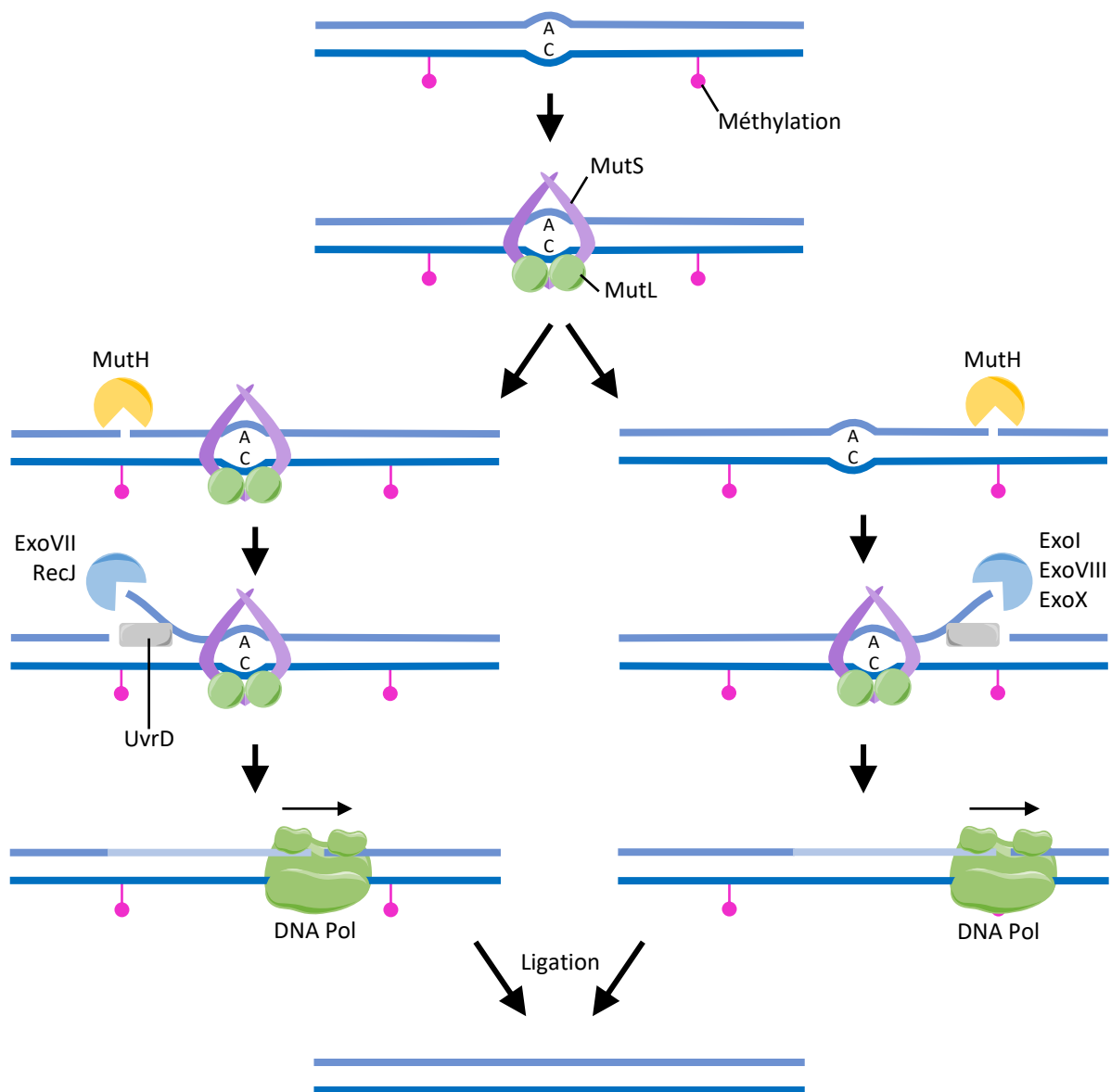


Figure I19. Schéma du mécanisme du MMR chez la bactérie

Le facteur MutS reconnaît les mésappariements de base et s'y fixe, puis recrute MutL. MutH clive l'ADN en 5' ou en 3' de la lésion, ciblant le brin néosynthétisé reconnu par son absence de méthylation. L'hélicase UvrD sépare les brins d'ADN qui sont dégradés par l'action d'une exonucléase. L'ADN polymérase comble le gap et les brins sont liés par la ligase.

définitivement intégré la mutation sur les deux brins, rendant l'altération impossible à détecter. Les mécanismes de réparation des mésappariements de bases doivent donc être suffisamment efficaces pour reconnaître et éliminer la lésion avant l'initiation de la réplication.

Chez les bactéries, le mécanisme de réparation des mésappariements de bases est appelé "système MutHLS" en référence aux principaux facteurs. La protéine MutS est capable de reconnaître les mésappariements et de s'y lier. Le facteur MutL va alors s'associer au complexe permettant l'action de l'endonucléase MutH qui clive l'ADN en amont ou en aval de la lésion, au niveau d'un site GATC. La nucléase MutH a la particularité d'être plus active sur les sites hémi-méthylés et d'y cliver le brin non-méthylé. Dans la bactérie, les brins néo-synthétisés n'étant pas immédiatement méthylés, cette propriété permet d'assurer l'intégrité du brin parental (Jae et al., 2005; Langle-Rouault et al., 1987). Une exonucléase dégrade alors le brin clivé jusqu'à la lésion signalée par la présence du complexe MutS/MutL. L'identité de l'exonucléase dépend si le clivage par MutH a eu lieu en amont ou en aval de la lésion (Figure I19)(Kolodner, 1996).

Concernant les eucaryotes, on retrouve six homologues de MutS chez la levure, ils sont nommés MSH1-6 pour "MutS homologue" (Marsischky et al., 1996) dont MSH4 et 5 qui ne sont pas impliqués dans la voie du MMR (Ross-Macdonald and Roeder, 1994). Chez les animaux et l'*Arabidopsis*, trois homologues ont été identifiés, MSH2,3 et 6. Chez les plantes on retrouve également MLH, une protéine homologue au facteur MutL. (Adé et al., 1999; Jean et al., 1999; Kolodner, 1996). Chez les plantes MSH1 est adressée à la mitochondrie et au chloroplaste. Aucun homologue de MutL ou de MutH n'a encore été identifié dans les organelles. MSH1 possède un domaine GIY-YIG homing-endonucléase en C-terminal, mais il a été montré qu'il n'a pas d'activité nucléase mais qu'il est capable de lier l'ADN sous forme branchée. Son inactivation par mutation engendre le même phénotype que la non-expression de la protéine entière, indiquant l'importance de ce domaine dans la voie du MMR dans les mitochondries végétales (Fukui et al., 2018; Reenan and Kolodner, 1992)

IV.1.d La réparation par excision de ribonucléotides

Les ribonucléotides incorporés par erreur dans le génome sont éliminés par le mécanisme de réparation par excision de ribonucléotides (RER). Il consiste en la reconnaissance de la lésion

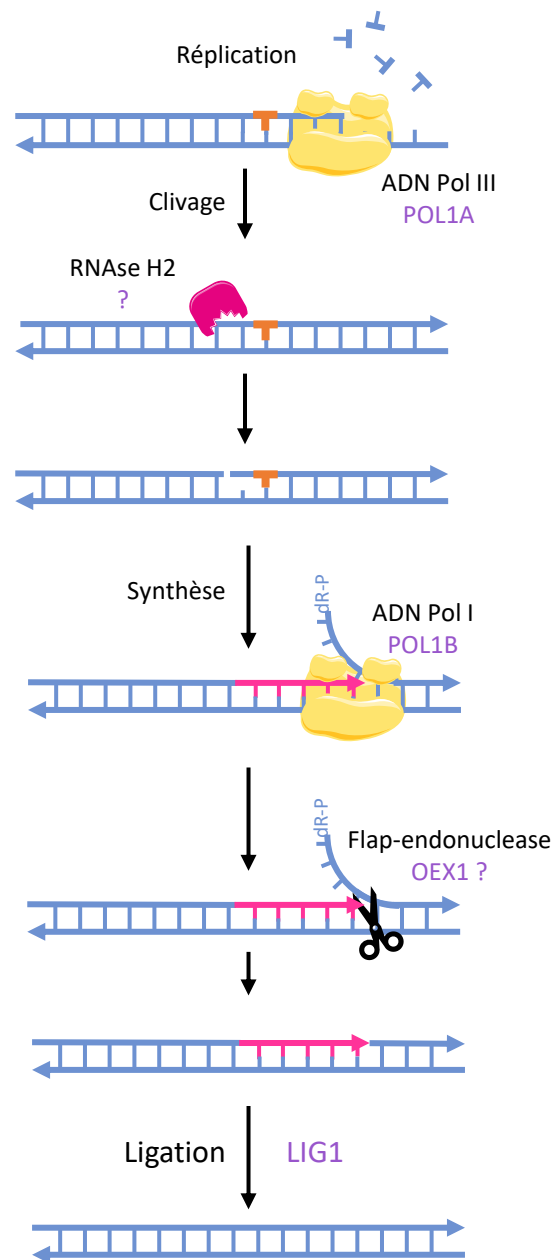


Figure I20. Mécanisme d'élimination des ribonucléotides chez les bactéries par le RER.

Lorsqu'un ribonucléotide est inséré par erreur lors de la réplication, il est détecté par la RNase H2 qui clive le brin en 5' de l'erreur. L'ADN polymérase Pol I déplace le brin qui forme une structure de type flap puis la clive. Les deux brins sont liés. La mitochondrie végétale possède les facteurs nécessaires à ce mécanisme à l'exception de la flap-endonucléase qui pourrait être OEX1. Les facteurs possibles du mécanisme présents chez les mitochondries des plantes sont indiqués en violet.

par une RNase H (RNase H2 chez les eucaryotes) qui va alors cliver le brin altéré en 5' de celle-ci, puis une ADN polymérase assure le déplacement du brin altéré. La section simple brin contenant le ribonucléotide est alors clivée par une flap-endonucléase, par exemple FEN1 ou EXO1 (Sparks et al., 2012). Une seconde voie de réparation des incorporations de ribonucléotides se met en place lorsque la voie impliquant la RNase H ne peut pas être empruntée, elle est dépendante de la topoisomérase (Williams et al., 2013). Elle n'est cependant pas privilégiée car elle peut être source d'erreurs. Dans cette voie, le résidu catalytique tyrosine de la topoisomérase se lie à l'extrémité 3' phosphate du ribonucléotide. Une tyrosyl-ADN phosphodiesterase est chargée de cliver la lésion, laissant une lacune dans l'ADN qui peut être comblée par l'ADN polymérase. C'est la voie fidèle de la voie dépendante de la topoisomérase. Dans le cas où cette voie n'est pas empruntée, les deux extrémités du brin clivé se liguent et génèrent ainsi une boucle dans le brin complémentaire, pouvant conduire à des mutations (Kim et al., 2011; Sparks and Burgers, 2015) (Figure I20).

Dans les mitochondries des plantes, aucune étude n'a été menée quant au risque d'incorporation de ribonucléotides dans l'ADN par les polymérases, mais les ADN polymérases organellaires, comme toutes les polymérases, ne sont pas exemptes d'erreur. On peut donc penser qu'elles incorporent également des ribonucléotides dans l'ADN. La protéine RNH1B est une RNase H codée par le noyau et susceptible d'être mitochondriale, mais sa localisation n'a pas été confirmée (Kuciński et al., 2020). La fonction de déplacement de brin pourrait être portée par POL1B, qui probablement effectue ce type d'activité. Cependant, la flap-endonucléase chargée de cliver le brin altéré n'était jusqu'à présent pas identifiée.

IV.1.e La réparation par excision de base

La réparation par excision de base ou BER ("Base Excision Repair") consiste en l'excision d'une base modifiée et le remplacement du nucléotide. Nous avons décrit précédemment les mécanismes du NER en charge de lésions encombrantes de l'ADN, impliquant principalement des liaisons covalentes et capables de bloquer les ARN et ADN polymérases. Le BER est quant à lui le mécanisme favorisé pour la réparation de modifications de bases moins encombrantes mais pouvant aboutir à des mutations. Parmi ces altérations on retrouve les bases oxydées, alkylées, désaminées ou la présence d'uracile intégré par une erreur de l'ADN polymérase ou par désamination d'une cytosine (Frederico et al., 1993; Krokan and Bjørås, 2013).

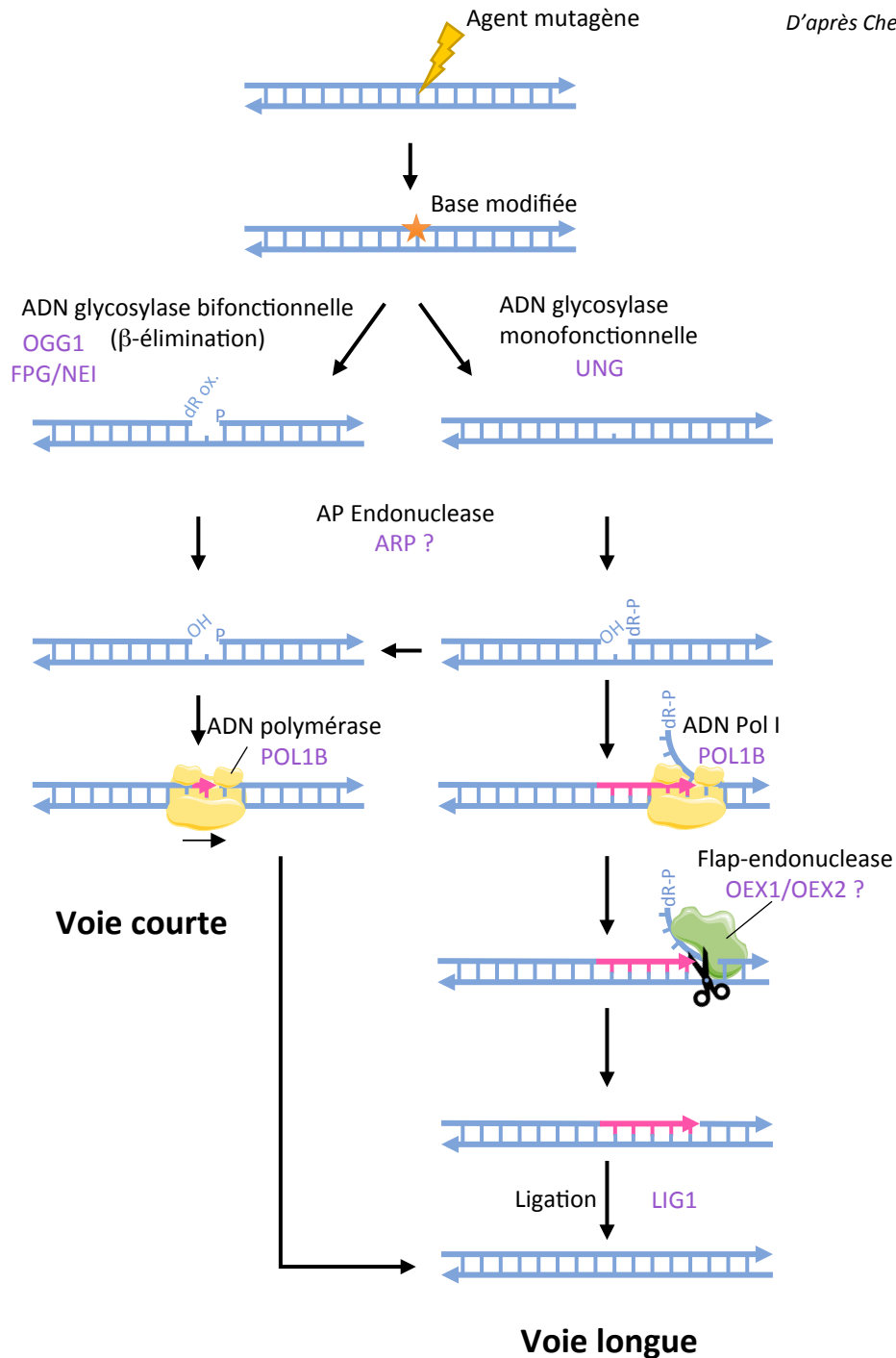


Figure I21. Schéma représentant le mécanisme du BER.

Les bases modifiées, suite à l'action d'un agent mutagène, sont excisées par une ADN glycosylase monofonctionnelle ou bifonctionnelle. Les premières excisent la base tandis que les secondes clivent le site abasique en 3' de la lésion pouvant laisser une unité désoxyribose oxydée (dR ox.) en 3'. Ensuite, dans les 2 cas, une AP-endonucléase crée une extrémité 3'-OH utilisable par l'ADN polymérase. Dans la voie courte du BER, l'ADN polymérase comble le gap. Lors de la voie longue, l'ADN polymérase déplace le brin sur une dizaine de nucléotides, formant une structure flap clivée par une flap-endonucléase pouvant être OEX1 dans la mitochondrie et possiblement OEX2 dans le chloroplaste. D'après *Chevigny et al., 2020*. Les facteurs du BER de la mitochondrie et du chloroplaste sont indiqués en violet.

Le mécanisme du BER est présent chez tous les organismes et son principe est relativement conservé. Il est initié par le clivage du lien N-glycosyl entre la base et le désoxyribose par une glycosylase. Cette étape forme un site apurique ou apyrimidique (site AP) clivé en 5' de la lésion par une AP-endonucléase. L'ADN polymérase est alors recrutée afin de combler le gap puis une ADN ligase soude les deux extrémités. Bien que le principe général reste le même, on distingue deux voies du BER : la voie du "short patch" et celle du "long patch" (Figure I21). Le choix entre ces voies dépend du type de glycosylase impliquée, qui elle-même dépend du type de lésion (Mullins et al., 2019). Dans le cas d'une oxydation de base, les glycosylases de type bifonctionnelles clivent aussi le brin d'ADN en 3' de la lésion grâce à leur activité lyase supplémentaire. Ainsi, lorsque l'AP-Endonucléase clive en 5', il en résulte un gap d'un nucléotide entouré d'extrémités 3'-OH et 5'-P, gap qui est comblé par l'ADN polymérase. Dans le cas de l'incorporation d'uracile, les glycosylases monofonctionnelles clivent uniquement la base. Ainsi l'activité de l'AP endonucléase crée une coupure dans l'ADN entourée d'une extrémité 3-OH et 5'-désoxyribophosphate (5'-dR-P). Ici l'ADN polymérase ne va pas se contenter d'ajouter un nucléotide manquant, mais va effectuer une action de déplacement de brin sur 2 à 10 nucléotides formant une structure à trois branches appelée flap. L'extrémité simple brin est clivée par une flap-endonucléase permettant à la ligase de souder les deux extrémités. Le mécanisme du BER est retrouvé chez tous les êtres vivants, de la bactérie à l'homme, cependant dans certains organismes seule une des deux voies est présente (Córdoba-Cañero et al., 2009; Sattler et al., 2003).

Le BER dans la mitochondrie végétale

Le BER est un mécanisme de réparation de l'ADN retrouvé également dans les mitochondries. Dans les mitochondries des animaux on retrouve plusieurs ADN glycosylases et l'AP-endonucléase APE1. Le gap est comblé par l'ADN polymérase pol G, puis le flap est clivée par FEN1 ou EXOG. Enfin les deux brins sont liés par LIGIII (Prakash and Doublié, 2015)

Plusieurs recherches montrent la présence du mécanisme du BER dans les mitochondries végétales, par la mutation de facteurs impliqués dans la voie du BER dans le noyau mais montrant aussi une augmentation du taux de lésions de type oxydatives dans la mitochondrie (Córdoba-Cañero et al., 2014). Une glycosylase capable de reconnaître la présence d'uracile ainsi qu'une AP-endonucléase avaient déjà été identifiées chez la pomme de terre et l'*Arabidopsis* (Boesch et al., 2009). Cette glycosylase de type monofonctionnelle indique la

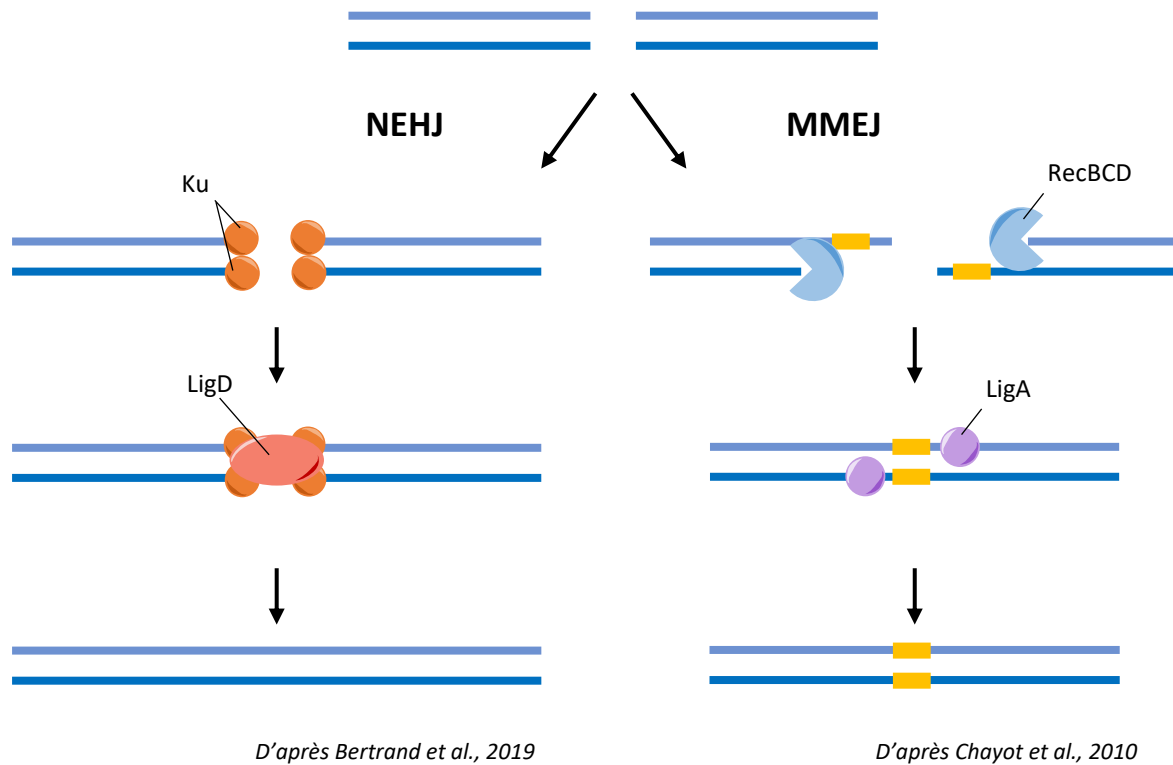


Figure I22. Schémas simplifiés des mécanismes du NHEJ et du MMEJ chez la bactérie.

Lors d'une cassure double brin la voie du NHEJ peut être suivie. Les facteurs Ku s'associent aux extrémités de l'ADN et lorsqu'une autre extrémité est trouvée, la ligase LigD est recrutée et permet le raccordement des deux sections de l'ADN. Une voie alternative appelée MMEJ prend place par hybridation de microhomologies révélées lors de la résection des brins par RecBCD. Les deux sections s'hybrident possiblement aidées par l'action de la LigA. L'ADN polymérase comble les éventuelles lacunes puis les brins sont ligués par la LigA reconstituant un ADN intègre mais ayant perdu la séquence présente entre les deux microhomologies. D'après *Bertrand et al., 2019* et *Chayot et al., 2010*.

probable présence de la voie du long-patch du BER dans la mitochondrie végétale. Une étude plus récente effectuée sur la pomme de terre a montré la présence de protéines similaires à NEIL1 et OGG1, des glycosylases bifonctionnelles reconnaissant les bases oxydées, dans le protéome mitochondrial (Ferrando et al., 2019). Les mitochondries végétales comptent deux ADN polymérases, POL1A et POL1B, et on attribue un rôle plus important dans la réparation à POL1B (Parent et al., 2011). Seule la protéine portant l'activité flap-endonucléase n'a pas encore été identifiée, mais elle est pourtant essentielle dans le mécanisme "long-patch" du BER. Chez les bactéries cette activité est portée par le domaine 5'-3' exonucléase de l'ADN polymérase I. Chez les plantes, les hommes et la levure, une flap-endonucléase FEN1 a été caractérisée, mais chez les plantes elle est décrite comme strictement nucléaire (Zhang et al., 2016). A l'heure actuelle, aucune protéine portant une activité 5'-3' exonucléase ou flap-endonucléase n'a été identifiée dans les mitochondries et chloroplastes de plantes. Deux protéines cependant ont été identifiées comme adressées aux organelles et possédant un domaine 5'-3' exonucléase potentiel, il s'agit de OEX1 et OEX2, pour "Organellar Exonuclease" 1 et 2 (Figure I21). Il s'agit du sujet de cette thèse, je reviendrai donc dessus plus tard.

IV.2 Réparation de cassures double-brin par NHEJ / MMEJ

La voie du NHEJ ("Non-Homologous End Joining") est un système de réparation des cassures double brin qui consiste simplement en la ligation de deux extrémités de l'ADN. Elle est présente chez les eucaryotes et quelques bactéries (Aravind and Koonin, 2001). Chez l'homme, une protéine kinase ADN-dépendante se lie au complexe Ku et favorise le rapprochement des deux extrémités. L'ADN ligase IV (LIG4), stabilisée par XRCC4, permet la liaison entre les deux extrémités (Scully et al., 2019)(Figure I22). Bien que les mécanismes aient évolués, la première étape et les facteurs qu'elle implique semblent très conservés dans l'évolution. Il s'agit de la liaison de protéines Ku aux extrémités de l'ADN pour empêcher la résection des brins par des exonucléases (Aravind and Koonin, 2001). Chez les plantes on retrouve, comme chez l'homme, un complexe Ku composé de Ku70 et Ku80, ainsi que des homologues des protéines LIG4 et XRCC4 (Nishizawa-Yokoi et al., 2012; West et al., 2000). La voie du NHEJ n'a, pour le moment, pas été identifiée dans les mitochondries et les chloroplastes de plantes.

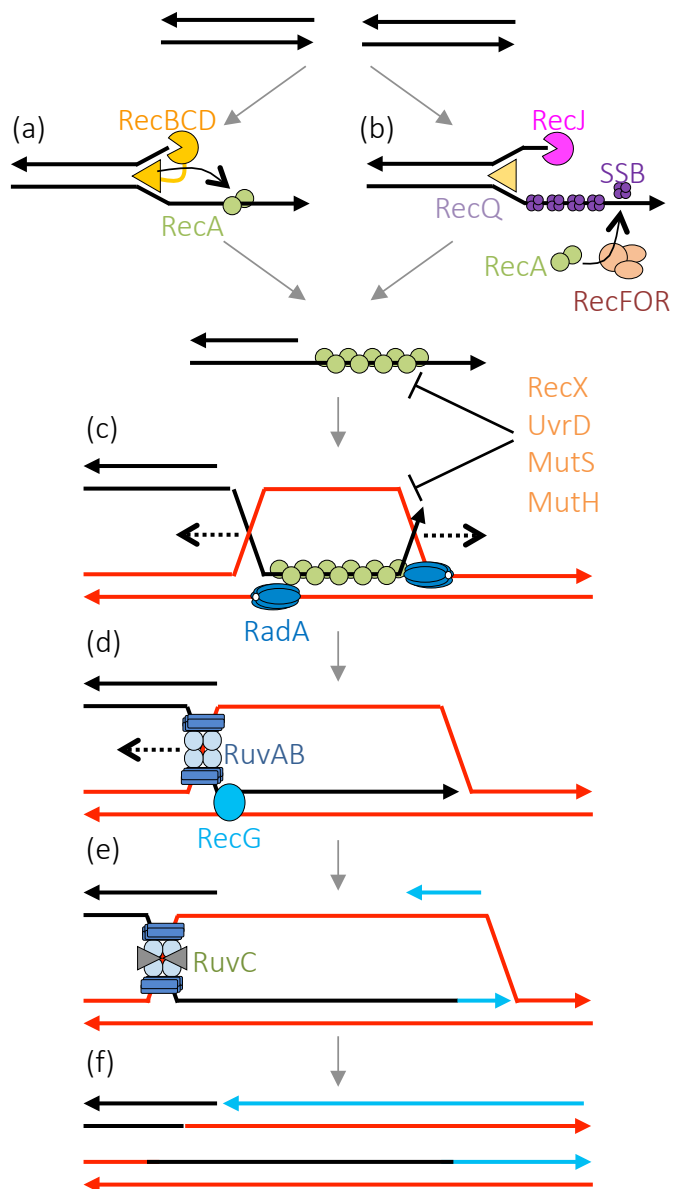
Une voie alternative au NHEJ est le MMEJ ("Microhomology-mediated End Joining") qui permet la jonction de deux extrémités mais possédant une homologie de quelques nucléotides seulement, jusqu'à seulement 5 nucléotides. Chez les levures et les mammifères, la résection des brins est assurée par le complexe MRX (Mre11, Rad50 et Xrs2) et la protéine CtIP respectivement (Bennardo et al., 2008; Ma et al., 2003). Le mécanisme par lequel la séquence homologue est trouvée n'est pour l'instant pas élucidée. L'hybridation des deux brins au niveau de l'homologie de séquence forme une structure de type flap nécessitant d'être clivée par les facteurs Rad1-Rad10 et XPF chez la levure et les mammifères respectivement. Les lacunes sont comblées par l'ADN polymérase et les extrémités sont jointes par l'ADN ligase IV (Ahmad et al., 2008; Ma et al., 2003) (Figure I22). Chez les plantes, la voie du MMEJ a été suggérée comme présente dans le chloroplaste et la mitochondrie (García-Medel et al., 2019; McVey and Lee, 2008). Cependant, la protéine portant l'activité 5'-3' exonucléase nécessaire pour la résection des brins ainsi que la flap-endonucléase cruciale pour la résolution des structures générées ne sont toujours pas identifiées.

Ces mécanismes de réparation sont peu fidèles et sont sources de délétions et de réarrangements du génome. Ils sont pourtant les voies favorisées pour la réparation des cassures double brin dans les tissus somatiques des eucaryotes.

IV.3 Réparation des cassures double brin par recombinaison homologue

IV.3.a Mécanismes et facteurs, l'exemple du DSBR

La réparation par recombinaison homologue (HR) est le mécanisme principal des réparations de cassures double brin chez les bactéries. Il est lui-même composé de plusieurs voies alternatives que nous décrirons spécifiquement ultérieurement. Afin de décrire le mécanisme général et les facteurs impliqués dans la HR, nous allons dans un premier temps décrire la voie du DSBR ("Double Strand Break Repair"). Dans son principe fondamental, la recombinaison homologue commence par la résection, de 5' en 3', des brins au niveau de la cassure. Chez la bactérie cette résection est gérée par le complexe RecBCD composé de deux hélicases permettant l'ouverture de l'ADN. RecB possède également une activité 5'-3' exonucléase très processive responsable de la résection des brins formant ainsi une structure de type "overhang" en 3' (Karabulut et al., 2020; Lohman and Fazio, 2018). Cette résection peut également emprunter la voie RecFOR, par laquelle l'hélicase RecQ ouvre l'ADN et la 5'-3'



(g)

<i>E. coli</i>	<i>A. thaliana</i>	AGI code
Strand resection		
RecBCD	?	-
Protection of DNA		
SSB	SSB1	At4g11060
	SSB2	At3g18580
Loading of the recombinase		
RecFOR	ODB1	At1g71310
	WHY2	At1g71260
	OSB1	At1g47720
	OSB3	At5g44785
	OSB4	At1g31010
Formation of the synapsis		
RecA	RECA2	At2g19490
	RECA3	At3g10140
Recombination regulation		
RecX	RECX	At3g13226
UvrD	-	
MutH	MSH1	At3g24320
MutS		
Branch migration		
RadA	RADA	At5g50340
RecG	RECG1	At2g01440
RuvAB	?	-
Holliday junction resolution		
RuvC	-	-
Yqgf?	YQGF?	AT3G52905
DNA synthesis & ligation		
Poll	POL1B	At3g20540
LigA	LIG1	At1g08130

Chevigny et al., 2020

Figure I23. Schéma général de la recombinaison homologue chez la bactérie : la voie du DSBR

La première étape est la résection des brins. (a) La voie de la résection par le complexe RecBCD composé de deux hélicases et de RecB, une nucléase, permet le chargement de la recombinase RecA sur la partie simple brin. (b) Une voie alternative existe où la résection est effectuée par l'hélicase RecQ et la nucléase RecJ. La partie simple brin est couverte par les facteurs SSB qui sont ensuite remplacés par RecA à l'aide du complexe RecFOR. Cette voie est plus spécifique de la réparation des gaps simple brins. (c) L'ADN simple brin envahit un ADN homologue, formant ainsi une D-loop. (d) La migration des branches se fait par RadA dans un premier temps puis par les translocases RecG et RuvAB dans un second temps. Elle permet ainsi l'extension de l'homologie et l'invasion du quatrième brin formant une structure appelée jonction de Holliday (HJ). (e et f) La nucléase RuvC résout la HJ produisant ou non un cross-over selon le sens de section. L'ADN polymérase comble les gaps. (g) Liste des facteurs bactériens et de leurs potentiels homologues fonctionnels chez la mitochondrie de plantes. *Chevigny et al., 2020*

exonucléase RecJ dégrade rapidement un des brins (Morimatsu and Kowalczykowski, 2014). L'ADNsb est d'abord entouré de protéines SSB pour le protéger et empêcher la formation de structures secondaires. Ces dernières sont alors déplacées par le complexe RecFOR qui permet alors le chargement des protéines RecA sur l'ADNsb (Roy et al., 2009; Umezumi and Kolodner, 1994).

Le nucléofilament composé de l'ADNsb et des RecA scanne alors l'ADN à la recherche d'une séquence complémentaire. Lorsqu'une séquence homologue est trouvée, l'ADNsb s'hybride à la séquence homologue de l'ADNdb, formant une structure à trois branches appelée D-loop ("Displacement-loop"). RecA recrute alors RadA, un facteur permettant, par son activité hélicase, l'ouverture de l'ADN homologue et par migration de branches l'hybridation du brin libre sur une plus grande longueur (Beam et al., 2002). Cette migration peut également être effectuée par l'hélicase RecG recrutée par les SSB (Whitby et al., 1994). L'extension de la D-loop permet son invasion par la seconde extrémité de l'ADNsb et forme ainsi une structure appelée jonction de Holliday (HJ) (Mawer and Leach, 2014). Ces HJ sont déplacées par l'action du complexe RuvAB composé d'une RuvA et de deux RuvB. Par hydrolyse d'ATP, le complexe est responsable de migration des branches pendant que les deux brins sont prolongés par l'action de l'ADN polymérase (Xie, 2007). Les jonctions de Holliday sont alors clivées par une resolvase et chez les bactéries c'est le complexe RuvC recrutée par le complexe RuvAB qui en a la charge. Celui-ci va déterminer le sens de clivage effectué par la resolvase RuvC (West, 1997) qui lui-même détermine si le produit de la recombinaison homologue fait intervenir ou non un crossover (Cromie and Leach, 2000).

Chez les plantes, la recombinaison homologue est, avec le BER, une des deux voies principales de réparation de l'ADN organellaire. Plusieurs facteurs homologues aux facteurs bactériens ont été identifiés comme adressés aux organelles et caractérisés (Figure I23). Les organelles des plantes possèdent parfois plusieurs copies de certains facteurs comme les protéines SSB1 et SSB2, homologues de la SSB bactérienne mais dont la raison de duplication est encore inconnue (Edmondson et al., 2005). Les protéines WHY1, 2, 3 et OSB1, 2, 3, 4 ont probablement des rôles de médiateurs de la recombinaison, permettant le remplacement des SSB par les homologues de la RecA bactérienne : RECA1, 2 et 3 (Cappadocia et al., 2012; Maréchal et al., 2009; Miller-Messmer et al., 2012; Zaegel et al., 2006). En plus des RECA, ODB1 et 2, des protéines spécifiques des organelles des plantes qui semblent être des homologues fonctionnels de Rad52, pourraient être impliquées dans le recrutement du

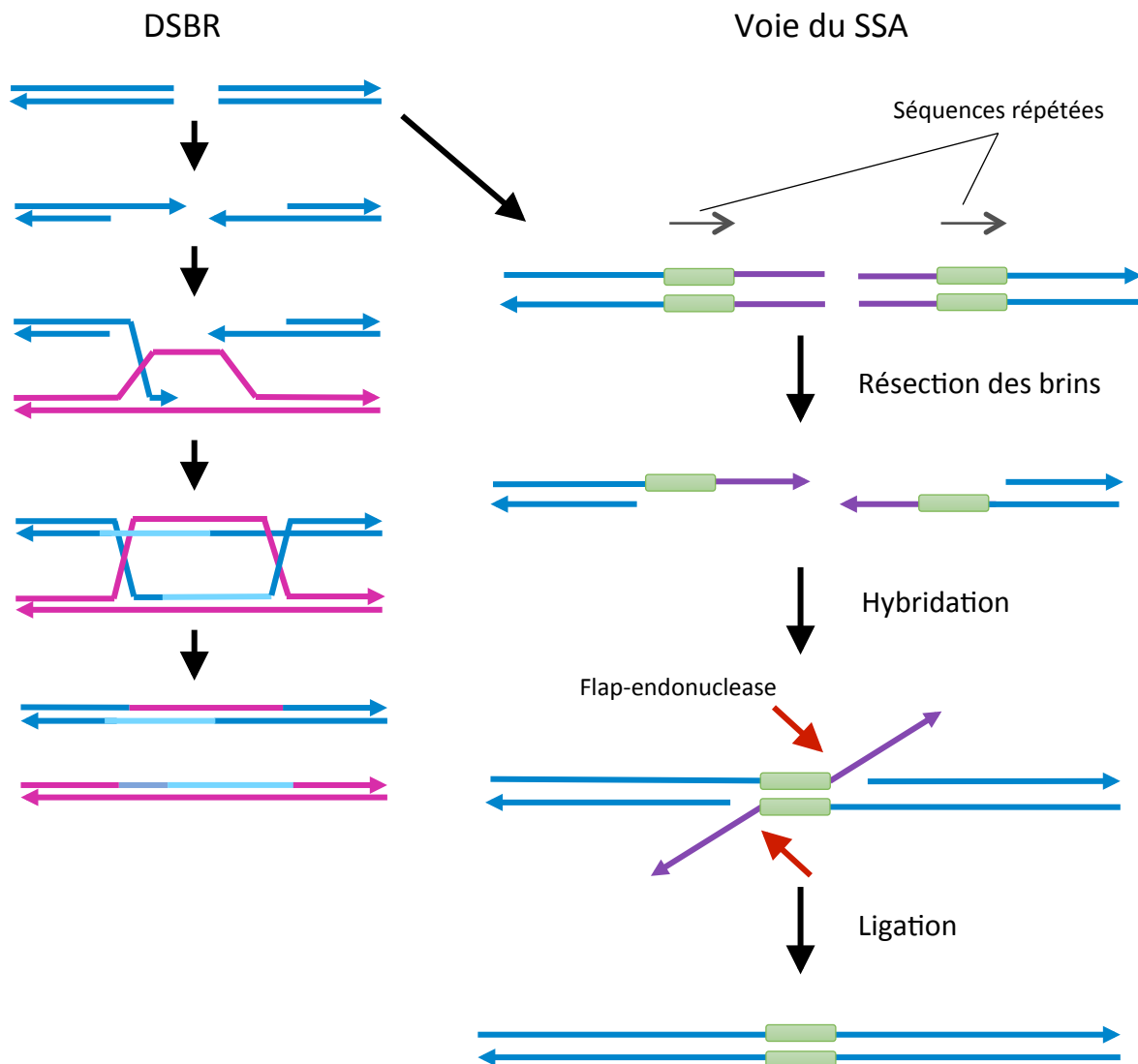
second brin de la séquence homologue (Gualberto et al., 2015). Une fois la D-loop formée, RADA et RECG1, des homologues de RadA et RecG chez la bactérie, pourraient participer à la migration des branches (Chevigny et al., 2019; Wallet et al., 2015). Aucun homologue à RuvAB n'a été identifié chez les plantes, ce qui fait penser que la migration de branche dans les organelles dépend seulement de RADA et de RECG1. L'élongation des brins peut être effectuée par POL1A ou par POL1B, bien qu'il soit possible que ce soit POL1B, plus impliquée dans la réparation, qui ait préférentiellement la charge de l'élongation dans la HR (Ayala-García et al., 2018). D'autres facteurs essentiels à la recombinaison homologue ne sont pas encore identifiés ou caractérisés (Gualberto and Newton, 2017). C'est le cas notamment de la nucléase responsable de la résection des brins permettant de générer des extrémités 3' sortantes, ainsi que la resolvase mitochondriale capable de cliver les jonctions de Holliday (Chevigny et al., 2020). Dans le chloroplaste la resolvase MOC1 a été caractérisée (Kobayashi et al., 2017). Dans la mitochondrie, YQGF, une protéine similaire à *yqgf* bactérienne considérée comme une alternative à RuvC, est en cours de caractérisation dans notre équipe. Elle pourrait potentiellement porter ce rôle de resolvase (Aravind et al., 2000).

Ce mécanisme de recombinaison homologue peut également avoir lieu lors de la formation d'un gap simple brin. Chez les bactéries, les SSB sont ainsi chargées sur l'ADNsb puis le complexe recFOR permet le remplacement des SSB par RecA pour la formation d'un nucléofilament. Ce dernier permet l'invasion d'une séquence homologue et la formation d'une D-loop. Comme dans le mécanisme du DSBR, les jonctions de Holliday formées après synthèse de la séquence manquante sont clivées par le complexe RuvABC (Gualberto and Newton, 2017). Comme décrit plus haut, dans les organelles des plants ni RecFOR ni RuvABC ne sont présents.

IV.3.b Cas particuliers

IV.3.b.i La voie du SSA

Lorsque la résection des brins révèle des séquences répétées de plus de 29 nucléotides de part et d'autre de la cassure, la voie du SSA ("Single-Strand Annealing") peut avoir lieu (Sugawara et al., 2000). Cette voie a été identifiée chez les plantes, la levure et les bactéries (de Groot et al., 1992; Ithurbide et al., 2015; Ivanov et al., 1996). Chez la levure, une fois la résection effectuée, Rad52 et RPA se lient aux extrémités 3' sortantes et facilitent l'hybridation des deux ADNsb complémentaires au niveau de l'homologie. Des structures de type flap sont

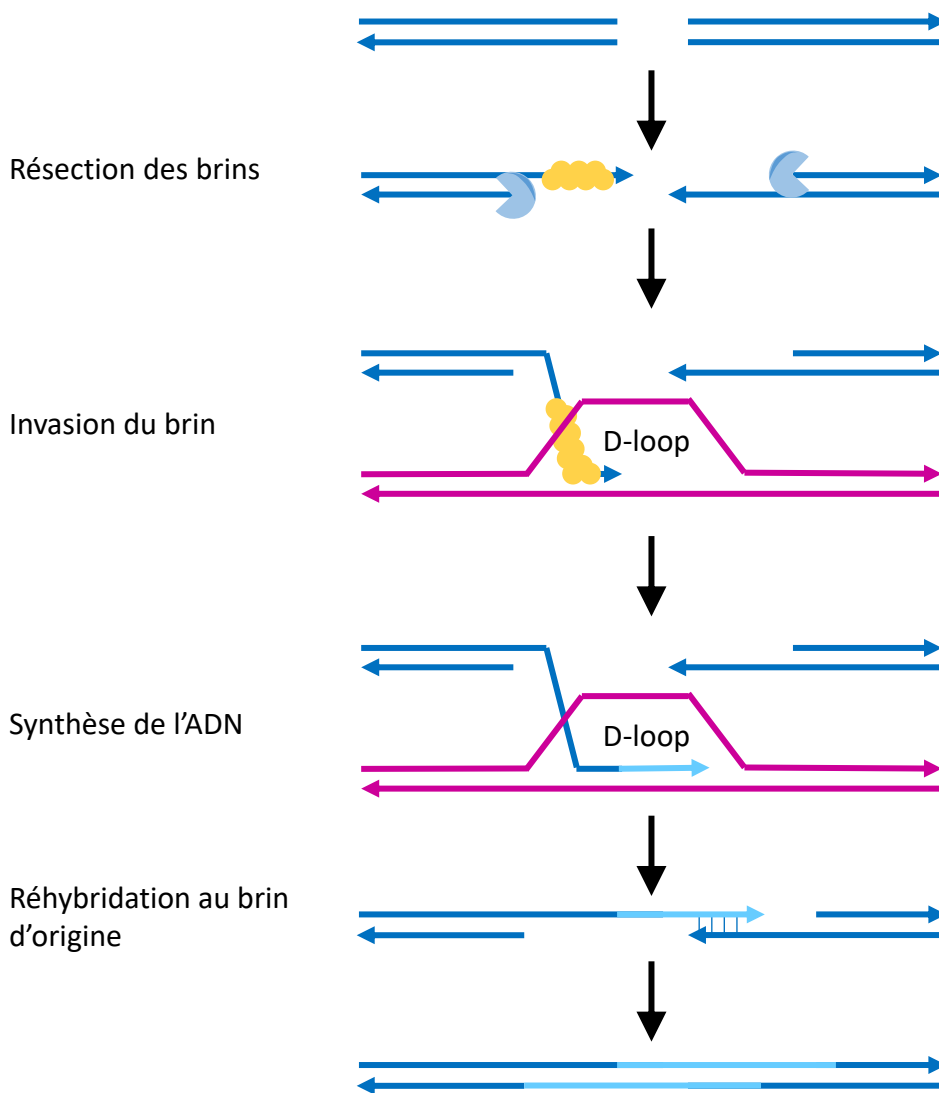


D'après Chevigny et al., 2020

Figure I24. Schéma d'un intermédiaire de recombinaison : le SSA

Lorsque la résection des brins révèle des séquences répétées, elles peuvent s'hybrider afin de reformer un ADN ininterrompu. Cette voie génère des structures flap devant être clivées par une flap-endonucléase. Dans les organelles des plantes ces enzymes n'avaient pas encore été identifiées.

D'après Chevigny et al., 2020



D'après Chevigny et al., 2020

Figure I25. Schéma de la voie du SDSA

Sur le même modèle que le DSBR, après invasion d'une séquence homologue par le nucléofilament, l'ADN polymérase prolonge le brin coupé. Lorsque la D-loop est déstabilisée par l'action de certaines hélicases, le premier brin se prolonge jusqu'à pouvoir à nouveau s'hybrider avec le second. Les gaps formés sont remplis par l'ADN polymérase. Cette voie permet de réparer l'ADN le plus fidèlement possible.

D'après Chevigny et al., 2020

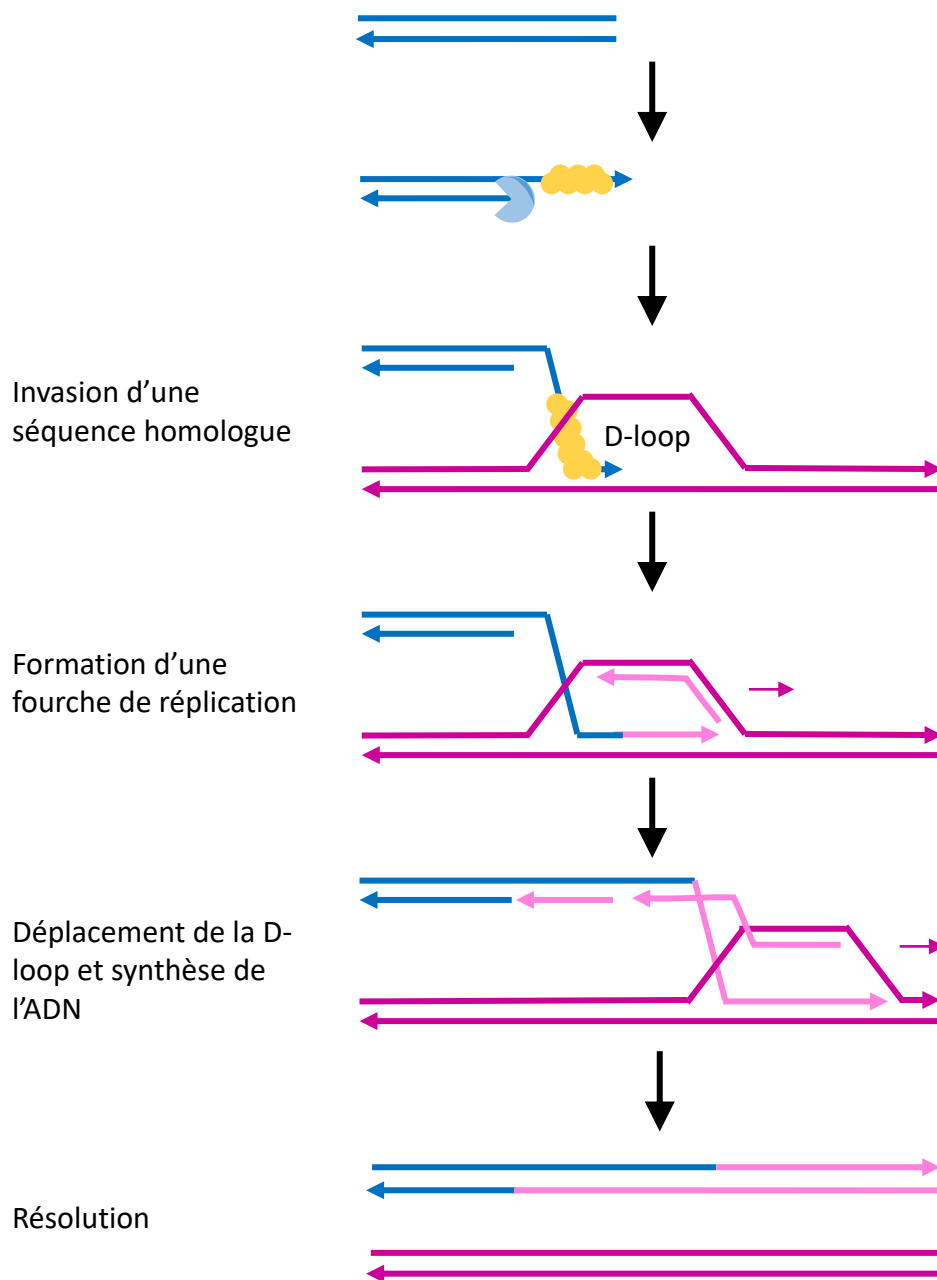
alors créées puis clivées. Les brins sont raccordés grâce à l'action d'une ligase. Chez les plantes, les mitochondries et les chloroplastes possèdent chacun un homologue fonctionnel de la Rad52 de levure, qui sont nommées ODB1 et ODB2 respectivement (Gualberto et al., 2015; Samach et al., 2011) (Figure I24). Cette voie de réparation est délétère puisque la séquence se trouvant entre les deux séquences répétées est perdue. Il est possible que cette voie soit impliquée dans les remaniements du ADNmt des plantes. Ainsi, des cassures double brin du ADNmt d'*Arabidopsis* par des TALEN endonucléases adressées à la mitochondrie (MitoTALEN) ont été réparées par une voie qui a résulté dans la délétion de la séquence comprise entre une paire de séquences répétées, typique de la recombinaison pas SSA (Arimura et al., 2020).

IV.3.b.ii La voie du SDSA

La voie du SDSA, ou "Synthesis Dependant Strand Annealing", est un embranchement de la recombinaison homologue qui a été décrit pour la première fois en 1994 (Nassif et al., 1994). Une étude a montré l'apparition de produits de réparation n'impliquant pas de crossovers, avant l'apparition de produits de crossover, suggérant l'action d'une voie plus rapide (Allers and Lichten, 2001). Dans la voie du SDSA, seul un des deux brins est impliqué, contrairement à la voie du DSBR. L'un des brins associé à des protéines RecA/Rad51 envahit une séquence homologue. Des facteurs se mettent alors en place afin d'empêcher l'hybridation du second brin clivé, inhibant ainsi la voie du DSBR. Chez la levure il s'agit de la translocase Srs2 (Dupaigne et al., 2008). Le brin hybridé est prolongé par synthèse par l'ADN polymérase utilisant le brin complémentaire comme matrice, agrandissant ainsi la D-loop. Le brin invasif est alors dissocié et peut s'hybrider à son brin complémentaire originel. Les lacunes sont comblées à l'aide de l'ADN polymérase et les jonctions soudées par l'ADN ligase (Figure I25). Cette voie est très conservative car elle n'implique aucun crossing-over ni perte de séquence.

IV.3.b.iii Les voies du BIR et du MMBIR

La voie du "Break-Induced Replication" (BIR) est présente chez les bactéries et les eucaryotes (Anand et al., 2013; Kuzminov and Stahl, 1999). Elle intervient majoritairement après l'effondrement d'une fourche de réplication, ou lorsque seul un des deux "côtés" de la cassure trouve une homologie dans le génome. Comme pour le DSBR, après résection des brins, l'extrémité 3' sortante est impliquée dans l'invasion d'une séquence homologue, formant une D-loop. Cette dernière est déplacée par élongation le long du génome, laissant derrière elle une



D'après Hastings et al., 2009

Figure I26. Schéma de la voie du BIR

Après l'invasion de la séquence homologue par l'ADNsb, l'élongation du brin va se poursuivre jusqu'à l'extrémité du chromosome. Comme l'ADN polymérase responsable de l'élongation est spécialisée dans la réparation, elle est moins fidèle que l'ADN polymérase répliquative. L'ADN répliqué par la voie du BIR présentera donc un plus haut taux de mutations. *Adapté de Hastings et al., 2009*

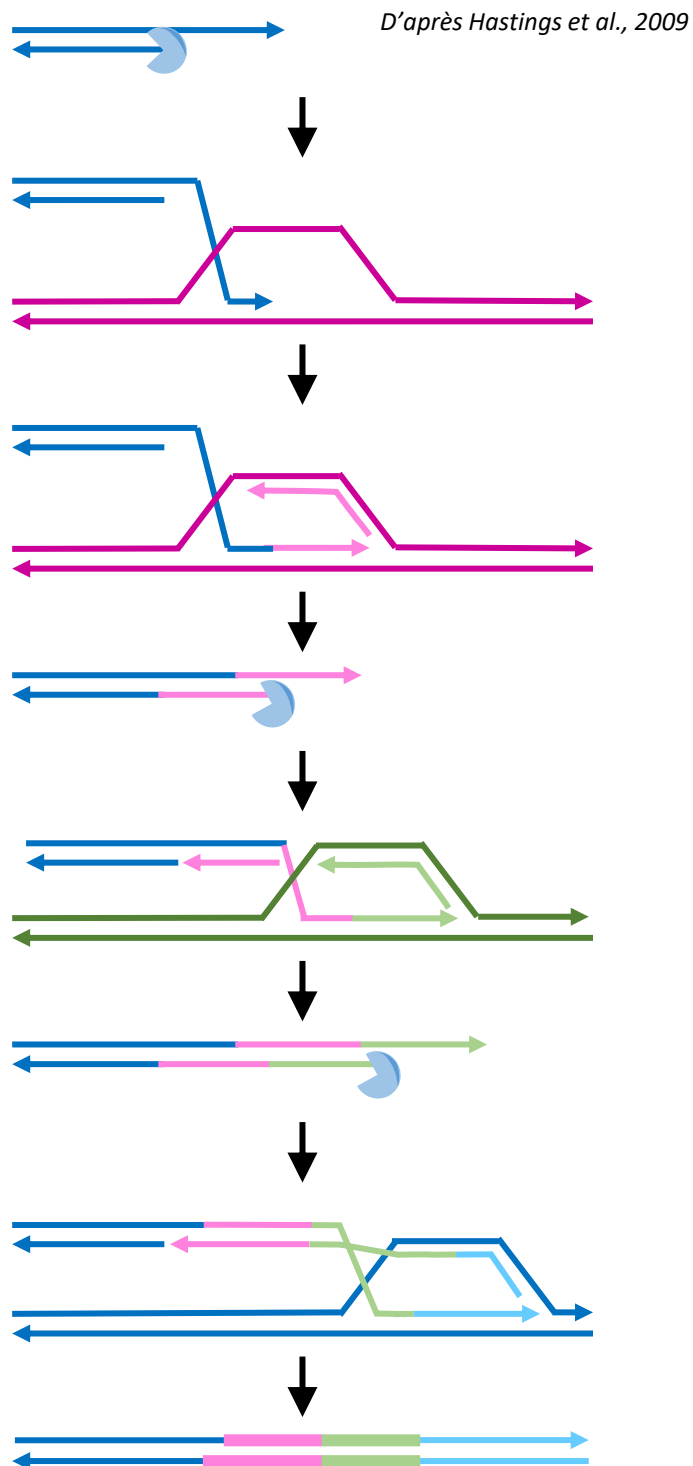


Figure I27. Schéma de la voie du MMBIR

La figure représente le passage d'une séquence ADN à une autre à travers l'hybridation à des microhomologies durant la voie du MMBIR. Après résection, l'ADN simple brin envahit une séquence homologue et reforme une fourche de réplication, puis se dissocie. Une nouvelle résection des brins a lieu ainsi qu'une nouvelle invasion d'une séquence possédant une microhomologie. Ce cycle se poursuit jusqu'à l'invasion d'une séquence homologue à celle originelle permettant cette fois à la fourche de réplication d'avancer jusqu'à l'extrémité du chromosome. Cette voie a pour conséquence des réarrangements génomiques

section simple brin qui sert de matrice pour de la réplication du brin retard. Le déplacement de cette bulle de réplication se poursuit éventuellement jusqu'à la fin du chromosome (Figure I26) (Anand et al., 2013; Kockler et al., 2021). Cette voie permet de relancer la réplication au niveau d'une fourche de réplication dissociée. Cependant il a été montré que la reprise de la réplication par la voie du BIR est peu fidèle, impliquant notamment un haut taux de mutations ponctuelles et des décalages du cadre de lecture (Christensen, 2013). Cette particularité provoque d'un côté des dommages pouvant mener à des cancers chez l'homme, mais est également un facteur d'évolution des génomes notamment chez les mitochondries de plantes où il participe aux réarrangements et à l'expansion des régions non codantes (Anand et al., 2013; Christensen, 2018; Deem et al., 2011; Janicka et al., 2012; Kramara J et al., 2018).

Une variante du BIR appelée MM-BIR (Microhomology-Mediated Break Induced Replication") peut se mettre en place à partir d'une homologie de séquences de 3 à 20 nucléotides (Figure I27). Elle permet, au prix de réarrangements du génome, de continuer la réplication (Kockler et al., 2021).

Objectifs de la thèse

A travers cette introduction, j'ai essayé d'exposer l'importance des organelles pour la cellule ainsi que pour l'organisme et de ce fait, d'attester du rôle crucial des mécanismes de surveillance et de maintenance de leurs génomes.

L'équipe qui m'a accueillie durant ces années de thèse est spécialisée dans l'étude de ces mécanismes dans les organelles de plantes, et plus particulièrement chez *Arabidopsis thaliana*. Leur but est d'élucider les voies de réparation et de maintenance par l'identification et la caractérisation des facteurs clés qui y sont impliqués. Récemment, les membres de l'équipe ont caractérisé l'hélicase RECG1 ainsi que RADA, des facteurs impliqués dans la recombinaison homologue (Chevigny et al., 2019; Wallet et al., 2015).

Grâce aux études combinées de différentes équipes, une grande partie des facteurs impliqués dans la recombinaison homologue et le BER, les deux mécanismes principaux de réparation des génomes organellaires, sont connus. Les travaux de l'équipe de Luis G. Brieba sur les ADN polymérases organellaires ont permis de confirmer leurs rôles dans la réplication et la réparation de l'ADN. Cependant certains facteurs clés restent à identifier. C'est le cas d'une protéine capable d'une activité 5'-3' exonucléase et flap-endonucléase. Ces activités sont cruciales pour les mécanismes suivants :

Dans la recombinaison homologue, pour la résection des brins et la résolution d'intermédiaires de recombinaison.

Dans la réparation par excision de base, pour dégrader le brin déplacé.

Pour l'élimination des amorces ARN composant les fragments d'Okazaki.

Enfin une nucléase capable d'activité RNase sur les hybrides ARN:ADN est nécessaire pour l'élimination des R-loop pouvant apporter de l'instabilité génomique.

Chez les bactéries, l'activité nécessaire aux trois premiers points peut être supportée par l'ADN polymérase I composée de trois domaines : le domaine polymérase permettant l'élongation des brins, le domaine 3'-5' exonucléase responsable de l'activité de relecture et enfin le domaine 5'-3' exonucléase chargé des activités de maintenance citées précédemment. Les deux ADN polymérases organellaires de plantes POL1A et POL1B dérivent de l'ADN pol I bactérienne, mais agissent comme l'ADN polymérase phagique gp5 lors de la réplication. Elles

sont composées des domaines polymérase et 3'-5' exonucléase mais, bien qu'elles aient un rôle dans la réparation, elles sont dépourvues du domaine 5'-3' exonucléase.

Antérieurement à mon arrivée, l'équipe a identifié deux protéines prédites comme adressées aux organelles et possédant ce domaine 5'-3' exonucléase. L'objectif de ma thèse pouvait alors se distinguer en plusieurs points.

Concernant OEX1, il s'agissait dans un premier temps de caractériser le phénotype des plantes mutées sur *OEX1*. Puis, afin d'étudier son rôle, tester ses possibles activités sur différents substrats et structures à travers des tests enzymatiques. Enfin, à partir des données acquise et des hypothèses formulées, prouver *in vivo* son implication dans les différents mécanismes. Concernant OEX2, aucun mutant n'étant disponible, il nous fallait dans un premier temps générer des mutants à l'aide de la technologie CRISPR/Cas9, puis caractériser les phénotypes de ces derniers. Dans un second temps il était prévu de purifier également la protéine pour des tests enzymatiques.

Avant-propos

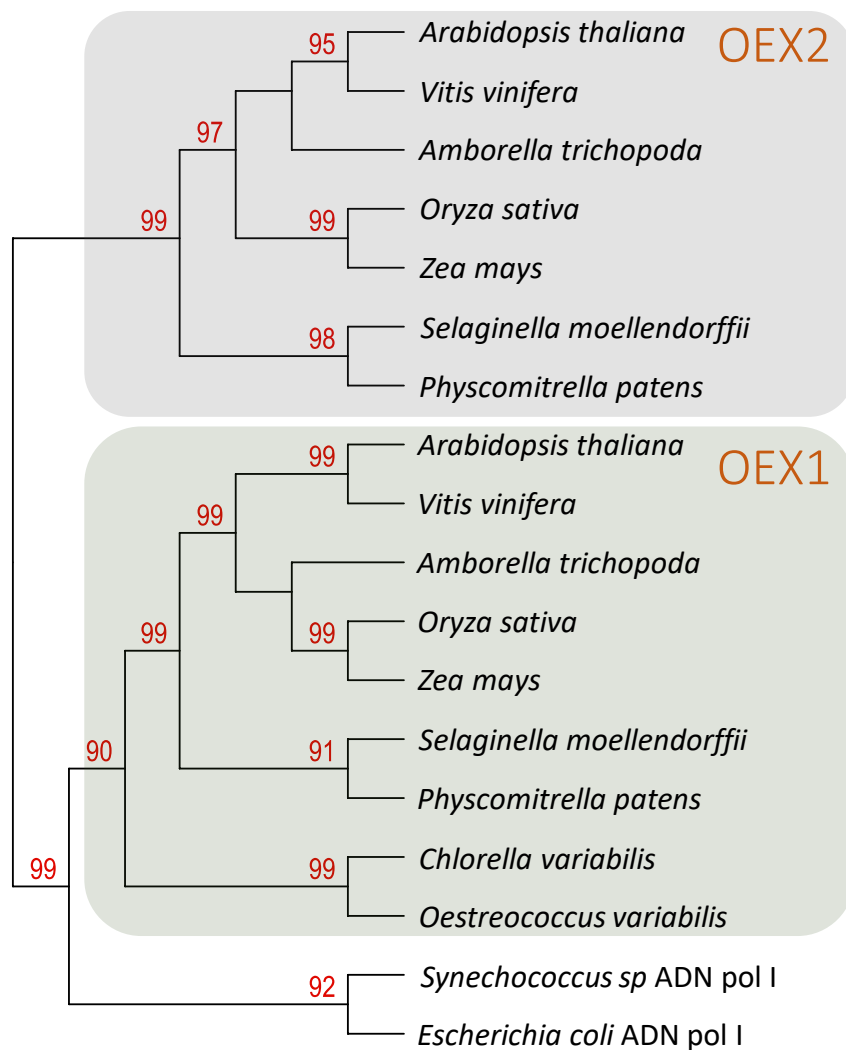


Figure R1. Arbres phylogénétiques de OEX1 et OEX2.

Comparaison des séquences de OEX1 et OEX2 de différentes espèces représentatives des grandes lignées de l'évolution végétale entre elles ainsi qu'avec la sous unité 5'-3' exonucléase de deux ADN polymérases I bactériennes. OEX1 semble conservé dans toutes les plantes terrestres et algues vertes, alors que son paralogue OEX2 est présent dans les plantes terrestres, mais pas chez les algues. Les valeurs de bootstrap indiquées en rouge permettent de juger de la robustesse de chaque branche de l'arbre. Elles sont comprises entre 0 et 100 %.

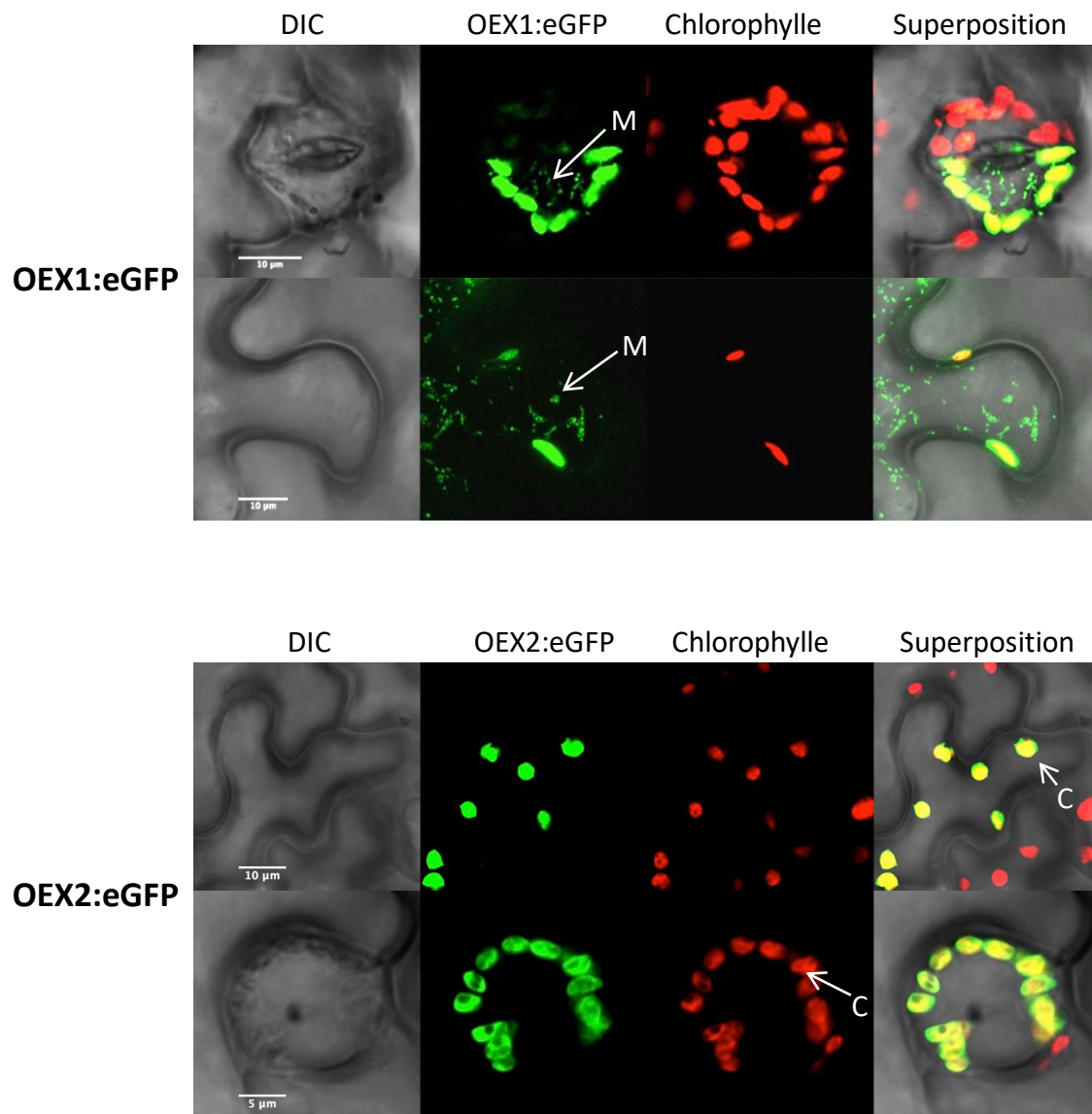


Figure R2. Localisation sub-cellulaire des protéines OEX1 et OEX2.

Les constructions permettent l'expression des protéines OEX1 et OEX2 fusionnées en N-terminal à la protéine fluorescente eGFP (en vert). L'expression transitoire a été visualisée dans des cellules de *Nicotiana benthamiana* transfectées par biolistique. La fluorescence rouge correspond à la fluorescence naturelle de la chlorophylle. DIC : contraste interférentiel différentiel. M : mitochondrie. C : chloroplaste.

I. Contexte de l'étude

Comme tous les génomes, ceux présents dans les organelles de plantes nécessitent un système complet de maintenance et de réparation. Dans les mitochondries d'*Arabidopsis*, un certain nombre de facteurs impliqués dans ce système ont été étudiés mais aucune protéine possédant une activité 5'-3' exonucléase n'avait été identifiée. Chez *E. coli*, dont les mitochondries sont évolutivement proches, celle-ci est portée par le domaine 5'-3' exonucléase de l'ADN polymérase I. Or chez les plantes, les ADN polymérases adressées aux organelles, nommées POL1A et POL1B, ne possèdent pas ce domaine. Des analyses *in silico* effectuées avant mon arrivée ont permis d'identifier, chez *Arabidopsis*, deux protéines possédant un domaine 5'-3' exonucléase similaire à celui de l'ADN polymérase I d'*E. coli* et prédites comme adressées aux organelles. Elles ont été nommées OEX1 et OEX2 pour Organellar EXonuclease 1 & 2. Une analyse phylogénétique montre que OEX1 est conservée chez toutes les plantes terrestres ainsi que chez les algues, alors qu'OEX2 est conservée chez toutes les plantes terrestres mais pas chez les algues (Figure R1). Les alignements avec les domaines 5'-3' exonucléase des protobactéries et cyanobactéries ne permettent pas de déterminer si OEX1 & OEX2 dérivent des ancêtres des mitochondries ou des chloroplastes. Des analyses de localisation subcellulaire de ces protéines ont été effectuées avant mon arrivée dans l'équipe par Rana Khalid Iqbal. La transfection de constructions permettant l'expression de chacune de ces deux protéines fusionnées à la eGFP, dans des cellules épidermales de feuilles de *Nicotiana benthamiana*, indique une double localisation mitochondriale et chloroplastique pour OEX1 et une localisation strictement chloroplastique pour OEX2 (Khalid IQBAL et al., 2017) (Figure R2).

II. Structure des protéines OEX1 et OEX2

A la suite d'un clonage réalisé avant mon arrivée au laboratoire et visant à cloner l'ADNc d'OEX1, deux types de clones différents ont été identifiés. Le séquençage a permis de déterminer que l'un d'eux résulte d'un épissage alternatif du 6^{ème} exon de *OEX1*, codant pour 18 acides aminés. Il a été retrouvé dans 6 clones sur 11, et des séquences correspondantes sont retrouvées dans les séquences d'ADNc publiques (www.arabidopsis.org). La version

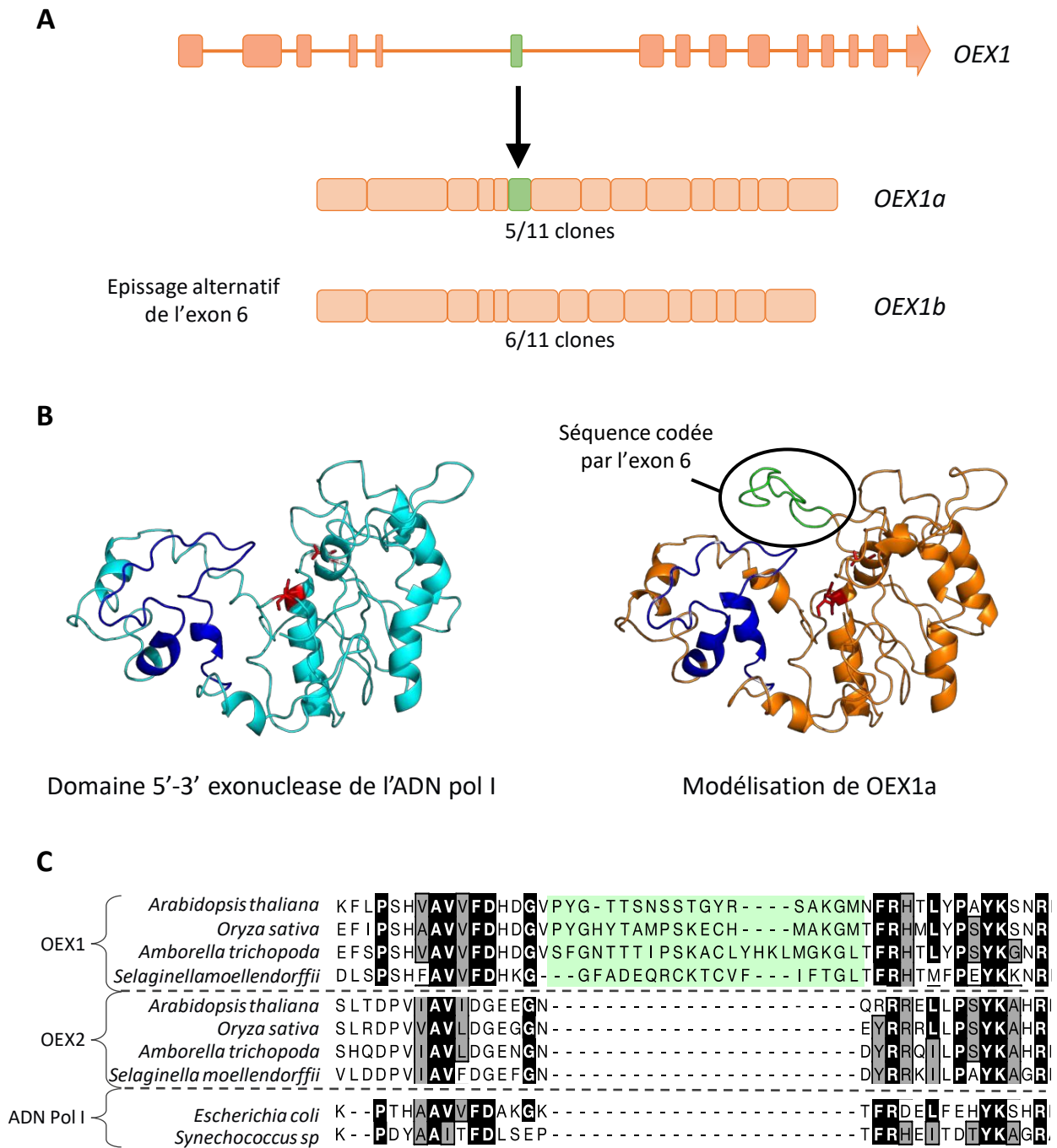


Figure R3. Un épissage alternatif du transcrit permet de produire deux isoformes d'OEX1.

(A) Schéma représentant le gène *OEX1* ainsi que les deux ARN produits par épissage alternatif. (B) Modélisation de la protéine OEX1a basée sur la structure publiée du domaine 5'-3' exonucléase de l'ADN polymérase I de *Thermophilus aquaticus*. Le site actif est représenté en rouge et la séquence absente dans OEX1b est représentée en vert. Le domaine de liaison à l'ADN hélice-coude-hélice est représenté en bleu foncé. (C) Alignement de séquences protéiques de OEX1 et OEX2 de plusieurs plantes représentatives, ainsi que des ADN polymérase I d'*E. coli* et de la cyanobactérie *Synechococcus sp*. L'alignement se concentre autour des acides aminés absents de OEX1b par épissage alternatif (partie surlignée en vert).

comprenant le 6^{ème} exon a été nommée *OEX1a* et la version épissée a été nommée *OEX1b* (Figure R3A). Au niveau de la protéine, cet épissage a pour conséquence une délétion de 18 acides aminés au sein du domaine PIN responsable de l'activité nucléase. La modélisation de structure de OEX1, basée sur la structure de l'ADN polymérase I bactérienne, montre que la séquence délétée chez OEX1b pourrait former une boucle proche du site actif (Figure R3B). Pour le moment la fonction de cette boucle n'est pas connue, mais on peut supposer qu'elle peut jouer un rôle dans l'interaction entre OEX1 et son substrat ou un cofacteur. Un alignement des séquences protéiques d'OEX1 et d'OEX2 de plusieurs espèces et des ADN polymérase I bactériennes montre que cette insertion est conservée chez toutes les protéines OEX1 de plantes terrestres, mais que leur séquence est très variable. Cependant, cette insertion est absente chez OEX2 et chez les ADN polymérase I bactérienne (Figure R3C). Pendant mes travaux de thèse, des expériences génétiques et biochimiques ont été menées pour tenter de comprendre l'intérêt de cet épissage alternatif.

Chapitre 1 : Etude de OEX1

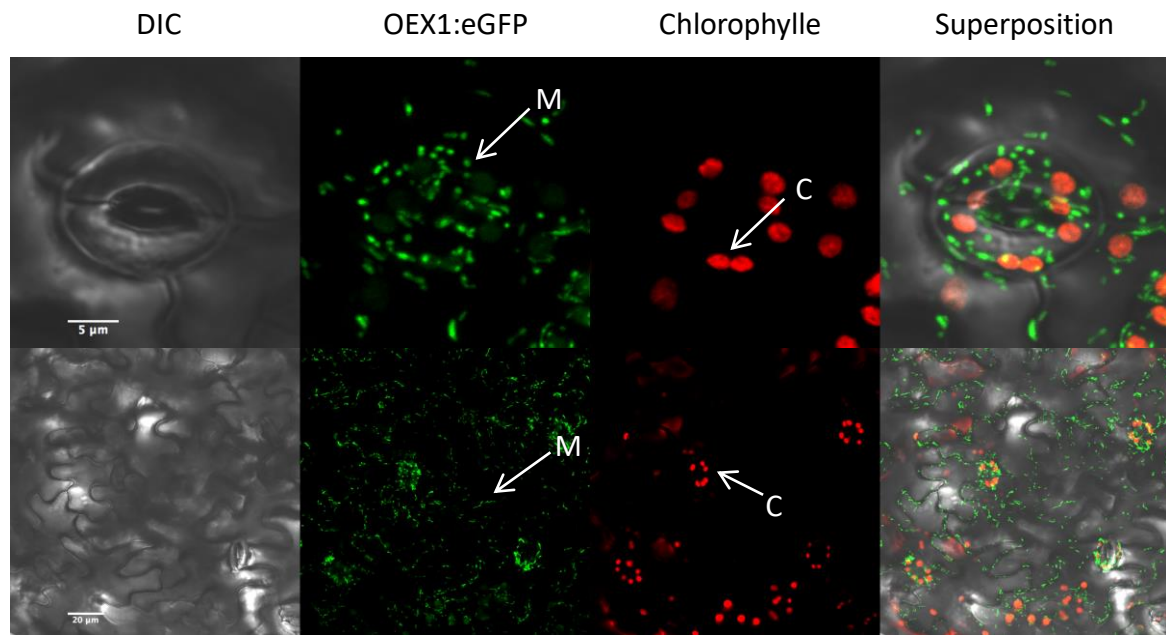


Figure R4. Localisation sub-cellulaire de OEX1 dans *Arabidopsis thaliana*.

La construction permettant l'expression de la protéine OEX1 fusionnée en C-terminal à la protéine fluorescente eGFP (en vert) a été insérée dans le génome de plants d'*Arabidopsis* par floral-dip en permettant une expression stable. La fluorescence a été visualisée dans des cellules de feuille d'*Arabidopsis*. La fluorescence rouge correspond à la fluorescence naturelle de la chlorophylle. DIC : contraste interférentiel différentiel. M : mitochondrie ; C : chloroplaste.

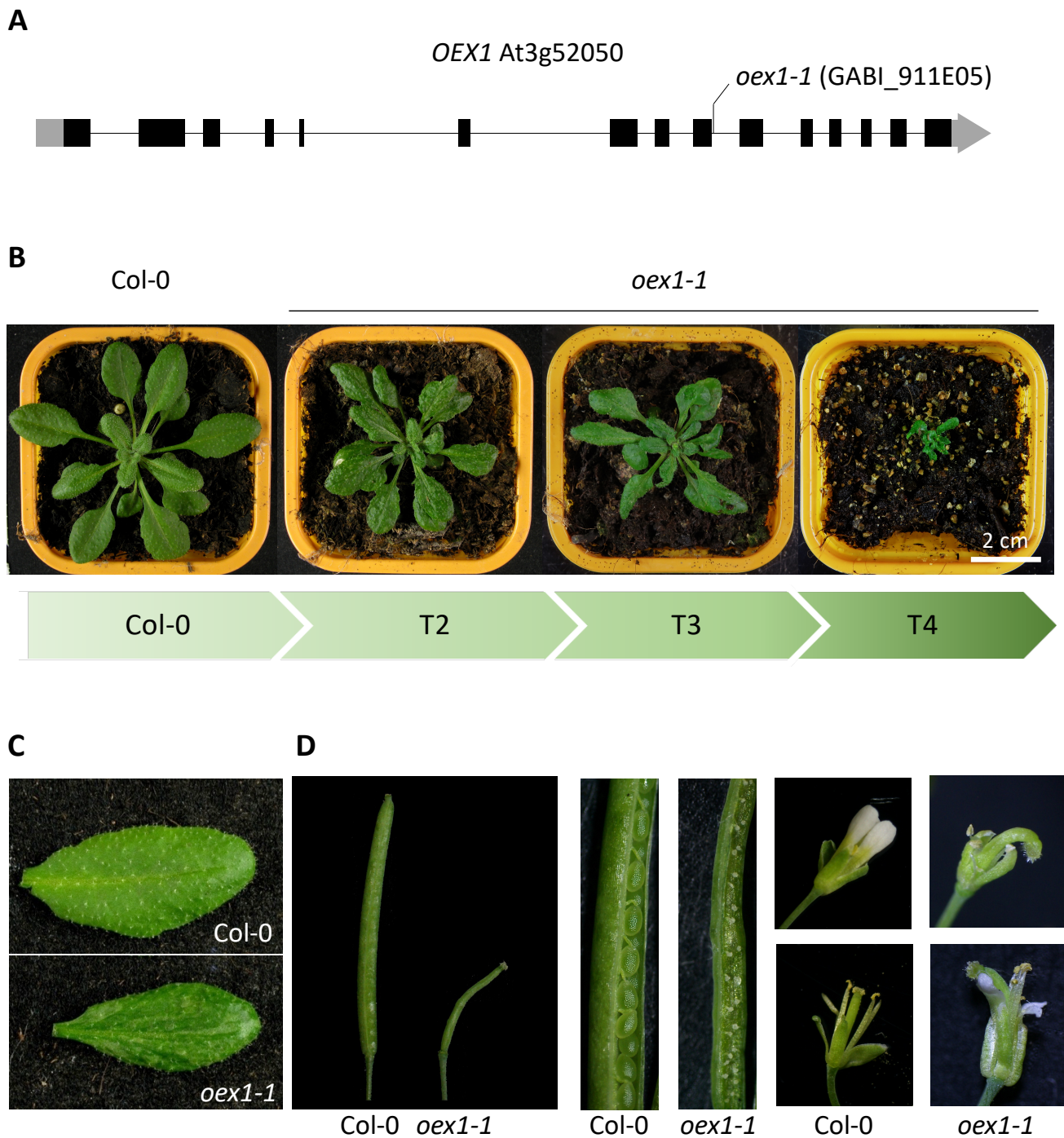


Figure R5. Caractérisation des phénotypes liés à la mutation du gène *OEX1*.

(A) Représentation du gène *OEX1*, les exons sont représentés par des carrés noirs, les régions 5' et 3' UTR sont en gris. La position de l'insertion du T-DNA est indiquée. (B) Photos de plantes sauvages (Col-0) et de plantes *oex1-1* homozygotes de première génération (T2) et de générations suivantes (T3 et T4). (C) Photos de feuilles de plantes Col-0 et *oex1-1*. (D) Photos de siliques et organes reproducteurs de plantes Col-0 et *oex1-1*.

I. Caractérisation du gène *OEX1* et de sa protéine

I.1 Localisation subcellulaire de la protéine *OEX1* par transformation stable

Les travaux de localisation présentés précédemment ont été effectués par transfection biolistique et expression transitoire dans des cellules foliaires de *Nicotiana benthamiana*. Le schéma de fluorescence, similaire à celui d'autres protéines connues pour être adressées à la mitochondrie, laissent supposer une localisation mitochondriale de *OEX1* (Khalid IQBAL et al., 2017). Pour valider et solidifier ces résultats, nous avons décidé d'étudier la localisation dans des lignées stables d'*Arabidopsis thaliana*. Nous avons donc transformé des plantes d'*Arabidopsis* à l'aide d'agrobactéries par la technique du "floral-dip" décrite dans le chapitre Méthodes, section III.3. Pour cela, le gène *OEX1* a été cloné dans les vecteurs pGWB604 et pUB-C:GFP permettant de le fusionner au gène codant pour la protéine fluorescente améliorée eGFP (Dai et al., 2007). En utilisant le vecteur pGWB604, l'expression du gène chimérique est sous le contrôle du promoteur de *OEX1* (*proOEX1*) et en utilisant le vecteur pUB-C:GFP, elle est sous le contrôle du promoteur de l'ubiquitine (*ProUBQ10*), un promoteur constitutif (Grefen et al., 2010). Les résultats d'observation au microscope confocal confirment la localisation mitochondriale de *OEX1* mais infirment les résultats obtenus précédemment quant à la localisation chloroplastique de celle-ci (Figure R4). Ces résultats ont été obtenus en fin de thèse, ainsi certaines études décrites ci-après ont été réalisées dans le contexte où *OEX1* était également adressée au chloroplaste. Il s'agit notamment du double-mutant *oex1 oex2* et de l'étude de l'effet de la mutation du gène *OEX1* sur le génome chloroplastique, par hémi-complémentation du mutant *oex1*.

I.2 Caractérisation du mutant d'insertion T-DNA

I.2.a Description du phénotype macromoléculaire

La caractérisation du mutant a été réalisée avant mon arrivée dans l'équipe. L'étude s'est basée sur l'unique mutant d'insertion T-DNA disponible, *oex1-1* (GABI_911E05) qui comporte l'insertion d'un T-DNA au début du 9^{ème} intron du gène *OEX1* (Figure R5A). Les plantes *oex1-1* présentent un fort retard de croissance, un phénotype qui s'aggrave d'une génération à la suivante (Figure R5B). Leurs feuilles sont déformées, de couleur verte plus foncée que chez

les plantes sauvages et sont panachées, parcourues de stries blanchâtres. Elles sont plus épaisses et moins souples que les feuilles des plantes sauvages (Figure R5C). Les plantes mutantes sont presque stériles, mais il est possible d'obtenir des graines et de passer 2 fois à la génération suivante. Dès la première génération de mutants homozygotes on observe des siliques plus petites dont la majorité des ovules sont avortés, les fleurs présentent des organes déformés avec un pistil allongé et un stigmate peu ou pas collant, avec absence apparente de pollen attaché (Figure R5D). L'observation des étamines à la loupe binoculaire montre une très faible présence de pollen sur les anthères. Les plantes sont totalement stériles à partir de la troisième génération homozygote (génération T4). Le fort phénotype des mutants, à savoir une fertilité très réduite ainsi que des plantes fortement affectées dans leur croissance et déformées, nous indique que OEX1 pourrait jouer un rôle essentiel dans les organelles. En effet, des phénotypes similaires ont déjà été observés par notre équipe dans des mutants de facteurs impliqués dans la réparation par recombinaison homologue, notamment les mutants déficients dans les protéines "ssDNA-binding" OSB1 et OSB4, la RecA-like recombinase RECA3 et l'hélicase RADA (Chevigny, 2019; Miller-Messmer et al., 2012; Wallet et al., 2015; Zaegel et al., 2006). Des phénotypes similaires ont été aussi décrits pour les mutants de la protéine MutS-like MSH1 (Abdelnoor et al., 2003; Xu et al., 2011). Cependant ces phénotypes ont une faible pénétrance dans la première génération homozygote de ces mutants, à l'exception des mutants *radA*, alors que leur pénétrance est de 100 % dans les plantes *oex1-1*.

1.2.b Observation de la structure cellulaire au microscope électronique à transmission

Les plantes *oex1-1* présentant un phénotype très affecté à l'échelle de la plante, nous avons réalisé des observations au niveau cellulaire. Pour cela, des sections de feuilles de rosette provenant de plants sauvages Col-0 et de mutants *oex1-1* ont été examinées au microscope électronique à transmission (TEM). L'acquisition des images a été réalisée par Mathieu ERHARDT de la plate-forme "Microscopie et Imagerie Cellulaire" de l'IBMP. Ce microscope nous permet de visualiser la taille, la forme et la structure des différents compartiments cellulaires.

Dans les cellules de plantes sauvages et mutantes, les chloroplastes sont de tailles identiques. Dans la majorité des cas, nous n'observons pas de différence notable dans leur forme et il est

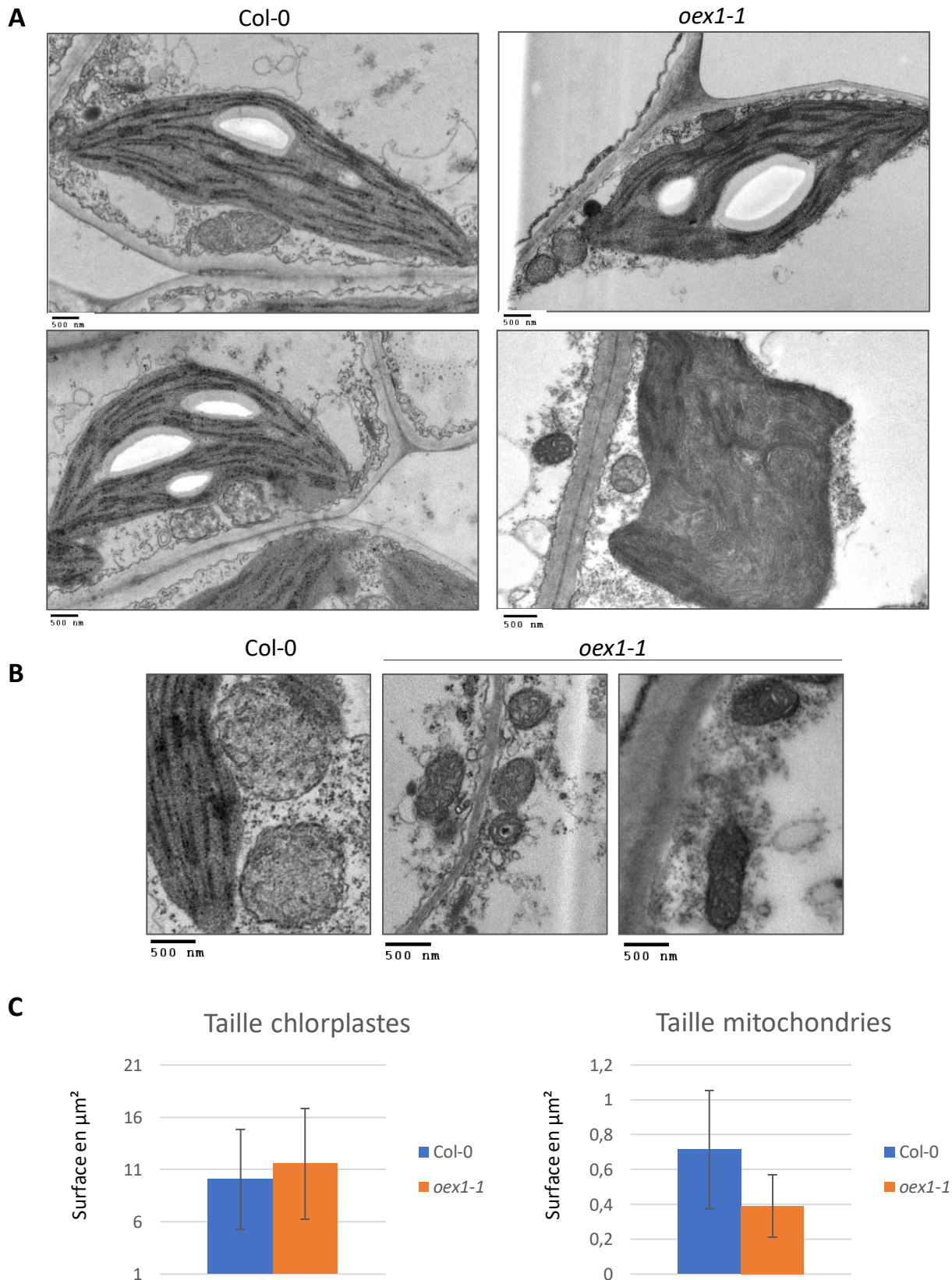


Figure R6. Observations au microscope électronique à transmission.

(A) Observation de chloroplastes de plantes Col-0 et *oex1-1*. (B) Observation de mitochondries de plantes Col-0 et *oex1-1*. (C) Comparaison des surfaces des chloroplastes et des mitochondries de plantes Col-0 et *oex1-1* déterminées avec le logiciel ImageJ. Mesures effectuées sur 20 images de feuilles Col-0 et 40 images de feuilles *oex1-1*.

possible de distinguer les thylakoïdes et le granum. Cependant, sur certaines images, les thylakoïdes des chloroplastes de plantes mutantes semblent désordonnés et en surnombre (Figure R6A). Au niveau des mitochondries, elles semblent plus électrodenses avec des crêtes bien distinctes, mais leur taille est plus petite (Figure R6B). Nous avons mesuré la surface moyenne, en μm^2 , de chaque organelle présente sur les acquisitions dans les lignées Col-0 et dans les lignées *oex1-1*. Si pour les chloroplastes on ne remarque pas de différence notable, les mitochondries des mutants semblent 54 % plus petites que celles des sauvages (Figure R6C). Les échantillons étudiés au microscope proviennent de plusieurs plantes différentes afin de ne pas introduire un biais dû à une plante particulière. Les plantes sauvages et mutantes ont été étudiées au même stade de croissance. Une réduction de la taille des mitochondries avait déjà été observée dans d'autres mutants déficients dans l'expression de gènes impliqués dans la maintenance de l'ADNmt (Zaegel et al., 2006).

I.3 Etude des effets de la mutation sur le génome organellaire

I.3.a Les mutants *oex1-1* montrent une augmentation du taux de recombinaison

Les nucléases sont des facteurs essentiels dans les mécanismes de réparation de l'ADN, notamment dans la résolution des différents intermédiaires de recombinaison. Plusieurs travaux portant sur les facteurs impliqués dans la recombinaison homologue ou dans sa régulation ont constaté que la mutation d'un de ces facteurs engendrait une augmentation des produits de recombinaison au niveau du mitogénome (Chevigny et al., 2019; Miller-Messmer et al., 2012; Shedge et al., 2007; Wallet et al., 2015; Zaegel et al., 2006). Même si cette augmentation peut paraître paradoxale, elle peut s'expliquer par différents mécanismes (Gualberto and Newton, 2017). En particulier, le besoin des activités de recombinaison pour la réparation au cours de la réplication ("replication-coupled repair") évite des arrêts dans la progression de l'ADN polymérase qui résultent dans des cassures double-brin. La réplication à partir de ces molécules non-finalisées peut être reprise par des mécanismes de recombinaison alternatifs comme le BIR ("Break-Induced Replication"), qui est peu fidèle et qui peut ré-initier la réplication de façon ectopique, au niveau de séquences répétées qui sont très abondantes dans l'ADNmt des plantes supérieures. Ces événements de recombinaison ectopique impliquant des séquences répétées ou microhomologies peuvent être analysés par qPCR. Deux couples d'amorces sont dessinés de sorte à flanquer la séquence répétée d'intérêt.

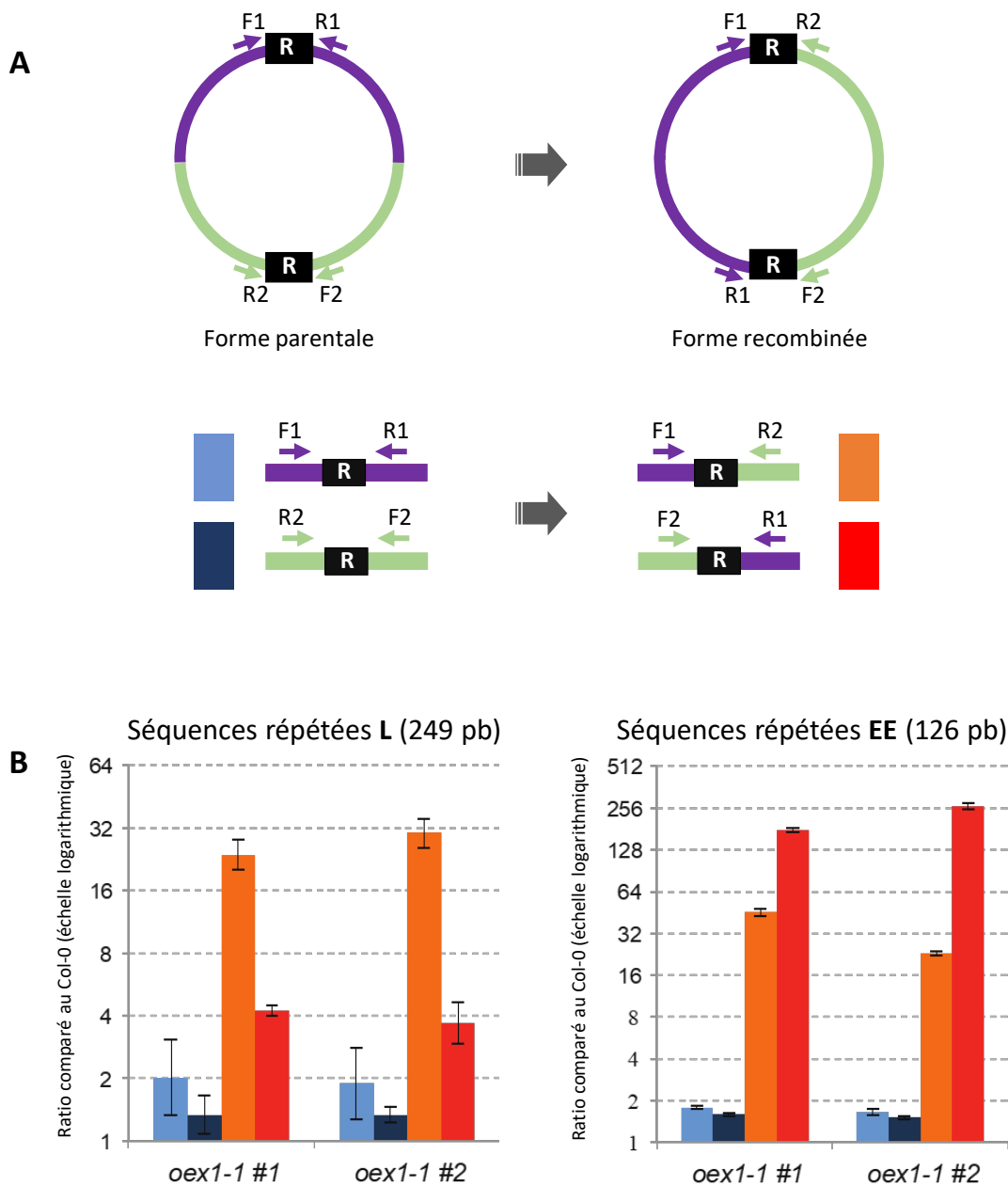


Figure R7. Analyse par qPCR du taux de recombinaison autour de petites séquences répétées.

(A) Schéma représentant la méthode utilisée pour évaluer une augmentation de la recombinaison à travers l'accumulation de formes recombinées. Les amorces situées de part et d'autre des paires de séquences répétées permettent d'amplifier indépendamment les formes parentales ou les produits de recombinaison ("crossover"). (B) Analyse par qPCR de l'accumulation de produits de recombinaison dans les mutants *oex1-1* en comparaison avec le sauvage Col-0. L'expérience a été réalisée sur deux plantes différentes (*oex1-1* #1 et *oex1-1* #2) et l'étude s'est portée sur les paires de petites séquences répétées L et EE. Les données ont été normalisées par rapport aux gènes nucléaires de référence *ACT1* (At2G37620) et *UBQ10* (At4G05320). Les résultats sont représentés sur une échelle logarithmique de base 2.

Comme représenté sur la figure R7A, les couples d'amorces F1+R1 et F2+R2 permettent l'amplification des formes parentales et les couples F1+R2 et F2+R1, permettent l'amplification des produits de cross-over. L'utilisation de la qPCR permet la quantification relative de ces formes par rapport aux formes présentes dans le témoin, ici le mitogénome des plantes sauvages.

Antérieurement à mon arrivée, l'équipe a réalisé cette expérience sur les plantes *oex1-1* en les comparant avec les plantes sauvages Col-0 en utilisant des amorces situées autour des paires de séquences répétées 'L' et 'EE', de 249 pb et 126 pb respectivement. On observe chez le mutant *oex1-1* jusqu'à 32 fois plus de produit de recombinaison que chez le sauvage pour la répétition L. Le test sur la répétition EE montre une augmentation allant jusqu'à 256 fois de la forme recombinée (Figure R7B). Comme décrit précédemment pour d'autres mutants (Arrieta-Montiel et al., 2009; Davila et al., 2011; Miller-Messmer et al., 2012) la recombinaison est non-réciproque avec un des produits de cross-over qui est préférentiellement augmenté. La recombinaison non-réciproque est caractéristique du mécanisme du BIR.

L'absence d'OEX1 provoque donc une augmentation du taux de recombinaison autour de petites séquences répétées pouvant induire une instabilité de l'ADNmt. Ces remaniements du mitogénome pourraient être la raison des phénotypes sévères du mutant.

1.3.b L'absence d'OEX1 a un effet sur la stabilité du génome

Lorsqu'un facteur impliqué dans les mécanismes de recombinaison est muté, le taux de recombinaison ectopique impliquant des séquences répétées et des microhomologies augmente, avec comme conséquence une réorganisation du génome et l'accumulation de ces formes alternatives qui coexistent avec l'ADNmt sauvage (hétéroplasmie). Afin de visualiser les effets de l'absence de OEX1 sur l'ensemble du mitogénome, l'équipe a réalisé une analyse par qPCR permettant de quantifier de façon relative le nombre de copies de différentes régions du génome par comparaison au témoin sauvage. Pour cela une série de couples d'amorces a été dessinée de sorte à quantifier une séquence tous les 5 kb environ, le long du mitogénome (Annexe 1).

Une première expérience a été réalisée en testant le mitogénome d'une plante sauvage Col-0 contre celui d'une autre plante Col-0. Les données ont été normalisées avec les gènes de

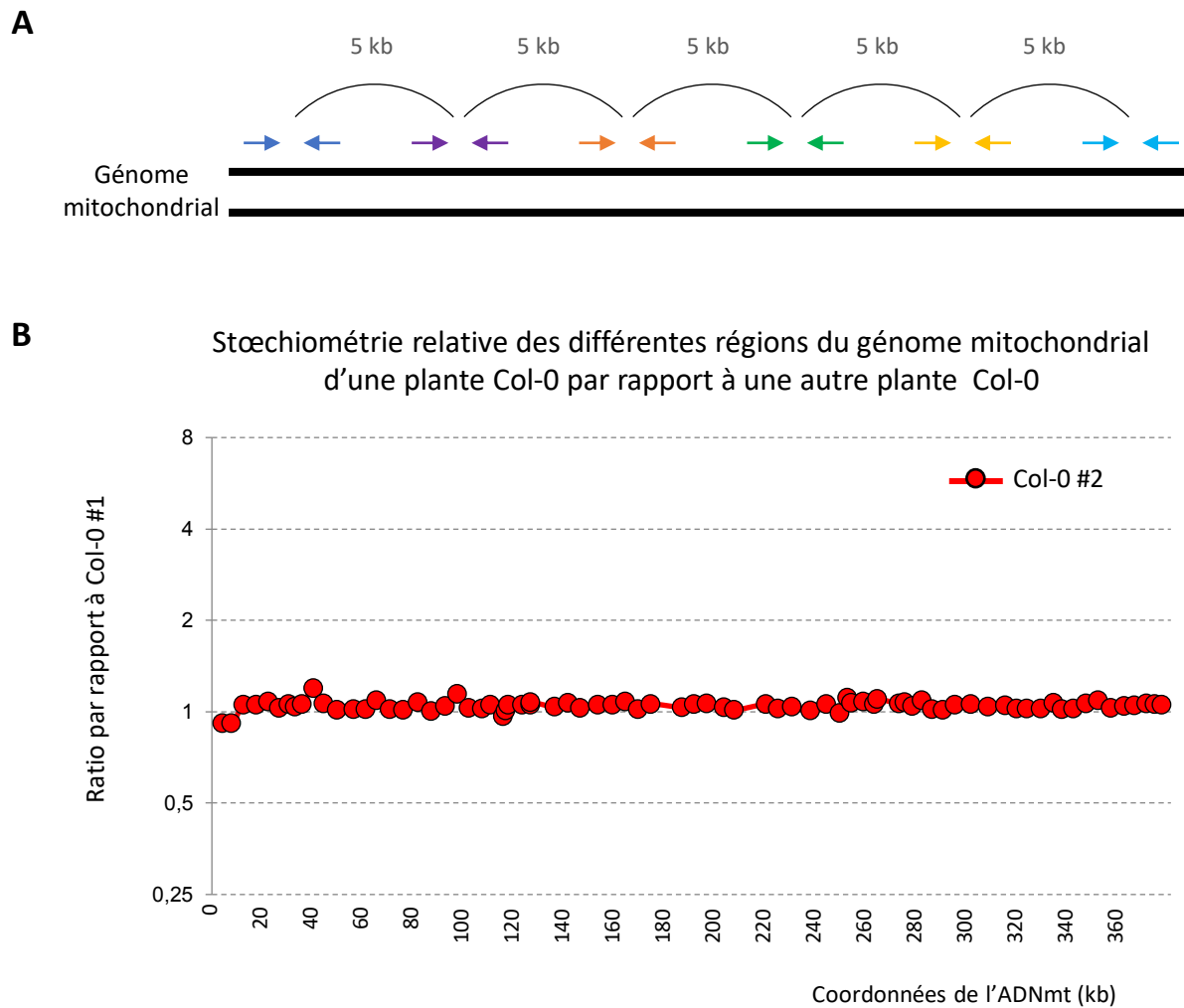


Figure R8. Analyse par qPCR de la stœchiométrie des différentes régions du génome mitochondrial d'*Arabidopsis thaliana*.

(A) Schéma représentant la disposition des amorces le long du génome mitochondrial. Les flèches de même couleur représentent les paires d'amorces utilisées permettant une amplification tous les 5 kb environ. (B) Analyse par qPCR de la stœchiométrie relative des différentes régions du génome mitochondrial d'une plante sauvage Col-0 comparée à une autre plante Col-0. Les données ont été normalisées par rapport aux gènes nucléaires de référence *ACT1* (At2G37620) et *UBQ10* (At4G05320). Les résultats sont représentés sur une échelle logarithmique de base 2.

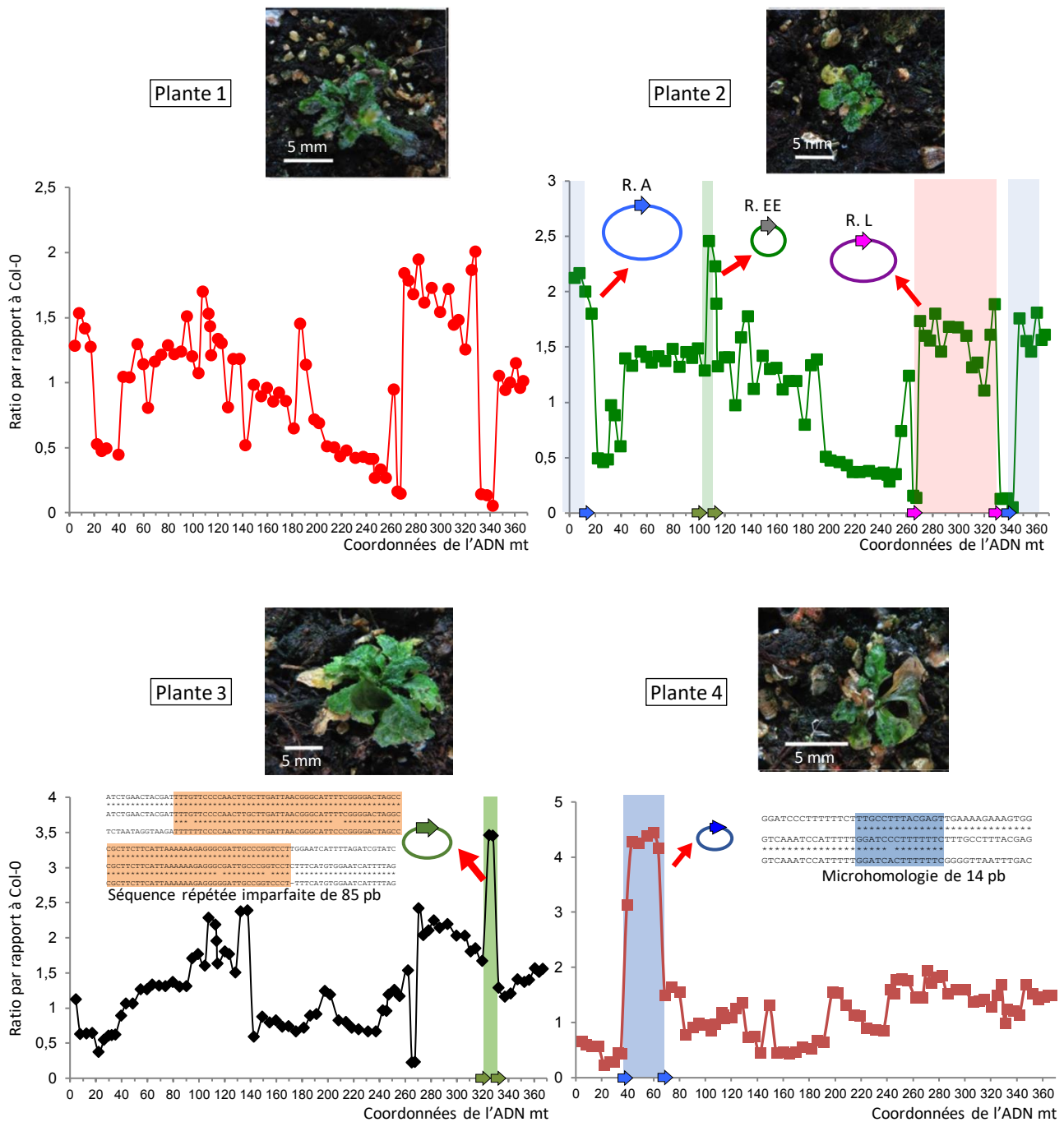
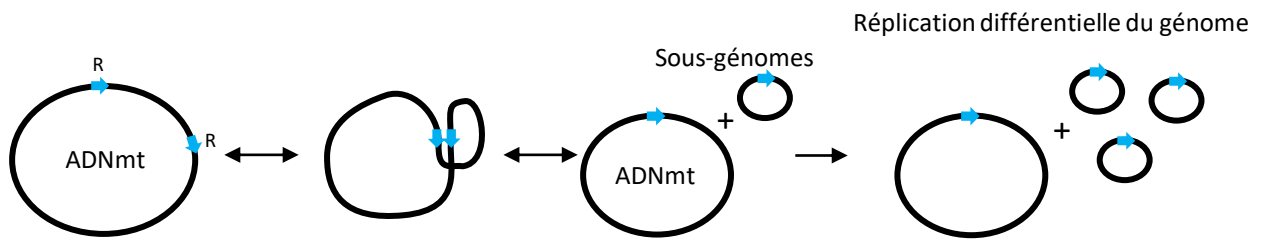


Figure R9. Analyse par qPCR de la stœchiométrie du génome mitochondrial dans différentes plantes mutantes *oex1-1*.

Analyse par qPCR le long du génome mitochondrial de quatre plantes individuelles *oex1-1* de troisième génération en comparaison avec une plante Col-0. Les données ont été normalisées par rapport aux gènes de référence *ACT1* (At2G37620) et *UBQ10* (At4G05320). Les paires de séquences répétées (R), les séquences répétées imparfaites et les microhomologies entrainant la formation de sous-génomes sont indiquées par des flèches sur l'abscisse. Les plantes desquelles ont été extraits ces ADN sont montrées au dessus de chaque graphique.

A

Adapté de : Gualberto & Newton, 2017

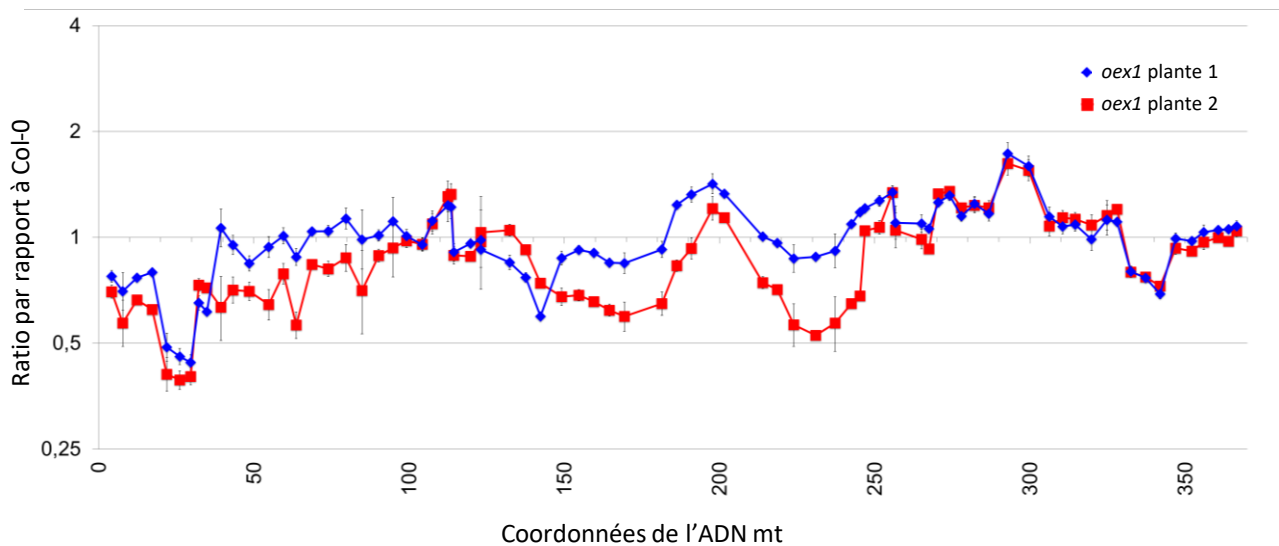
B

Figure R10. Analyse par qPCR de la stœchiométrie du génome mitochondrial dans différentes plantes mutantes *oex1-1*.

(A) Schéma de la formation de sous-génomes à la suite d'une recombinaison entre une paire de séquences répétées. Si le sous-génome est capable de se répliquer de manière autonome son nombre de copies peut augmenter par rapport à l'ADNmt principal. (B) Analyse par qPCR le long du génome mitochondrial de deux plantes individuelles *oex1-1* de première génération en comparaison avec une plante Col-0. Les données ont été normalisées par rapport aux gènes de référence *ACT1* (At2G37620) et *UBQ10* (At4G05320). Les résultats sont représentés sur une échelle logarithmique de base 2.

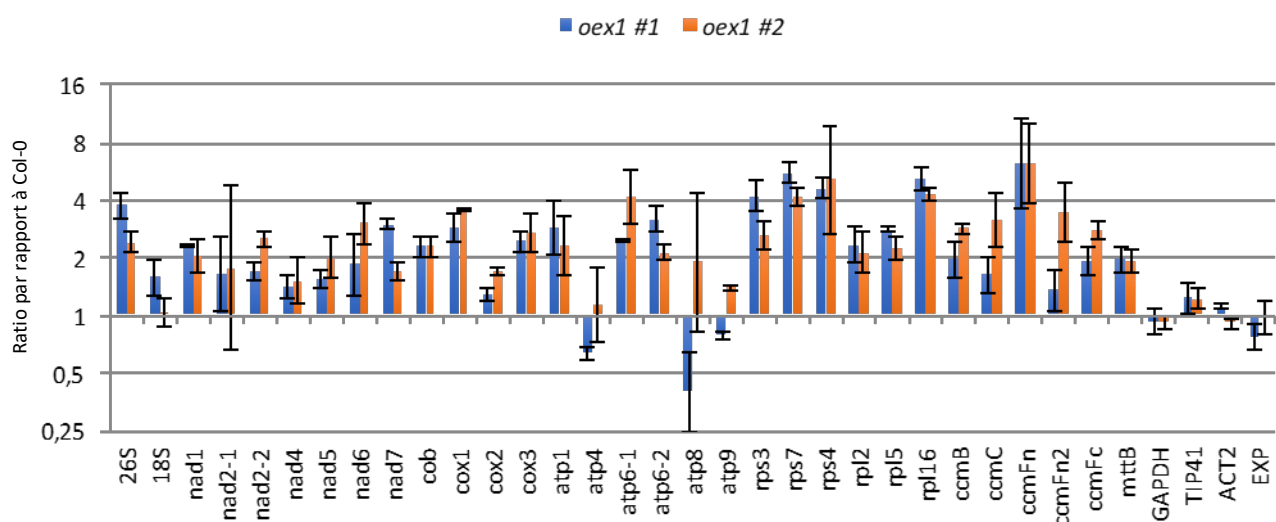


Figure R11. Analyse par RT-qPCR du transcriptome mitochondrial d'*oex1-1*.

Les transcrits de gènes mitochondriaux représentatifs ont été quantifiés par RT-qPCR et normalisés par rapport à un ensemble de gènes de ménage nucléaires (*GAPDH*, *TIP41*, *ACT2* et *EXP*). Les résultats sont représentés sur une échelle log2. Les résultats correspondent aux transcrits des rosettes de deux pools (#1 et #2) de plantes *oex1-1* homozygotes de première génération (plantes T2) âgées de trois semaines et comparés aux transcrits de plantes sauvages Col-0. Les barres d'erreurs correspondent aux écarts types de trois répliques techniques.

référence nucléaires *ACT1* (At2G37620) et *UBQ10* (At4G05320). Aucune région du génome ne montre de changement significatif de stœchiométrie d'une plante sauvage à une autre (Figure R8). Ce premier test permet de contrôler l'homogénéité et la fiabilité des résultats.

La seconde expérience a été réalisée sur plusieurs plantes de la troisième génération de mutants *oex1-1*. Pour les quatre plantes représentées, on observe d'importants changements au niveau de la stœchiométrie du génome. Plusieurs régions du génome voient leur nombre de copies relatives augmenter et ce jusqu'à cinq fois, ou diminuer (Figure R9). Contrairement à ce qui avait été observé chez d'autres mutants impliqués dans la recombinaison homologue (Chevigny et al., 2019; Wallet et al., 2015), certains profils de stœchiométrie obtenus pouvaient varier d'une plante *oex1-1* à une autre. Les régions dont le nombre de copies est augmenté sont bordées par des petites séquences répétées voir par des microhomologies pouvant être impliquées dans des recombinaisons ectopiques. Une hypothèse émise et vérifiée par l'équipe est que, lors de la recombinaison entre paires de petites séquences répétées, il peut y avoir formation de sous-génomes (Figures R9 et R10A) (Gualberto and Newton, 2017; Wallet et al., 2015). Certains de ces sous-génomes sont susceptibles de se répliquer de façon autonome et ainsi être présents en plus grande proportion par rapport au reste du mitogénome. Dans le cas où la réplication de ce sous-génome n'est pas possible, il peut arriver que la mitochondrie perde la séquence qu'elle contenait. Ces résultats ont été obtenus sur des mutants *oex1* de 3^{ème} génération. Les mutants de 1^{ère} génération présentent des profils bien plus mesurés (Figure R10B).

Nous avons également observé l'impact de l'absence de OEX1 sur le transcriptome de la mitochondrie en quantifiant les transcrits des gènes mitochondriaux par RT-qPCR dans deux lots de plantes mutantes et en les comparant à ceux du sauvage Col-0 (Figure R11). On observe une augmentation générale des transcrits chez les mutants *oex1-1* en comparaison au sauvage, mais aucun changement significatif d'expression d'un gène qui pourrait expliquer les phénotypes délétères de la mutation *oex1-1*. On note une apparente diminution des transcrits des gènes *atp4* et *atp8* dans l'un des réplicas biologiques mais n'est pas retrouvée dans le second. Cependant, les barres d'erreurs trop importantes correspondant aux triplicatas techniques nous font penser que ces différences apparentes sont le résultat de problèmes techniques.

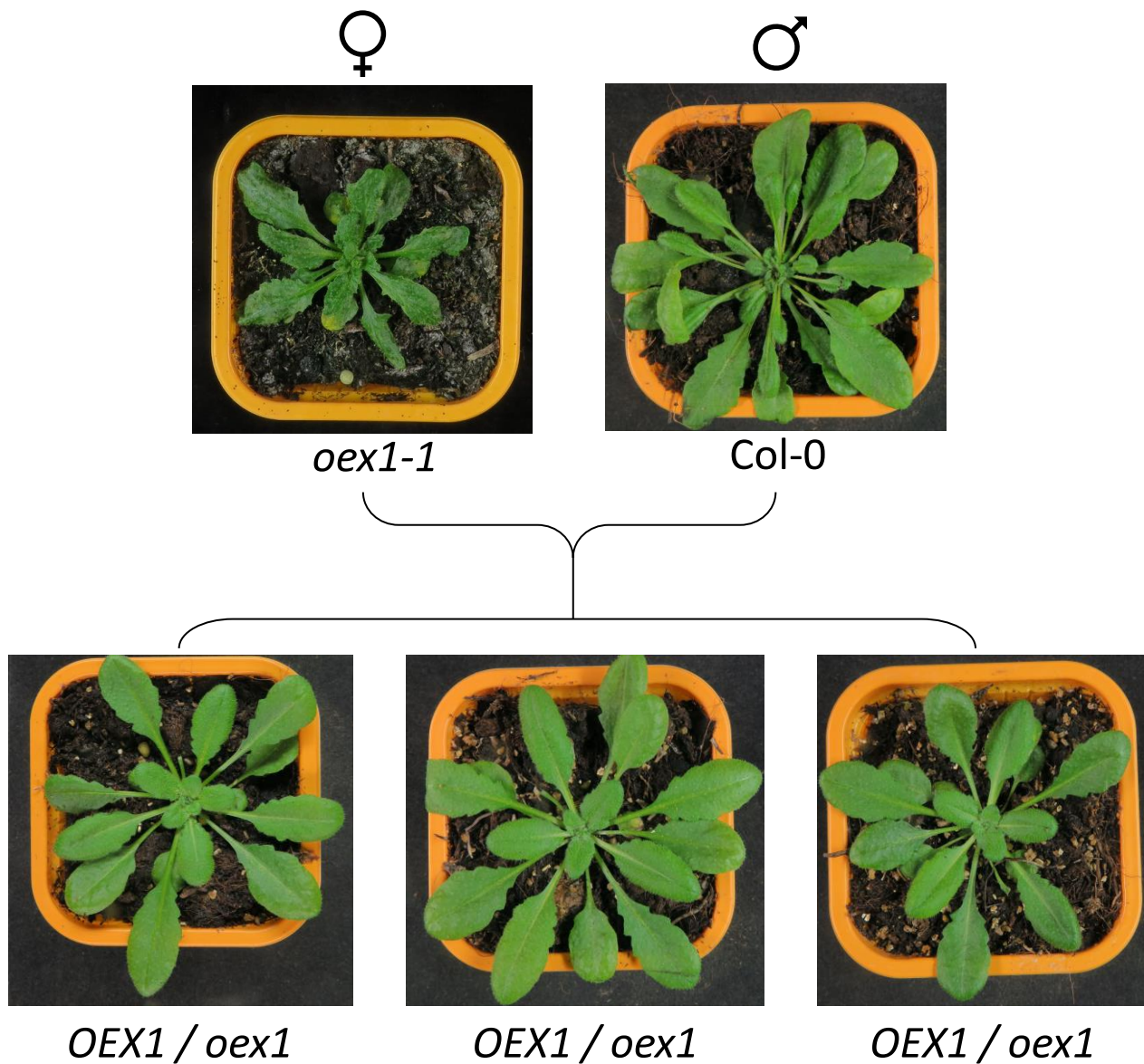


Figure R12. Rétrocroisement d'une plante *oex1-1* avec une plante sauvage Col-0.

Rétrocroisement effectué par dépôt de pollen de plantes sauvages Col-0 sur des pistils de fleurs émasculées de *oex1-1*. Les quelques plantes résultant du croisement sont hétérozygotes pour la mutation *oex1-1*, mais ont hérité le cytoplasme du mutant. Elles présentent un phénotype de croissance sauvage.

I.4 Rétrocroisement du mutant *oex1-1*

L'ADN cytoplasmique étant hérité des gamètes femelles, j'ai tenté un rétrocroisement entre une plante homozygote *oex1-1* dont on a éliminé les étamines avec du pollen de plante sauvage Col-0 ($\text{♀ } oex1-1 \times \text{♂ Col-0}$). Ce rétrocroisement permet de réintroduire l'allèle sauvage *OEX1* dans un contexte de plantes homozygotes *oex1-1*. Le but était de voir si les phénotypes visibles et moléculaires (organisation du mitogénome) peuvent être restaurés, ou s'ils sont une conséquence irréversible de modifications provoqués par l'absence de *OEX1*. Environ deux tiers des croisements n'ont pas abouti, ne permettant la croissance que de 5 siliques sur les 14 qui ont été émasculées et fertilisées avec le pollen de plantes sauvages. Ces siliques n'ont produit que quelques graines, moins d'une dizaine par silique, contre une cinquantaine pour des plantes sauvages. Cette observation conduit vers l'hypothèse que les ovules contenus dans le pistil de la plante mère sont affectés par l'absence d'*OEX1*. L'observation au microscope d'ovules non-fécondés sera nécessaire, pour confirmer cette hypothèse.

J'ai également tenté le rétrocroisement réciproque, en émasculant des fleurs de plantes sauvages Col-0 et en y apportant le pollen de plantes *oex1* ($\text{♂ Col-0} \times \text{♀ } oex1-1$). Bien que le mutant produit peu de pollen, il a été possible d'en déposer suffisamment sur quelques pistils. Or, après plusieurs jours d'observation, aucun des pistils n'a été fécondé. Cela nous amène à penser que le pollen *oex1* est peu viable. Ces observations suggèrent que les deux types de gamètes, masculin et féminin, sont affectés dans leur développement par l'absence d'*OEX1*.

Les plantes issues du rétrocroisement $\text{♀ } oex1-1 \times \text{♂ Col-0}$ sont hétérozygotes pour *oex1* (*oex1* +/-). Ces plantes ne présentaient aucun phénotype visible, ni de retard de développement (Figure R12). Pourtant elles ont hérité l'ADNmt affecté du mutant homozygote. Les plantes arrivent à maturité et forment des siliques saines et fertiles. Cette réversion à un phénotype sauvage peut être due au fait que nous avons croisé un mutant de première génération, donc faiblement affecté. La réintroduction d'un allèle sauvage *OEX1* pourrait suffire à restaurer un génome mitochondrial sain. Le même rétrocroisement effectué à l'aide de plantes mutantes plus affectées de deuxième ou troisième génération serait intéressant mais probablement pas faisable. En effet, avec les mutants de première génération il est difficile d'obtenir des croisements viables car ils ne produisent que rarement

des hampes florales viables, mais les mutants de générations plus avancées sont quasi tous complètement stériles.

La complémentation du phénotype moléculaire mutant par rétrocroisement dans la première génération de mutants homozygotes, mais pas dans des plantes plus affectées de la génération suivante, a été décrite pour les mutants *osb1*, *recA3* et *msh1* qui sont aussi affectés dans la surveillance de la recombinaison de l'ADNmt (Shedge et al., 2007; Xu et al., 2011; Zaegel et al., 2006). Il a été proposé que dans les premières générations il y a augmentation de l'hétéroplasmie du mitogénome par recombinaison, mais que la configuration majeure du ADNmt reste la forme sauvage, alors que dans les générations suivantes il peut avoir une amplification clonale ("stoichiometric shifting") d'une des formes alternatives du mitogénome, qui devient la forme prédominante, un processus qui est irréversible (Zaegel et al., 2006). Cependant, ce modèle a été décrit pour des mutants qui ne présentent pas de défaut de développement dans la première génération homozygote. Il est difficile de comprendre pourquoi toutes les plantes *oex1* de première génération sont affectées dans leur développement, alors que les effets sur l'ADNmt semblent mineurs.

I.5 Complémentation du mutant *oex1-1*

Notre caractérisation du phénotype d'*oex1* a été effectuée sur le seul mutant d'insertion T-DNA disponible. Or le procédé d'obtention d'un tel mutant ne se fait pas par insertion ciblée du T-DNA dans un gène d'intérêt, mais de façon aléatoire dans le génome nucléaire végétal (Alonso and Stepanova, 2003). L'insert est ensuite localisé par séquençage des régions flanquant le T-DNA. Les graines de ces mutants sont mises à disposition des chercheurs dans des banques de germoplasmes. De ce fait, il n'est pas exclu que le phénotype observé pour un mutant provienne en réalité d'une mutation secondaire non-identifiée. Il est ainsi indispensable de confirmer le lien entre le phénotype observé et la mutation du gène par complémentation. Pour cela, par la technique d'agrotransformation par "floral-dip" présentée dans le chapitre Méthodes, section III.3, nous avons essayé la complémentation de *oex1-1* par différentes constructions contenant le gène *OEX1*. Ainsi, afin de comprendre le rôle des deux isoformes de *OEX1* présentées précédemment, nous avons essayé la complémentation par des constructions exprimant des ADNc codant soit pour *OEX1a*, soit pour *OEX1b*. Les constructions ont été mises sous contrôle soit du promoteur endogène d'*OEX1* (*Pro_{OEX1}:OEX1*)

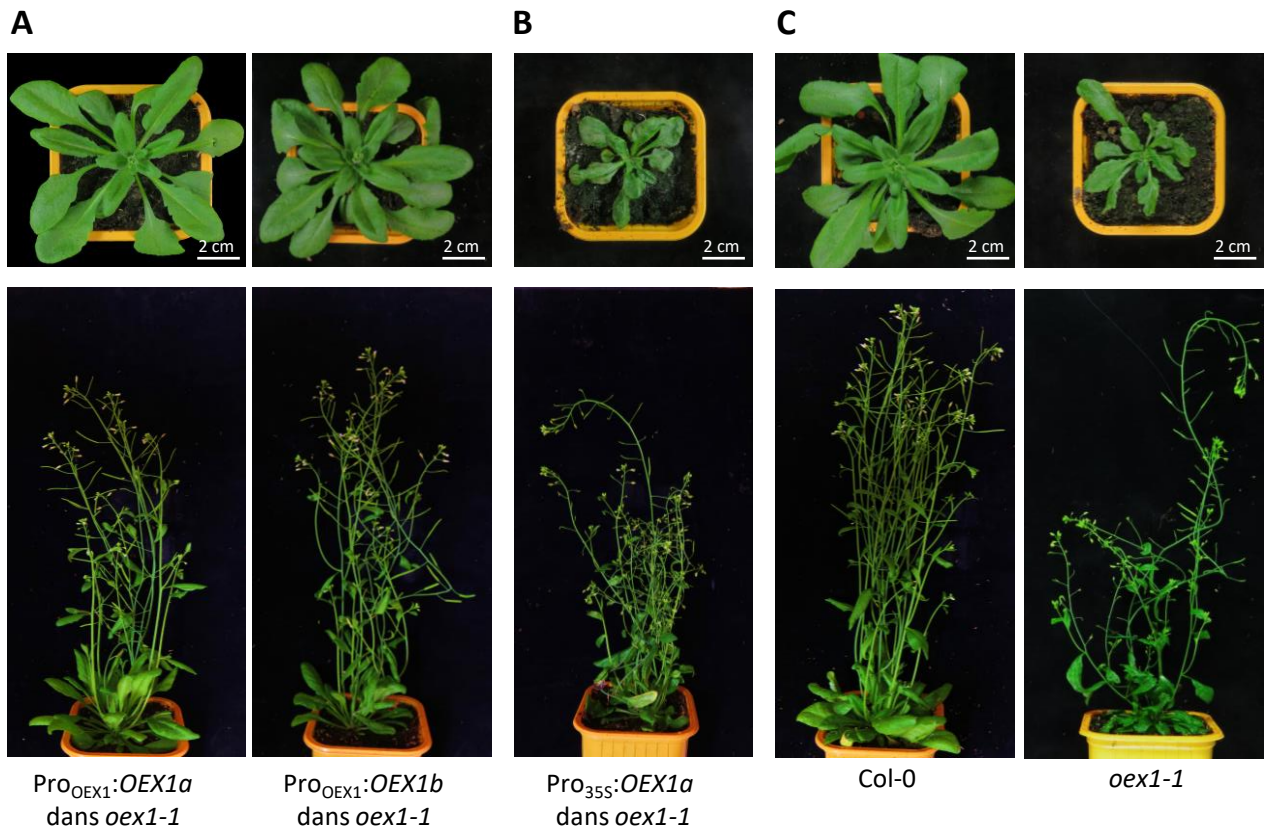


Figure R13. Complémentation du mutant *oex1-1*.

Complémentation du mutant *oex1-1* par des constructions contenant le gène codant OEX1a ou OEX1b sous contrôle (A) du promoteur endogène Pro_{OEX1} ou (B) du promoteur fort de l'ARN 35S du CAMV Pro_{35S}. Les plantes ont été transformées, sélectionnées par traitement BASTA puis génotypées afin de ne conserver que les plantes possédant au moins un allèle muté *oex1-1*. Les graines de ces plantes ont servi à sélectionner les plantes homozygotes *oex1-1* contenant les différentes constructions de complémentation présentées dans la figure. (C) Plantes d'*Arabidopsis* sauvage Col-0 et *oex1-1*, pour comparaison.

soit du promoteur fort de l'ARN 35S du CaMV (virus de la mosaïque du chou-fleur) ($\text{Pro}_{35S}:\text{OEX1}$) (Guilley et al., 1982; Odell et al., 1985). Les plantes complémentées par les constructions $\text{Pro}_{\text{OEX1}}:\text{OEX1}$ sous promoteur endogène possèdent un phénotype sauvage classique, ceci quelle que soit l'isoforme utilisée pour la construction. On n'observe pas de retard de croissance et elles sont parfaitement fertiles, confirmant que les phénotypes observés chez les plantes *oex1-1* proviennent bien de l'insertion du T-DNA dans le gène *OEX1* (Figure R13A). La présence ou l'absence du 6^{ème} exon dans les transcrits ne semble pas affecter l'activité principale d'OEX1, puisque les deux constructions OEX1a et OEX1b complètent le phénotype sans distinction. En revanche, les plantes complémentées avec *OEX1* sous promoteur fort ($\text{Pro}_{35S}:\text{OEX1}$) ne montrent pas d'amélioration du phénotype développemental en comparaison avec le mutant (Figure R13B). Une explication possible est que l'expression forte de la construction provoque l'induction d'un silencing. En effet, le mutant *oex1-1* comporte une insertion T-DNA qui contient une séquence du promoteur 35S. L'ajout d'une seconde copie du promoteur 35S pourrait induire du silencing dans la plante, comme cela a été décrit dans la littérature (Daxinger et al., 2008). Une seconde hypothèse pouvant être formulée est le rôle crucial que pourrait jouer OEX1 à des stades de développement durant lesquels le promoteur 35S du CaMV n'est pas actif, comme les premiers stades de développement de la graine. L'étude de l'activité du promoteur Pro_{OEX1} selon le tissu sera décrite en I.8.

I.6 Hémi-complémentations du mutant *oex1-1*

Comme l'ont montré certains des résultats de localisation de la protéine OEX1 couplée à la GFP, OEX1 pourrait être présente à la fois dans le chloroplaste et dans la mitochondrie. Nous avons remarqué que son absence menait à un phénotype développemental sévère et à une fertilité très réduite, en corrélation avec des modifications importantes de la structure du mitogénome par recombinaison. Afin de confirmer que ces phénotypes sont liés à l'absence de OEX1 dans la mitochondrie, dans le chloroplaste ou les deux, nous avons procédé à des expériences d'hémi-complémentation du mutant *oex1-1*. Pour cela, nous avons remplacé la séquence d'adressage organellaire d'OEX1 soit par la séquence d'adressage strictement mitochondriale de l'Alternative Oxydase 1 (AOX1), soit par la séquence d'adressage strictement chloroplastique de la petite sous unité de la RUBISCO (RBCS). Afin de pouvoir

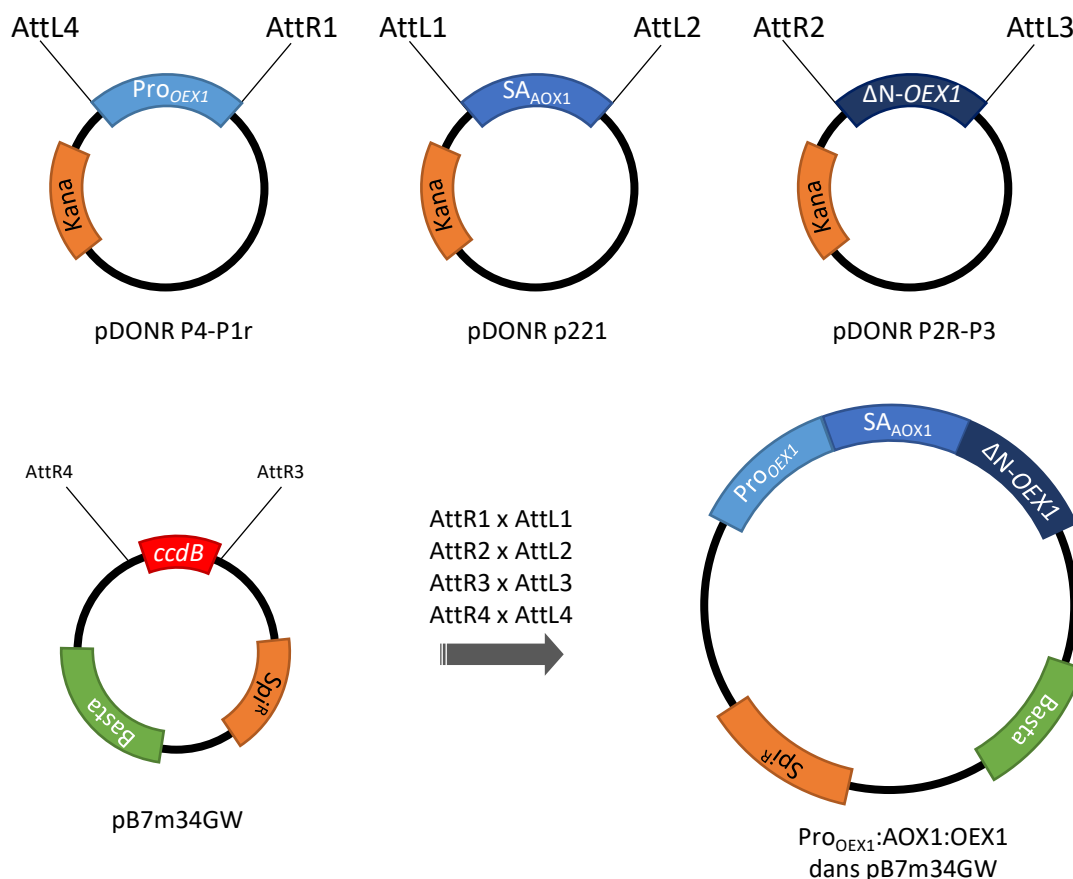


Figure R14. Schéma de la méthode MultiSite Gateway® utilisée pour l'hémi-complémentation.

Les différents éléments de la construction sont d'abord clonés dans le vecteur pGEM-T, puis sont intégrés dans les différents vecteurs pDONR par réaction BP. La réaction LR permet l'assemblage de la séquence Pro_{OEX1}:SA_{AOX1}:ΔN-OEX1 dans le vecteur pB7m34GW.

Pro_{OEX1} : promoteur endogène de *OEX1* ; SA_{AOX1} : séquence d'adressage de l'alternative oxydase mitochondriale AOX1 ; ΔN-OEX1 : séquence codant pour la protéine OEX1 déplétée de 86 acides aminés du côté N-terminal.

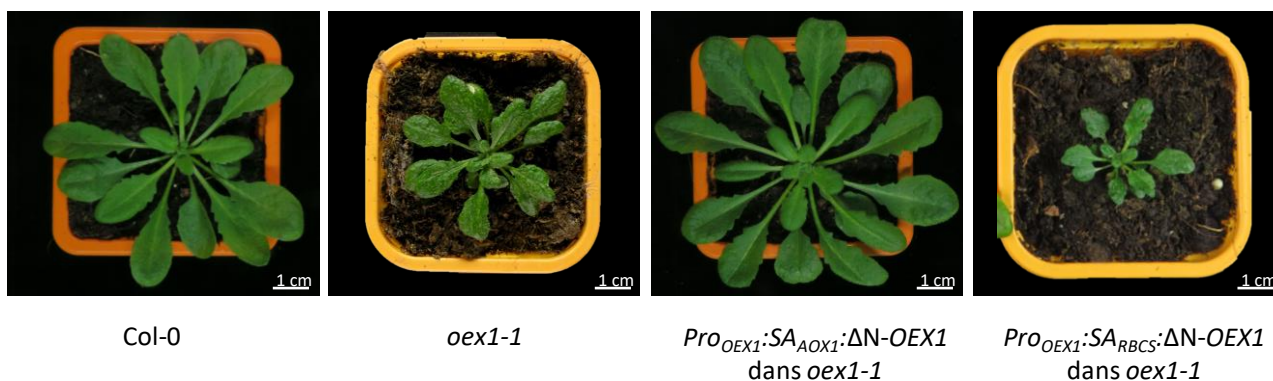


Figure R15. Hémi-complémentation du mutant *oex1-1*.

Complémentation du mutant *oex1-1* par le gène *OEX1* dont le signal d'adressage a été remplacé par celui de l'Alternative Oxydase 1 (AOX1) ou de la petite sous-unité de la ribulose biphosphate carboxylase (RBCS), induisant respectivement une localisation strictement mitochondriale ou chloroplastique de la protéine.

assembler dans un même plasmide une construction comprenant le promoteur Pro_{OEX1}, un signal d'adressage choisi et le gène codant OEX1 délété de sa propre séquence d'adressage, nous avons utilisé la technologie MultiSite Gateway® Cloning décrite dans le chapitre Méthodes, section V.9. Cette technique permet d'assembler facilement plusieurs séquences d'ADN grâce à des sites de recombinaison (Magnani et al., 2006). Pour cela, nous avons cloné le promoteur endogène Pro_{OEX1} dans le vecteur pDONR™ P4-P1r, les séquences d'adressage d'AOX1 ou de RBCS dans pDONR™221 et le gène codant pour OEX1 fusionné à une étiquette HA dans le pDONR™ P2R-P3. Les trois séquences sont alignées par recombinaison dans le vecteur de destination pB7m34GW (Figure R14).

Dans un premier temps nous avons étudié la complémentation du mutant lorsque OEX1 est adressée strictement à la mitochondrie (mtOEX1). Les plantes complémentées retrouvent un phénotype sauvage, tant au niveau développemental qu'au niveau de la fertilité. On n'observe aucun retard de croissance en comparaison à des plantes sauvages Col-0 (Figure R15). Les plantes complémentées avec OEX1 strictement adressée au chloroplaste (cpOEX1) ont le même phénotype que les mutants *oex1-1* non-complémentés. On peut conclure que OEX1 a un rôle crucial uniquement dans la mitochondrie, et que l'absence d'OEX1 dans le chloroplaste n'affecte pas le développement de la plante. Il semblerait qu'effectivement OEX1 ne soit adressée que vers les mitochondries, comme le suggèrent les résultats d'expression constitutive d'OEX1:GFP dans des plantes d'*Arabidopsis*. Dans le cas peu probable d'une double localisation, il se peut que la protéine ne soit utile que dans certaines conditions comme, par exemple, en cas de stress génotoxique. Du fait de la sévérité du phénotype développemental d'*oex1-1*, nous n'avons jusqu'à présent pas testé de stress génotoxique sur le mutant, car il ne serait pas possible de comparer son effet sur des plantes mutantes par rapport aux même stress sur des plantes sauvages. En revanche, grâce aux plantes complémentées avec mtOEX1, nous pourrions évaluer la conséquence de l'absence d'OEX1 dans les chloroplastes lors d'un stress génotoxique. La seconde hypothèse est qu'une autre protéine possède un rôle redondant à celui de OEX1 dans le chloroplaste. La protéine OEX2, paralogue d'OEX1, est adressée au chloroplaste. Si les deux protéines sont redondantes pour la fonction chloroplastique, seule l'étude d'un double mutant *oex1 oex2* pourrait nous apporter des réponses à ce sujet. Le travail concernant le double mutant est décrit au chapitre 2.V.

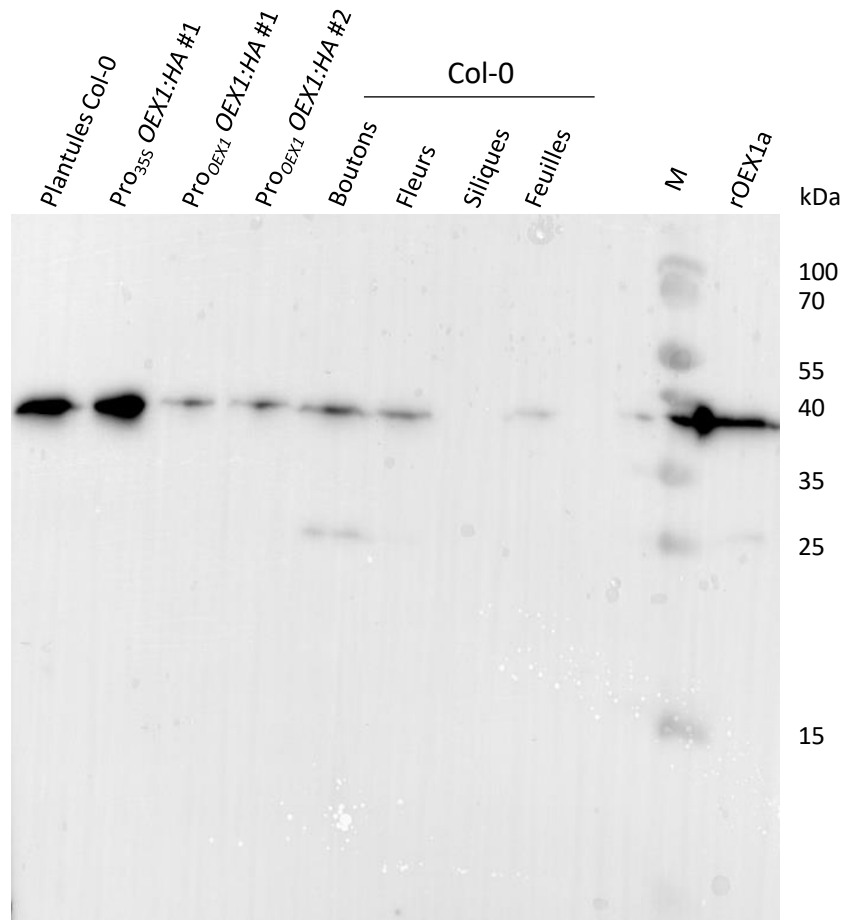


Figure R16. Immuno-détection d'OEX1 à l'aide d'anticorps spécifiques.

Immuno-détection de la protéine OEX1 native et OEX1:HA dans différents extraits végétaux à l'aide des anticorps anti-OEX1 issus de la troisième saignée du lapin 3570, dilués 10 000 fois.

Plantules Col-0 : Extraits de plantules d'environ 7 jours.

Pro_{35S}:OEX1:HA : extrait de plante *oex1-1* transformée par une construction codant OEX1a fusionné à l'étiquette HA sous le contrôle du promoteur de l'ARN 35S du CAMV.

Pro_{OEX1}:OEX1:HA : extrait de plantes *oex1-1* transformées par une construction codant OEX1a fusionné à l'étiquette HA sous le contrôle du promoteur endogène Pro_{OEX1}.

M : marqueur de poids moléculaire.

rOEX1a : protéine OEX1a recombinante, déletée de sa séquence d'adressage et mélangée à un extrait de protéines totales de feuilles d'*A.thaliana*.

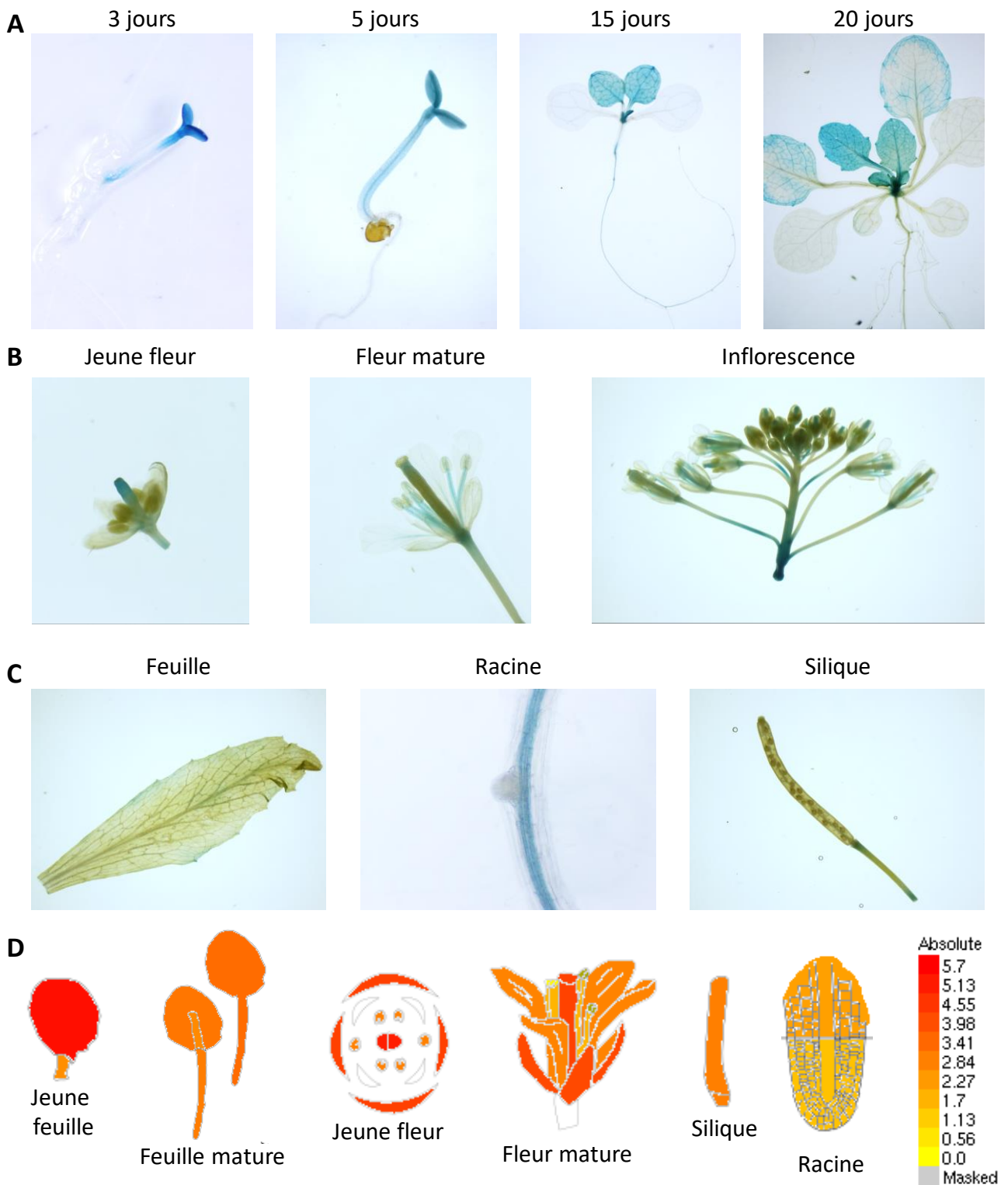


Figure R17. Etude de l'activité du promoteur Pro_{OEX1} par fusion au gène rapporteur *GUS*.

Etude réalisée par transformation de plantes d'*A. thaliana* avec une construction de fusion du promoteur Pro_{OEX1} au gène rapporteur *GUS*. Après incubation avec le substrat X-Gluc, une coloration bleue indique que la transcription du gène est activée par le promoteur. **(A)** Plantules à 3, 5, 15 et 20 jours après germination. **(B)** Fleurs en cours de développement et mature, et inflorescence. **(C)** Feuille de plante adulte, racine comprenant une racine latéral émergente et silique. **(D)** Représentation de l'abondance relative des transcrits d'*OEX1* par RNAseq (<https://bar.utoronto.ca/eplant/>).

I.7 Production d'un anticorps spécifique à OEX1

Antérieurement à mon arrivée au laboratoire, l'équipe a fait produire des anticorps polyclonaux spécifiques à OEX1 avec l'aide de la plateforme "Polyclonal Antibodies service" de l'IGBMC (Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire). La protéine dépourvue de sa partie N-terminale (85 acides aminés) a été injectée à deux lapins (numérotés 3569 et 3570). Les sérums recueillis lors de trois saignées ont été conservés à -20 °C.

Afin de tester la spécificité des sérums, nous avons effectué des immunodétections sur des western blots fixant divers extraits de plantes. Comme contrôle positif, nous avons testé l'anticorps sur la protéine recombinante OEX1 mélangée à un extrait de protéines totales de feuille d'*A. thaliana*, (Figure R16). Comme attendu, nous avons détecté une bande unique, située à environ 38 kDa. L'anticorps semble spécifique car nous n'observons pas de bandes contaminantes.

I.8 Analyse de l'expression d'OEX1 grâce au gène rapporteur GUS

Pour analyser l'activité d'un promoteur, la fusion à un gène rapporteur est une méthodologie simple et peu onéreuse. L'utilisation de cette méthode combinée à une analyse de données de transcriptomique ou une analyse du taux de transcrits du gène dans les différents tissus permet de confirmer les résultats. Afin d'analyser l'expression du gène *OEX1*, nous avons fusionné son promoteur au gène rapporteur *GUS* par clonage *Gateway*[™] dans le vecteur pMDC162. Ce vecteur a ensuite été introduit dans des plantes d'*A. thaliana* par la technique du "floral-dip". Les plantes transformées ont été sélectionnées par résistance à l'hygromycine. L'analyse de l'activité du promoteur se fait dans à la génération T2. Les plantules en croissance ont été prélevées aux stades cotylédons, deux feuilles et huit feuilles. Nous avons également prélevé d'autres tissus de plantes adultes : boutons floraux, fleurs, feuilles caulinaires, racines et siliques. Après avoir mis les échantillons en contact avec la solution contenant le substrat X-gluc, nous les avons décolorés par une suite de lavages à concentration croissante en éthanol et observés à la loupe binoculaire (Figure R17). On observe une coloration bleue soutenue dans les jeunes cotylédons et les jeunes feuilles en développement. La coloration est plus faible voire très légère dans les tissus âgés ou à division lente. On observe également une coloration au niveau des jeunes pistils en formation, du filet et des étamines. Dans les racines, aucune coloration bleue n'a été observée dans les pointes racinaires, mais de la

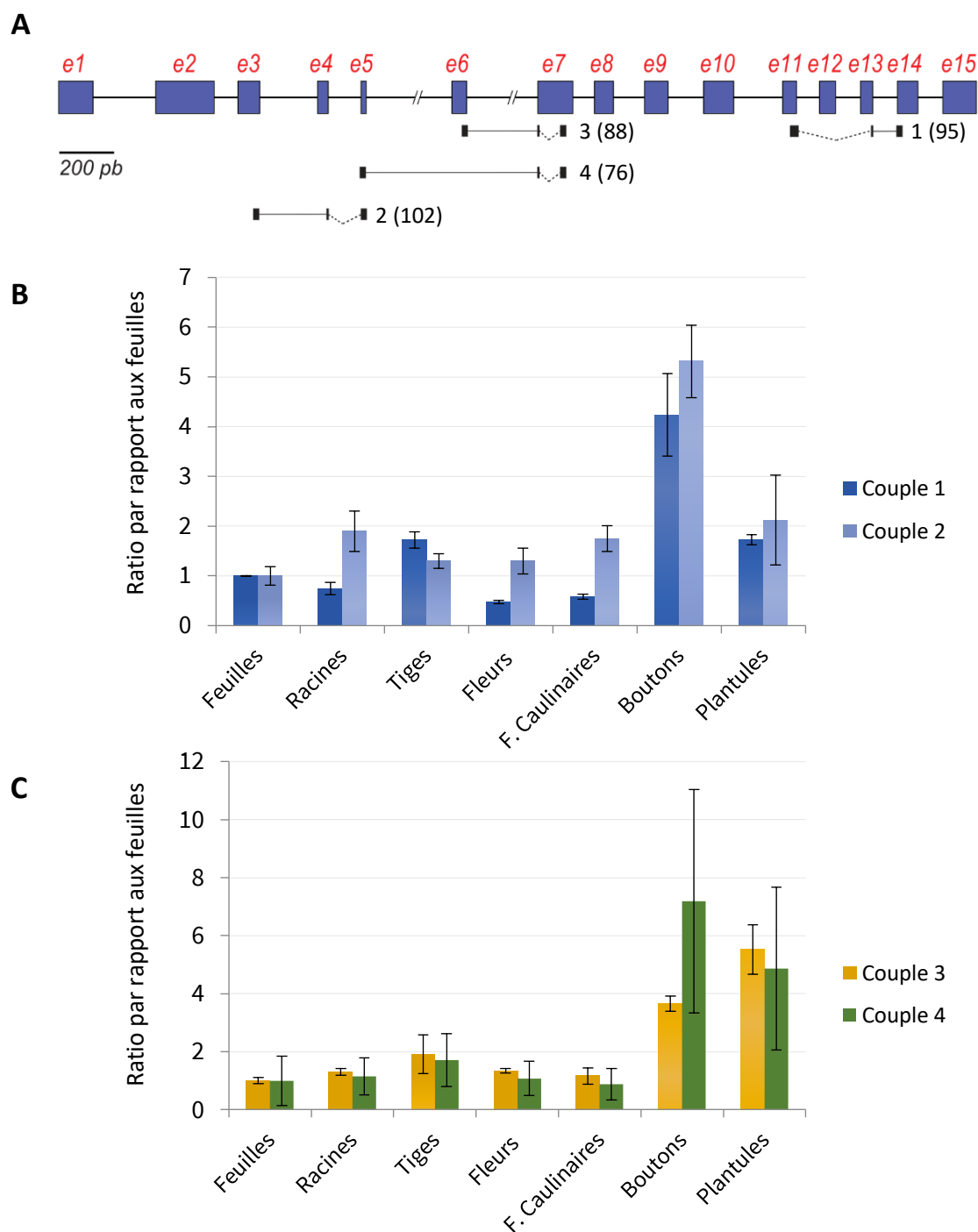


Figure R18. Analyse par RT-qPCR des transcrits d'*OEX1* dans différents tissus d'*A. thaliana*.

(A) Représentation du gène *OEX1* et des amorces (rectangles noirs) utilisées pour la qPCR. Les rectangles bleus représentent les exons (e1 à e15). Lorsqu'une amorce est à cheval sur deux exons, les deux parties sont reliées par un trait plein. Les pointillés représentent la séquence amplifiée. Les chiffres entre parenthèse indiquent la taille des produits de PCR. (B et C) RT-qPCR à partir d'ARN extraits de feuilles, jeunes racines, tiges, fleurs, feuilles caulinaires, boutons floraux et plantules d'*A. thaliana* Col-0. (B) Les couples d'amorces 1 et 2 permettent de quantifier les transcrits d'*OEX1* dans différents tissus, indépendamment de l'épissage alternatif. (C) Les couples 3 et 4 permettent de distinguer le transcrit *OEX1a* (couple 3) du transcrit alternatif *OEX1b* qui ne contient pas l'exon 6 (couple 4). Les valeurs ont été normalisées arbitrairement par rapport aux feuilles adultes.

coloration était visible dans le cylindre central correspondant aux tissus conducteurs. D'après les résultats obtenus, le gène *OEX1* est fortement transcrit dans les jeunes tissus aériens à division rapide, et faiblement dans le système vasculaire des racines.

Ces données ont été comparées aux données de transcriptomique obtenues par RNAseq et disponibles sur le site <http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi> publiées dans (Klepikova et al., 2016). D'après ces données le gène *OEX1* est le plus exprimé dans les jeunes feuilles, les pétales et le pistil (Figure 17).

I.9 Analyse de l'expression de *OEX1* par RT-qPCR et par western blot

Afin de confirmer nos observations préliminaires quant à l'expression de *OEX1*, nous avons analysé par RT-qPCR le taux de transcrits dans différents tissus. Pour ce faire, nous avons dessiné des couples d'amorces dont l'une se trouve à cheval sur deux exons, ce qui nous permet de discriminer les amplifications issues de l'ADNc de celles issues de l'ADN génomique. Nous avons également généré des amorces permettant de discriminer les deux transcrits issus de l'épissage alternatif créant les isoformes *OEX1a* et *OEX1b* (Figure R18A).

Afin d'étudier l'abondance relative de transcrits de *OEX1* dans différents tissus, nous avons tout d'abord extrait au Trizol (Méthodes, VI.I) les ARN totaux de plantules de 7 jours, de feuilles de rosette, de feuilles caulinaires, de tiges, de boutons floraux, de fleurs épanouies et de jeunes racines de plantes de 20 jours. Les ADNc ont été synthétisés par rétrotranscription (Méthodes, VI.3), utilisant comme amorces un mix oligo-dT et d'hexamères aléatoires. Des expériences de qPCR ont été effectuées sur ces ADNc, avec les amorces spécifiques d'*OEX1* décrites plus haut. L'expérience a été réalisée en triplicata et les données ont été normalisées par rapport aux gènes de référence *ACT2*, *TIP41*, *EXP* et *GAPDH*. Nous avons arbitrairement choisi l'expression d'*OEX1* dans les feuilles de rosette comme standard d'expression. Les résultats de RT-qPCR montrent une forte accumulation de transcrits, allant jusqu'à 2,5 fois plus dans les plantules de 7 jours et 8 fois plus dans les boutons floraux (Figure R18B). Ces résultats sont consistants avec ceux obtenus par fusion promoteur:GUS pour les plantules, mais pas avec ceux obtenus pour les boutons floraux. Cependant, l'abondance des transcrits d'*OEX1* dans les boutons floraux a aussi été observé par RNAseq (eFP Browser, <http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>, (Klepikova et al., 2016). Cette différence de résultats peut être la conséquence d'une stabilité du transcrit qui n'est pas en rapport avec

l'activité du promoteur. La RT-qPCR permettant de distinguer les transcrits *OEX1a* et *OEX1b* nous montre que quels que soient les tissus, il n'y a pas une isoforme plus abondante que l'autre (Figure R18C).

Une étude de la location tissulaire de la protéine OEX1 par immuno-détection, en utilisant un anticorps spécifique, indique une plus forte présence dans les plantules, une présence plus faible dans les fleurs et boutons floraux et très faible dans les feuilles adultes, la protéine n'était pas détectable dans les siliques. L'expérience a également permis de confirmer la présence de la protéine dans les plantes mutantes *oex1* complémentées (Figure R16).

II. Etude de l'interactome de OEX1

Nous avons voulu tester l'interaction de la protéine OEX1 avec de probables partenaires, en utilisant la méthode du double hybride de levure. L'avantage de la technique est son faible coût et sa facilité de mise en place, cependant elle ne permet de tester que des interactions directes et avec un nombre réduit de facteurs potentiels. Le double hybride de levure est une technique intéressante à utiliser lorsqu'on a déjà des hypothèses sur l'interaction entre deux protéines. Dans la bactérie, les domaines ADN polymérase, 3'-5' exonucléase et 5'-3' exonucléase sont présents dans une seule et même protéine, l'ADN polymérase I. Dans les mitochondries de plantes, ces domaines sont séparés, les deux premiers sont présents sur les deux ADN polymérases organellaires POL1A et POL1B alors que le domaine 5'-3' exonucléase se retrouve au sein des protéines OEX1 et OEX2. Nous avons voulu vérifier l'hypothèse selon laquelle les protéines OEX1 et OEX2 interagiraient avec les ADN polymérases afin de reconstituer un complexe similaire au facteur bactérien. Nous avons choisi de tester l'interaction avec les deux ADN polymérases car, bien que similaires, elles diffèrent dans leur fonction. En effet, les 2 polymérases sont impliquées dans la réplication, mais POL1B semble avoir un rôle plus important dans la réparation (Parent et al., 2011). Pour tester si cette interaction existe, nous avons cloné les ADNc de OEX1, OEX2, POL1A et POL1B dépourvues de leur séquence d'adressage en N-terminal, dans le vecteur PDONR™ Zéo. Les régions clonées ont été choisies en fonction des régions conservées, à partir des alignements de séquences protéiques d'espèces représentatives des plantes à fleur. Nous avons utilisé la technologie *Gateway® Cloning* pour insérer ces gènes soit dans le vecteur pGADgWT7, permettant la fusion

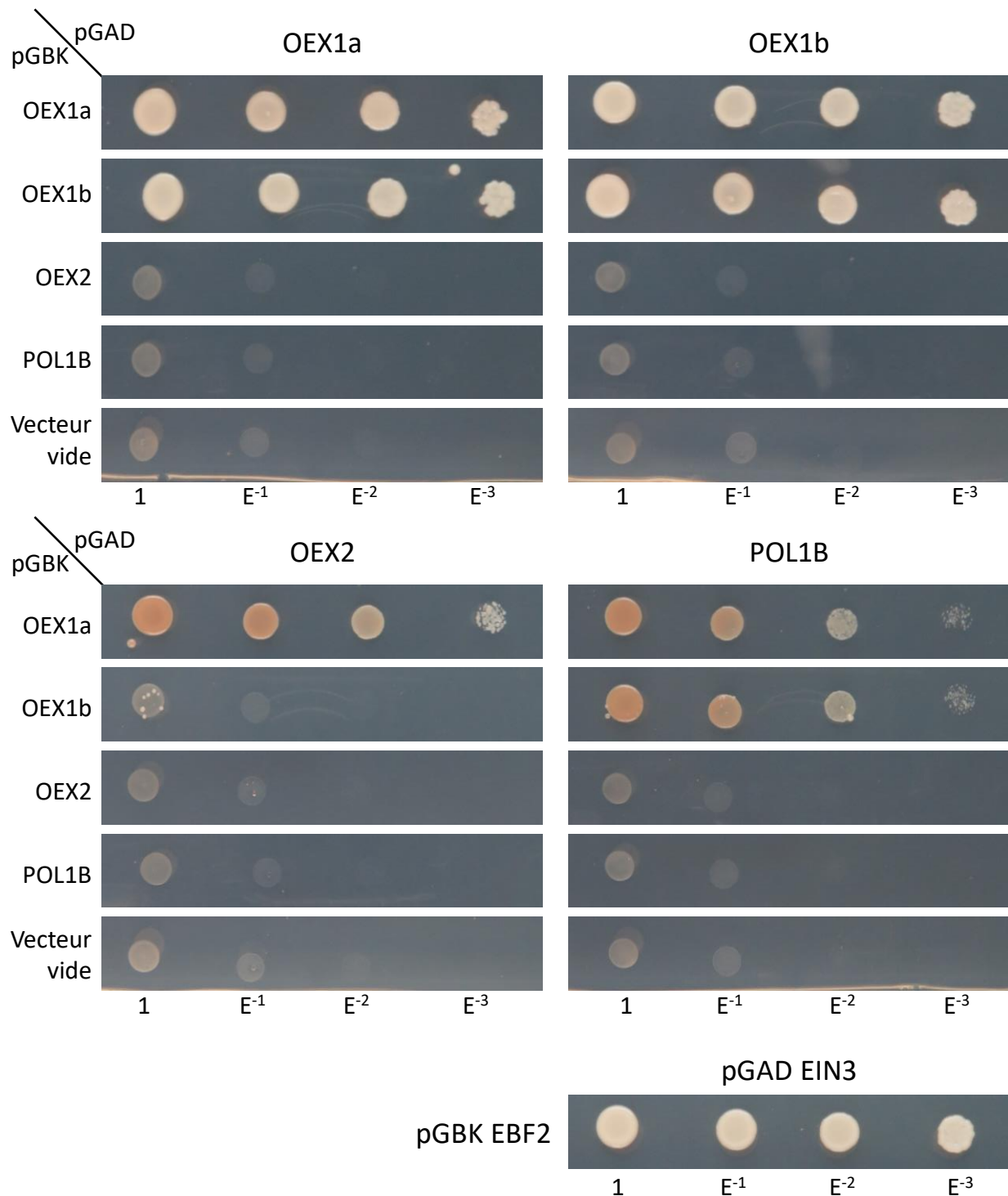


Figure R19. Analyse des interactions par double hybride de levure.

Les interactions entre OEX1a, OEX1b, OEX2 et POL1B ont été testées par double hybride, dans *Saccharomyces cerevisiae*, sur milieu SD privé de leucine, de tryptophane et d'histidine. Les protéines testées sont fusionnées, soit au domaine de liaison, soit au domaine d'activation du facteur de transcription GAL4. Les témoins négatifs (vide) consistent en la co-transformation avec le vecteur pGBK vide. L'interaction entre EIN3 et EBF2 est utilisée comme témoin positif. Une croissance des levures indique une interaction entre les deux protéines testées. Pour chaque test, quatre dilutions en cascade ont été effectuées (1, 1/10, 1/100, 1/1000).

au domaine d'activation du facteur GAL4, soit dans le vecteur pGBKgwT7, permettant la fusion au domaine de liaison à l'ADN de GAL4. Concernant OEX1, dans le but de comprendre si la boucle formée par le 6^{ème} exon pouvait jouer un rôle dans l'interaction, nous avons cloné les ADNc des deux isoformes OEX1a et OEX1b. Les protéines ont été testées les unes contre les autres, mais aussi contre elles-mêmes, pour tester si elles agissent en tant que monomère ou polymère. Chaque construction a également été testée contre un vecteur vide, afin de vérifier qu'aucune des protéines n'est capable d'activer la transcription de façon autonome. Les protéines testées ayant potentiellement une activité exonucléase, elles peuvent avoir la capacité de se fixer à l'ADN même sans le domaine de liaison de GAL4. Le témoin négatif a été réalisé en testant les deux vecteurs vides, et un témoin positif contenant les constructions pGAD:EIN3 et pGBT9:EBF2, deux protéines dont l'interaction avait déjà été confirmée, nous a été donné par Thomas POTUSCHAK,. Malgré de nombreuses tentatives nous n'avons pas réussi à amplifier et cloner l'ADNc de POL1A. Nous avons donc réalisé l'expérience de double hybride avec les quatre protéines restantes, à savoir OEX1a, OEX1b, OEX2 et POL1B.

Les résultats présentés en Figure R19 nous suggèrent que la protéine OEX1 interagit avec elle-même, indépendamment de l'isoforme testée. Cette interaction est confirmée par la non-croissance des levures contenant *OEX1* ainsi qu'un vecteur vide. On observe également une interaction entre OEX1a et OEX2, ainsi qu'entre les deux isoformes de OEX1 avec POL1B. Ces dernières interactions ne sont observées que dans le cas où OEX1 est fusionné au domaine d'activation.

L'interaction apparente entre OEX1 et POL1B fait penser qu'effectivement il pourrait y avoir coopération entre l'ADN polymérase et OEX1 pour des fonctions que demandent leurs activités respectives. Par contre, les résultats de localisation sub-cellulaire de OEX1 nous font penser que l'interaction entre OEX1 et OEX2 n'a pas de signification biologique.

III. Caractérisation de l'activité de OEX1

III.1 Production de protéines recombinantes pour les tests d'activité

OEX1 est prédite comme possédant une activité nucléase. Dans le but de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse, nous avons mené des tests d'activité qui consistent à incuber la protéine purifiée avec différents types de structures d'acides nucléiques, puis d'observer ou non la dégradation de ceux-ci.

III.1.a Constructions et expression des protéines

Pour le clonage, nous avons amplifié l'ADN complémentaire de *OEX1* sans les 255 nucléotides du côté 5', ceci afin d'éliminer sa séquence d'adressage et augmenter sa solubilité. Cet ADN a été cloné dans le vecteur d'expression pET28a(+). Ce vecteur a été choisi car il permet la fusion d'une étiquette 6xHis en N-terminal de la protéine d'intérêt, permettant ainsi sa purification par fixation sur colonne d'affinité au nickel. L'expression de la construction est placée sous contrôle du promoteur de l'ARN Polymérase T7, permettant une induction contrôlée par ajout d'IPTG et prévenant les fuites d'induction. Nous avons cloné les deux isoformes *OEX1a* et *OEX1b* dans ce vecteur d'expression afin de mieux comprendre l'éventuel rôle biologique de l'épissage alternatif. Les vecteurs recombinants ont été utilisés pour transformer des bactéries *E. coli* de la souche BL21 (DE3) qui est optimisée pour la surproduction de protéines. Les protéines recombinantes produites ont été nommées rOEX1a et rOEX1b.

Afin de nous assurer que les activités observées proviennent de rOEX1 et non de protéines bactériennes contaminantes, nous devons effectuer ces mêmes tests avec des versions inactives de la protéine, ce qu'on appelle des mutants catalytiques. Pour cela, deux mutants catalytiques ont été générés pour chaque isoforme, par la méthode de mutagenèse dirigée par PCR décrite dans le chapitre Méthode, section VIII.8. Nous avons choisi de substituer indépendamment deux acides aspartiques (D) en Alanine (A) au niveau des positions 232 et 250 de la protéine, car ils sont essentiels à l'activité nucléase du domaine PIN (Senissar et al., 2017). Les mutants ont été nommés en référence à l'acide aminé muté, la position de la

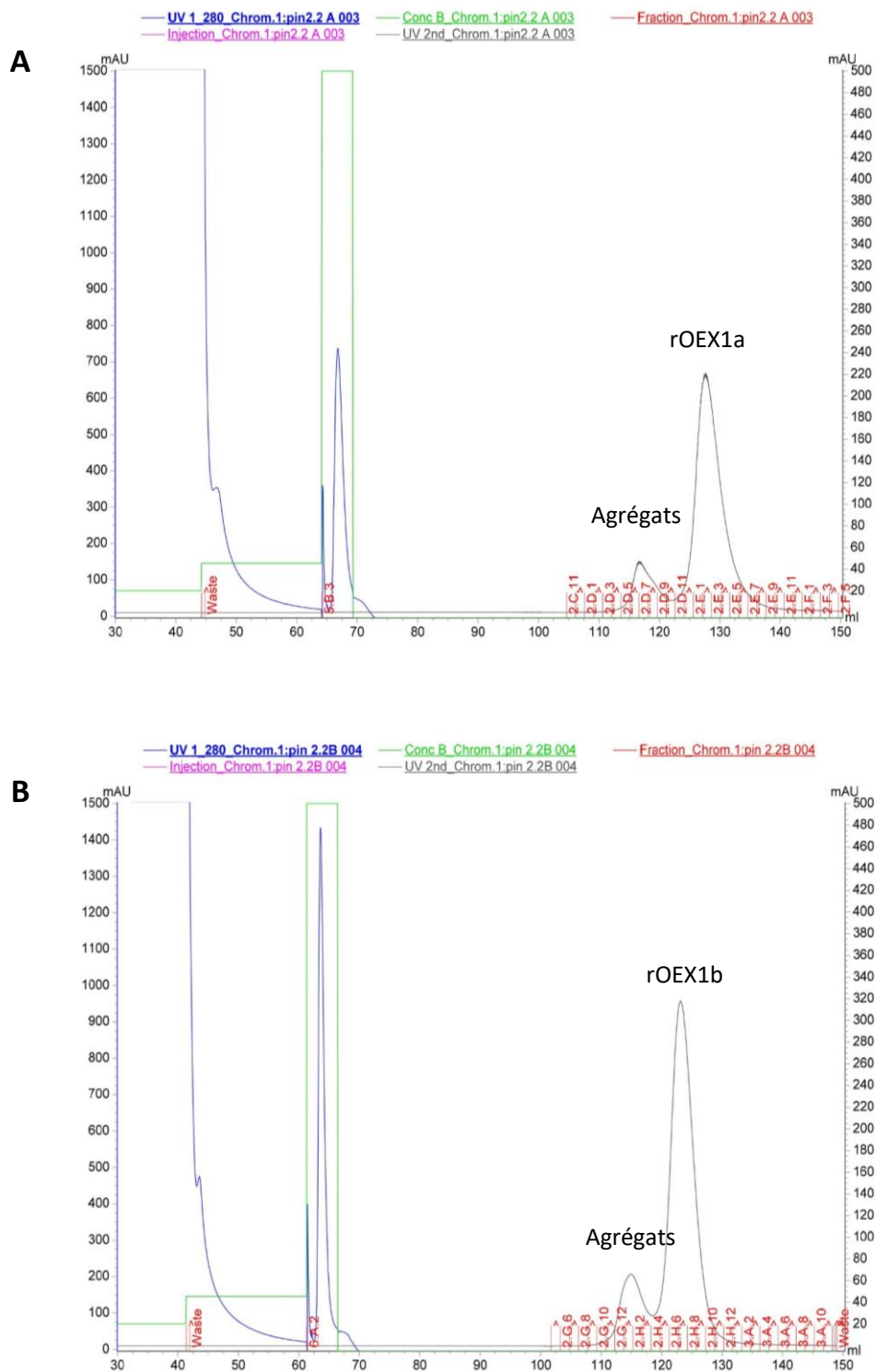


Figure R20. Purification de rOEX1a et rOEX1b.

Chromatogrammes des purifications de rOEX1a (**A**) et rOEX1b (**B**) par affinité au nickel suivie de filtration sur gel. L'axe des ordonnées représenté à gauche correspond aux mesures de l'absorbance à 280 nm à la sortie de la colonne d'affinité (en bleu). La ligne verte représente les concentrations d'imidazole utilisées pour le lavage et élution. L'axe des ordonnées de droite correspond à l'absorbance à 280 nm à la sortie de la colonne d'exclusion de taille (en gris).

rOEX1a et rOEX1b : isoformes de OEX1 déplétées de leur séquence d'adressage et fusionnées à une étiquette de 6 histidines en N-terminal.

mutation ainsi que l'isoforme dont il est issu. Le mutant D232A-a signifie qu'il s'agit d'un mutant catalytique de rOEX1a, dont l'acide aspartique en position 232 a été muté en alanine. L'expression et la purification de ces protéines recombinantes s'est effectuée en deux temps. Dans un premier temps nous avons procédé à une purification sur colonne de Ni-NTA agarose suivie d'une filtration sur gel, pour évaluer si rOEX1 était présente sous forme monomérique ou d'un polymère. Puis nous avons cherché à optimiser les conditions de purification afin de réduire le temps de préparation de l'enzyme et d'obtenir un extrait plus concentré destiné aux tests d'activité.

III.1.b Purification sur colonne de Ni-NTA agarose suivi de filtration sur gel

Dans un premier temps, rOEX1a et rOEX1b ont été exprimées et purifiées à la plateforme "Production et purification des protéines" par Nicolas Baumberger à l'aide du système de chromatographie en phase liquide ÄKTA pure (Cytiva, Marlborough, Massachusetts, United-States). Les bactéries issues de 500 mL de culture induite à l'IPTG ont été lysées par sonication comme décrit en Méthodes section VII.6 et 7, puis le lysat a été déposé sur colonne de Ni-NTA équilibrée avec un tampon d'extraction (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 5 % (v/v) glycérol; 300 mM NaCl). La colonne a été lavée par passage de 20 volumes de tampon supplémenté de 30 mM d'imidazole. Cette étape permet de décrocher les protéines qui auraient pu interagir de façon non-spécifique avec la colonne. Puis les protéines sont éluées à l'aide du tampon d'élution (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 5 % (v/v) glycérol; 150 mM NaCl; 100 mM imidazole). Les protéines éluées sont ensuite purifiées par chromatographie d'exclusion stérique sur Superdex S200, qui permet de séparer les protéines en fonction de leur taille. Le logiciel UNICORN permet la visualisation et le suivi de la purification. D'après les résultats de cette chromatographie effectuée distinctement pour les protéines OEX1a et OEX1b, on observe un pic unique (Figure R20), nous indiquant que OEX1 est présente en une forme unique. Le pic correspond à une taille de 400 kDa, nous suggérant que OEX1 pourrait être sous forme multimérique. Ces résultats doivent être reproduits afin d'être confirmés.

Les premiers tests d'activité ont révélé que la protéine purifiée selon ce protocole possédait une activité faible, ainsi nous avons modifié le protocole de purification pour la suite des expériences.

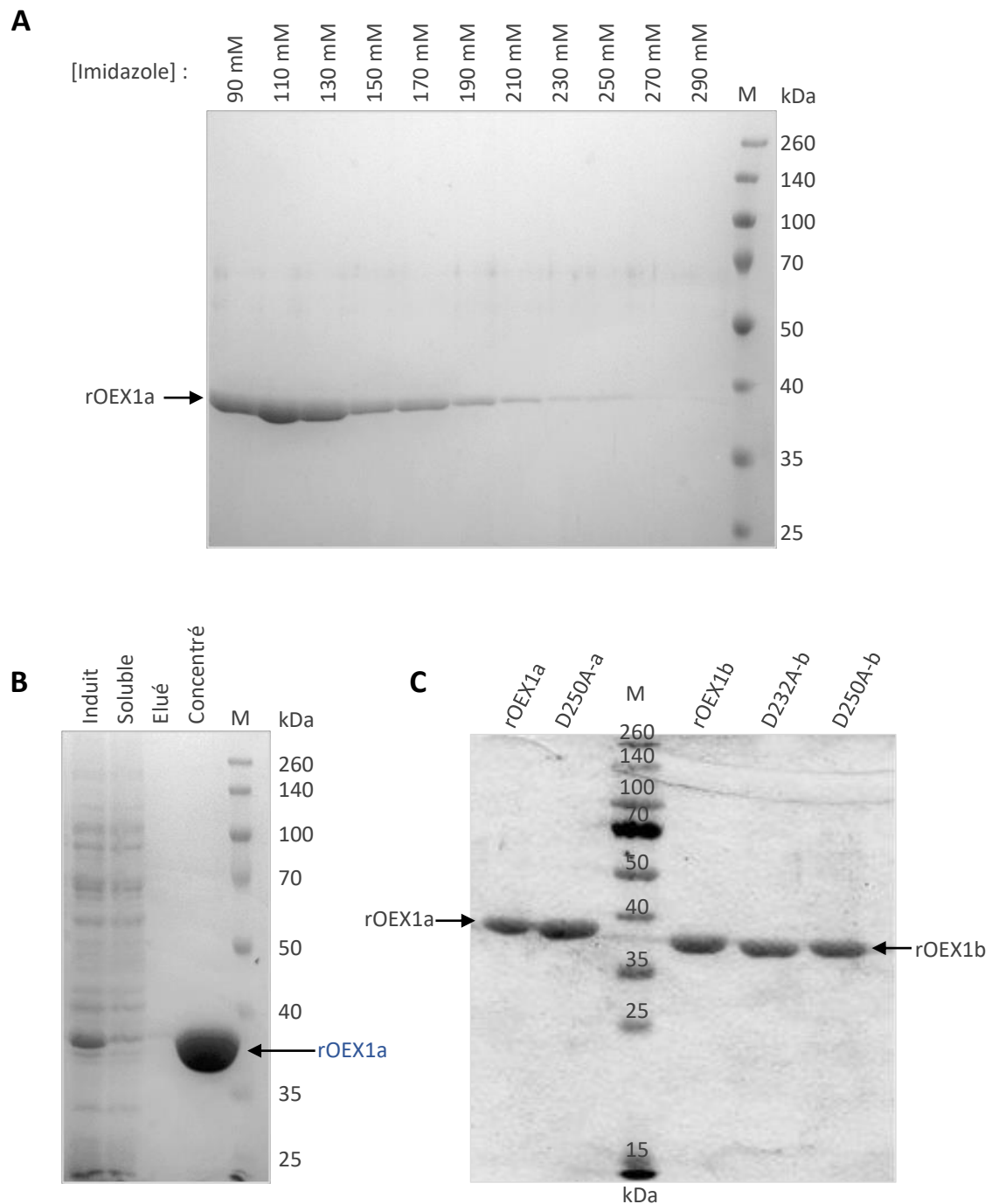


Figure R21. Analyse sur gel de polyacrylamide des protéines rOEX1 purifiées.

Gels SDS-PAGE effectués à différentes étapes de la purification des protéines en vue de tests d'activité. **(A)** Fractions prélevées lors de l'élution de la colonne de Ni-NTA agarose par "step-gradient" d'imidazole. **(B)** Protéines contenues dans les échantillons non-induit, induit, soluble, élué de la colonne de Ni-NTA agarose et protéine concentrée. **(C)** Protéines purifiées rOEX1a, rOEX1b et leurs mutants catalytiques D250A-a, D232A-b et D250A-b.

M : marqueur de poids moléculaire.

III.1.c Purification de protéines recombinantes pour les tests d'activité

La méthode de purification utilisée pour les tests d'activité diffère légèrement de celle décrite précédemment. Une culture de 250 mL de bactéries induites à l'IPTG sont sédimentées par centrifugation. Le culot est repris dans 30 mL de tampon de lyse puis lysées à l'aide du Microfluidizer LM20-30 (Microfluidics™). Le Lysat complétement de 25 mM d'imidazole est ensuite déposé sur une colonne (Bio-Rad Poly-Prep® chromatography columns) contenant 200 µL de résine cOmplete™ His-Tag Purification Resin (Roche®, Bâle, Suisse). Cette résine lie de manière spécifique les étiquettes de poly-histidine. Le chargement, les lavages et l'élution des colonnes se font par gravité. L'ajout d'imidazole (25 mM) au lysat réduit la fixation de protéines non-spécifiques, ce qui nous permet d'avoir moins de contaminants dans l'extrait final. Après des lavages à 30 et 50 mM d'imidazole, les protéines sont éluées à des concentrations croissantes (de 90 mM à 310 mM) en imidazole.

Chaque fraction ainsi que les extraits de cultures induites et non-induites sont analysés par électrophorèse sur gel SDS-PAGE et coloration au bleu de Coomassie afin de contrôler l'expression, la solubilité et la pureté de la protéine (Figure R21A et B). Les fractions contenant le plus de protéine et ne présentant pas de bandes contaminantes sont regroupées. La concentration en protéine est ensuite évaluée au NanoDrop de façon plus précise grâce au coefficient d'extinction molaire déterminé *in silico* à l'aide du programme ProtParam disponible sur le site Expasy (<https://web.expasy.org/>) (27390 pour rOEX1a et 24410 pour rOEX1b). L'éluat est ensuite dialysé dans 2 litres de tampon de lyse afin d'éliminer au maximum l'imidazole, ce dernier pouvant éventuellement interférer avec les tests d'activité.

Les rendements et pureté des protéines extraites sont évalués par SDS-PAGE (Figure 21C). La taille attendue est de 37,1 kDa pour rOEX1a et ses mutants catalytiques et de 35,3 kDa pour rOEX1b et ses mutants. La coloration du gel au bleu de Coomassie nous permet de constater que les protéines recombinantes sont pures et libres de contaminants détectables.

III.2 Tests d'activité de rOEX1 sur différentes structures d'ADN

Afin de déterminer si rOEX1 est bien une nucléase et quelles structures d'acide nucléique elle peut reconnaître, nous avons effectué une série de tests d'activité *in vitro*. Pour ces tests, les substrats sont marqués radioactivement puis mis en présence de la protéine. Dans nos expériences, ces substrats sont des acides nucléiques qui diffèrent par leur structure ou par

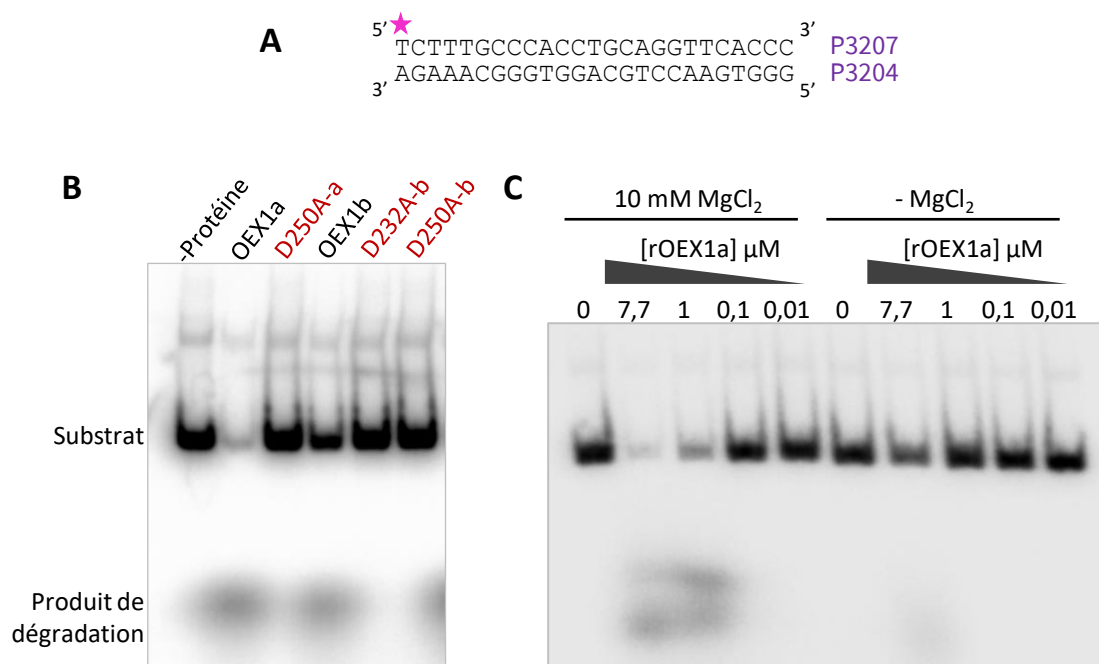


Figure R22. Tests d'activité sur de l'ADN double brin marqué en 5'.

(A) Séquence d'ADN double brin utilisée pour ces tests. Le nucléotide radiomarqué est indiqué par l'étoile. (B) Tests d'activité sur l'ADN double brin à pH 8, en présence de 10 mM de MgCl₂ et 1,5 μM d'enzyme. La réaction a eu lieu à 25 °C pendant 30 min. (C) Tests d'activité sur de l'ADN double brin avec et sans MgCl₂ à pH 8 et à concentration variable en enzyme rOEX1a. La réaction a lieu à 25°C pendant 30 minutes.

rOEX1a, rOEX1b, D250A-a, D232A-b et D250A-b : protéines purifiées et mutants catalytiques.

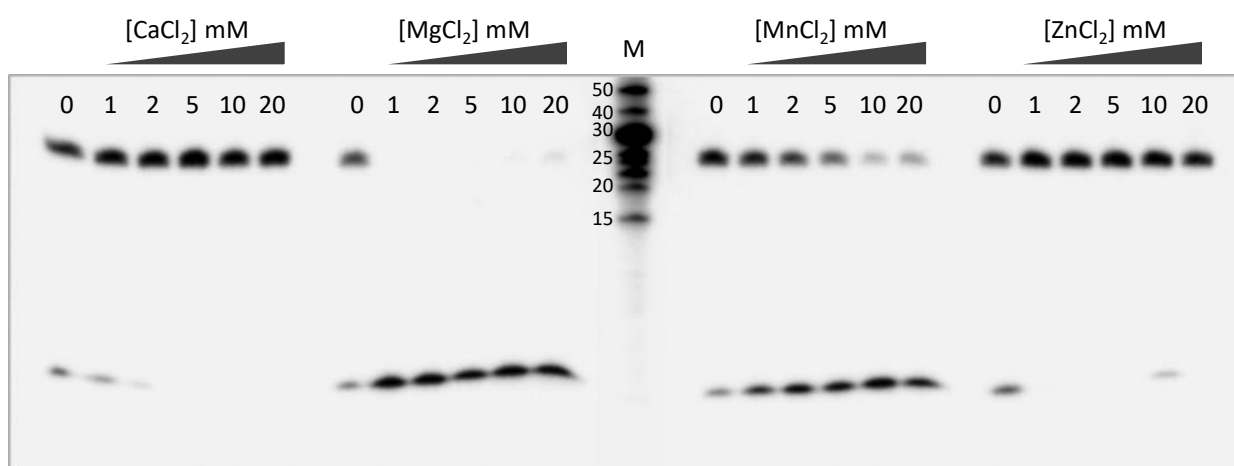


Figure R23. Tests d'activité sur de l'ADN double brin marqué en 5'.

Tests d'activité sur de l'ADN double brin à pH 8, à une température de 37 °C pendant 3 minutes avec 1,5 μM d'enzyme et des concentrations croissantes en différents ions bivalents (CaCl₂, MgCl₂, MnCl₂ ou ZnCl₂).

M : marqueur de taille moléculaire en nucléotides. Lors de sa charge, il a été mal dosé, sa bande a donc été traitée différemment que le reste de l'image.

leur séquence. Sauf précision contraire, les tests ont tous été effectués avec 1,5 μ M de protéines rOEX1 et la réaction a été réalisée à température contrôlée. Les produits de dégradation sont analysés après électrophorèse en gel de polyacrylamide natif ou dénaturant. La révélation des gels est réalisée par exposition contre une plaque de Phosphorimager durant une nuit à -80 °C, avant révélation au Typhoon (Méthode décrite VIII.7)

III.2.a. Primo-résultats et optimisation des conditions

L'ADN polymérase I bactérienne possède un domaine avec une activité 5'-3' exonucléase sur l'ADN double brin. La protéine OEX1 étant similaire à ce domaine, nous avons réalisé une première série de tests avec un ADN double-brin (ADNdb) comme substrat (Figure R22A). Dans un premier temps, nous avons testé l'activité de rOEX1a, rOEX1b et des mutants catalytiques correspondants. Les protéines ont été incubées 30 min à 25 °C avec leur substrat en présence de 10 mM de magnésium, un ion bivalent métallique nécessaire pour nombreuses activités nucléases (Dupureur, 2008). Après analyse sur gel de polyacrylamide natif, les résultats montrent une activité de dégradation de l'ADNdb par les deux isoformes de OEX1 (Figure R22B). La protéine rOEX1b montre une activité plus faible que rOEX1, et aucune activité nucléase a été détectée pour les mutants catalytiques. Une autre expérience réalisée avec différentes concentrations d'enzyme en présence et en absence de $MgCl_2$ a montré que l'activité est bien fonction de la concentration d'enzyme, et que l'ion divalent est nécessaire pour l'activité (Figure R22C).

Pour la suite, les analyses ont été réalisées en gel de polyacrylamide dénaturant afin d'augmenter la résolution du gel et permettre d'estimer la taille des produits de dégradation grâce à la migration en parallèle d'un marqueur de taille moléculaire réalisé par radiomarquage d'un mélange d'oligonucléotides de tailles choisies. Pour ceci, les échantillons sont chauffés à 98 °C durant 2 minutes avant d'être soumis à analyse sur gel de polyacrylamide (19 :1) 17 % contenant 7 M d'urée.

Nous avons ensuite testé la nature de l'ion divalent utilisé comme co-facteur, et essayé l'activité de rOEX1 en présence de calcium ($CaCl_2$), magnésium ($MgCl_2$), manganèse ($MnCl_2$) ou zinc ($ZnCl_2$). Pour chaque ion bivalent, des concentrations allant de 0 à 20 mM ont été testées. Comme le montre la Figure R23, rOEX1 est la plus active en présence de magnésium, quelle que soit la concentration testée. L'ion manganèse semble également pouvoir être

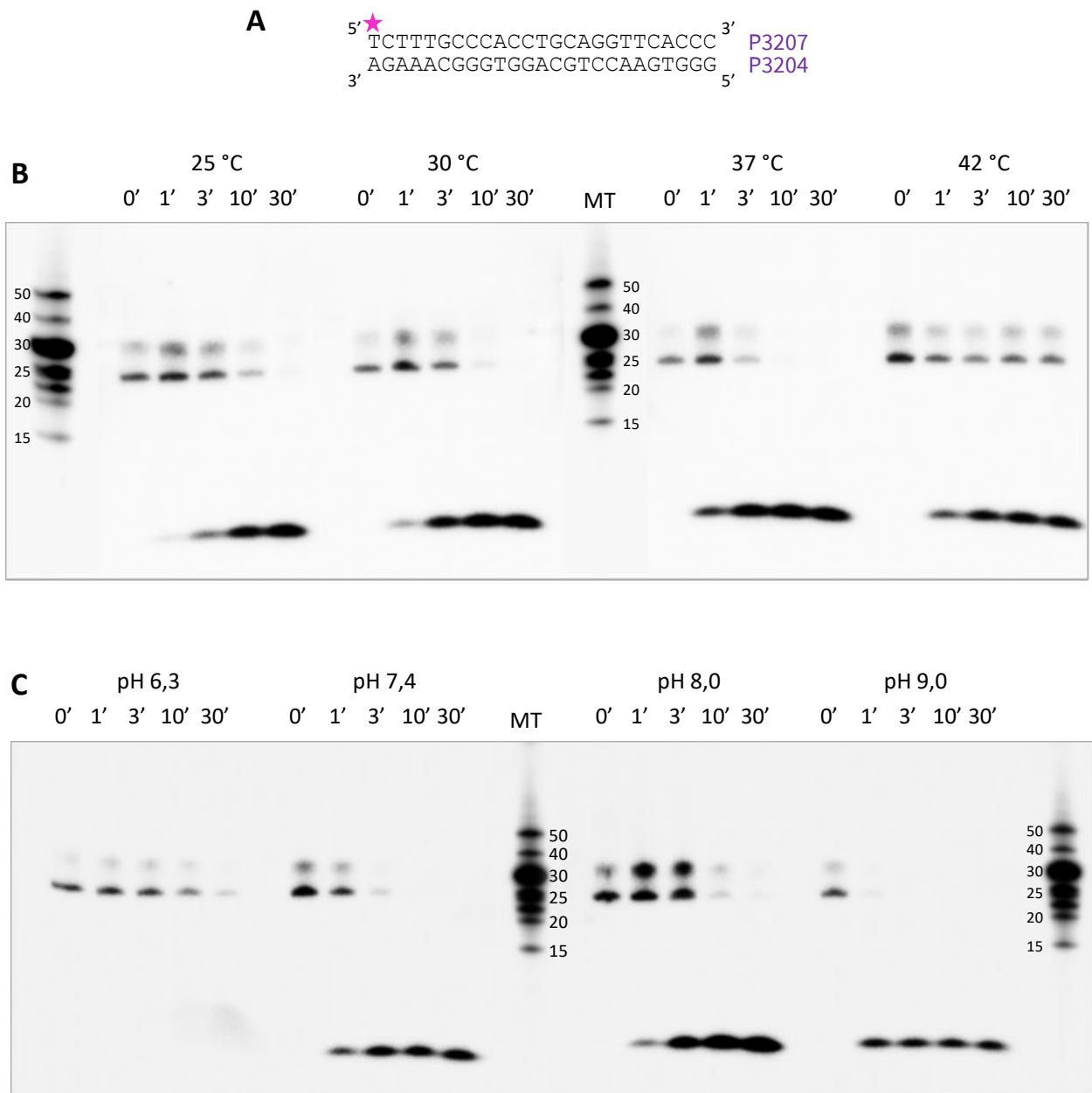


Figure R24. Optimisation des conditions de test d'activité sur l'ADN double brin.

(A) Séquence d'ADN double brin utilisée pour ces tests. Le nucléotide radiomarké est indiqué par l'étoile en magenta. (B) Tests d'activité dans le but de déterminer la température de réaction optimale pour rOEX1a. Les réactions ont lieu à pH 8 à 25, 30, 37 ou 42 °C en présence de 2 mM MgCl₂ et 1,5 µM d'enzyme. Les réactions sont stoppées à 0, 1, 3, 10 et 30 min. (C) Tests d'activité dans le but de déterminer le pH optimal pour l'activité de rOEX1a. Les réactions ont lieu à 37 °C et à pH variable (indiqué), en présence de 2 mM MgCl₂ et 1,5 µM d'enzyme.

M : Marqueur de taille moléculaire en nucléotides. Son image a été traitée différemment afin d'avoir un même niveau d'exposition.

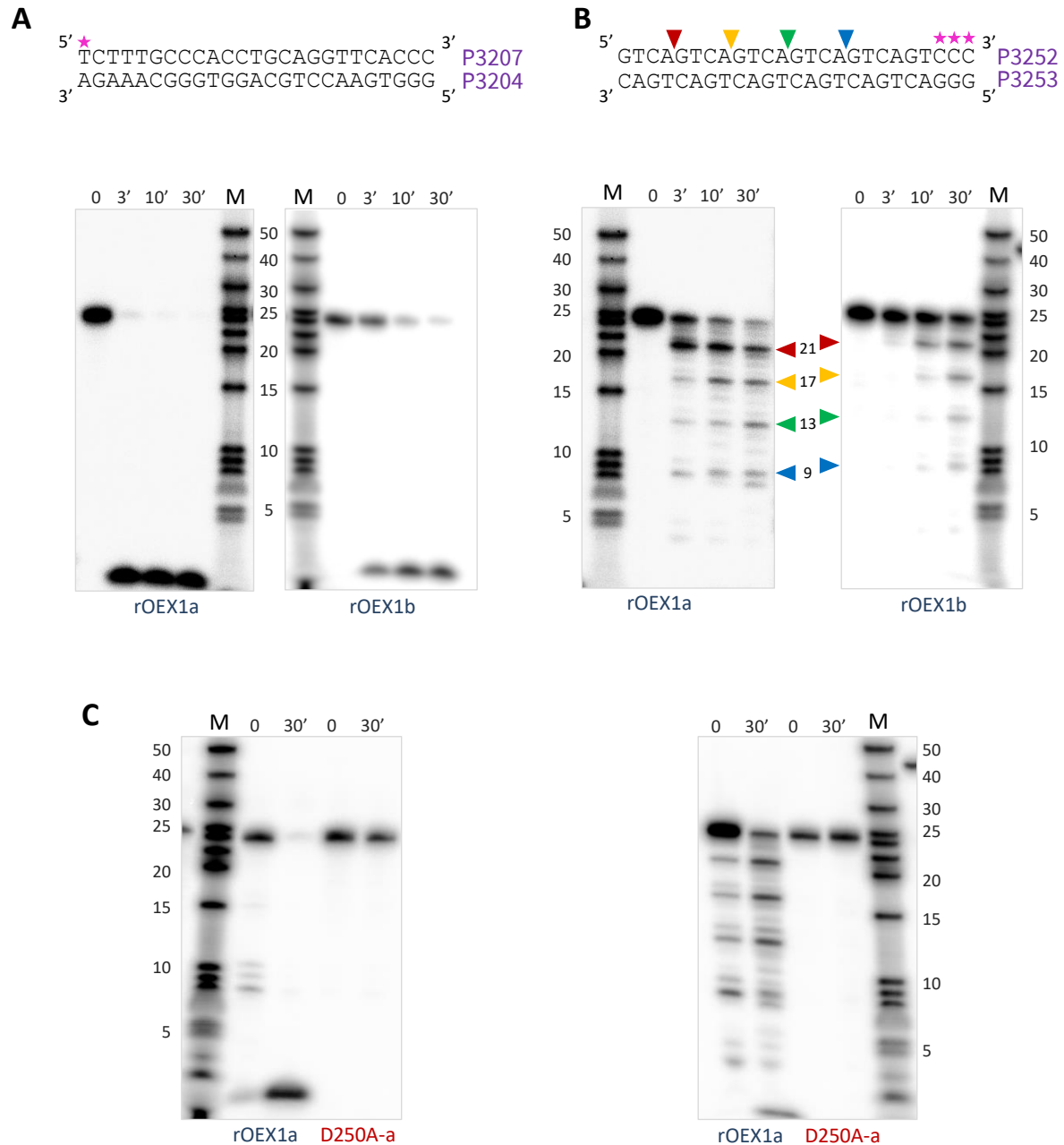


Figure R25. Tests de l'activité de rOEX1 sur l'ADN double brin.

Les tests d'activité sont menés à pH 8 en présence de 2 mM MgCl_2 et 1,5 μM d'enzyme. Les réactions ont été stoppées aux temps indiqués. **(A et B)** Tests d'activité sur la structure présentée au-dessus avec soit rOEX1a soit rOEX1b. Les substrats sont marqués soit en 5' **(A)**, soit en 3' **(B)**. Les positions de coupure sont indiquées par des triangles sur l'image du gel et sur la séquence correspondante. **(C)** Tests d'activité avec le substrat marqué soit en 5' (gauche) soit en 3' (droite) afin de comparer l'activité de rOEX1a avec celle du mutant catalytique D250A-a. M : Marqueur de taille moléculaire en nucléotides.

utilisé par la protéine mais les concentrations nécessaires sont plus élevées (clivage du substrat important à partir de 10 mM). Le zinc et le calcium en revanche semblent inhiber l'activité de la protéine OEX1, car on observe plus de dégradation en absence de l'ion qu'en présence de celui-ci. Pour la suite des expériences nous avons réalisé nos tests avec une concentration de 2 mM de $MgCl_2$.

Nous avons ensuite fait varier deux paramètres afin de déterminer les conditions optimales de test : la température et le pH du milieu réactionnel. Une cinétique allant de 0 à 30 minutes dans un tampon à pH 8 contenant 2 mM de $MgCl_2$ a été réalisée à des températures comprises entre 25 °C et 42 °C. A 25 °C et 30 °C on observe une dégradation complète du substrat au bout de 10 minutes. A 37 °C la totalité du substrat est dégradée au bout de seulement 3 minutes, alors que l'incubation à 42 °C ralentit clairement l'activité de la protéine, puisque même après 30 minutes on n'observe pas de complète dégradation du substrat (Figure R24B). Une température de 37 °C semble donc optimale pour la suite de nos expériences.

Pour tester l'influence du pH sur l'activité enzymatique, les réactions ont été menées à 37 °C avec des tampons allant de pH 6,3 à pH 9 et en présence de 2 mM de $MgCl_2$. Les résultats montrent que l'activité la plus importante est obtenue à pH 9, où le substrat est pratiquement totalement dégradé en 1 minute (Figure R24C). Cependant, pour rester dans des conditions plus physiologiques, nous avons choisi de conserver le tampon à pH 8 qui est aussi le pH dans la matrice des mitochondries (Shen et al., 2013).

III.2.b Caractérisation de l'activité 5'-3' exonucléase

Les conditions optimales de réaction étant déterminées et un marqueur de taille moléculaire ayant été mis au point, nous avons commencé par caractériser l'activité de rOEX1 sur l'ADN double brin grâce à des cinétiques. L'hybridation des deux brins a été vérifiée au préalable par migration en gel de polyacrylamide non-dénaturant et comparaison avec la même séquence simple brin. Après incubation, on observe la dégradation rapide du substrat et la libération d'un produit de taille inférieure à 5 nucléotides, autant avec rOEX1a qu'avec rOEX1b (Figure R25A). Ce résultat montre que le nucléotide se trouvant en 5' et qui porte le phosphate radioactif est rapidement clivé, indicatif d'une activité 5'-3' exonucléase. On note également que rOEX1b est moins processive que OEX1a, et cela est particulièrement visible au temps 3 minutes pour lequel environ 25 % du substrat est dégradé par rOEX1b alors que rOEX1a a

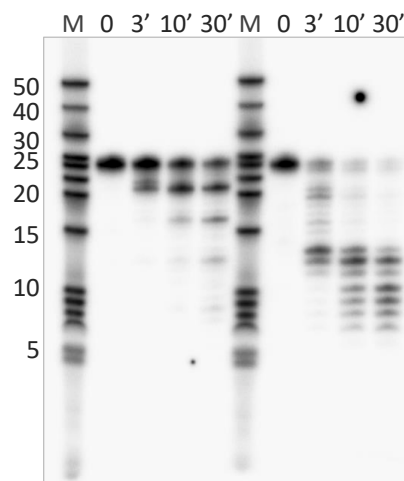
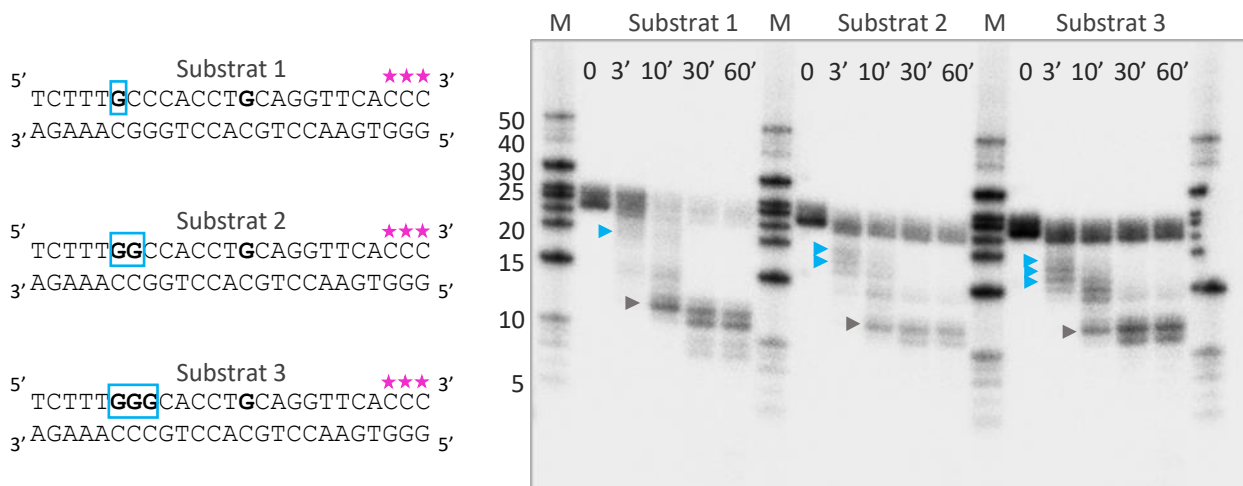
A**B**

Figure R26. Tests d'activité de OEX1a sur différentes séquences d'ADN double brin.

Les tests d'activité de rOEX1a sur les ADN double brin présentés ont été menés à pH 8,0 en présence de 2 mM $MgCl_2$ et 1,5 μM d'enzyme. Les réactions ont été stoppées à 0, 3, 10 et 30 min. Les étoiles en magenta indiquent les nucléotides radiomarqués. **(A)** Tests d'activité sur deux séquences d'ADN double brins différentes. **(B)** Tests d'activité sur trois substrats qui diffèrent par la présence de 1, 2 ou 3 guanines (encadré bleu). Les positions des coupures au niveau des G encadrés sur la séquence sont indiquées par des triangles sur le gel.

M : marqueur de taille moléculaire en nucléotides.

dégradé près de 90% du substrat dans le même temps. Le test a aussi été réalisé avec le mutant catalytique D250A-a de rOEX1 et aucune activité nucléase n'est détectée, même après 30 minutes d'incubation. Pour avoir plus d'informations sur l'activité 5'-3' exonucléase de rOEX1, nous avons réalisé la même cinétique avec un substrat marqué en 3'. On observe un pattern de dégradation en "échelle" caractéristique d'une dégradation progressive du brin radiomarké (Figure R25B). Ces résultats confirment une activité 5'-3' exonucléase de type distributive et une activité plus faible pour rOEX1b que pour rOEX1a. Ils permettent également de mettre en évidence que la dégradation n'est pas uniforme car OEX1 semble ralentir toutes les 4 bases environ (dans le cas présent il faut remarquer que la séquence du substrat est 5xGTCA, ce qu'explique la périodicité des produits intermédiaires de dégradation). Enfin, aucune activité du mutant catalytique n'a été observée non plus sur le substrat marqué en 3' (Figure R25C), prouvant que l'activité enzymatique observée est dû à rOEX1 et non à une enzyme contaminante.

Lors de la dégradation du substrat marqué en 3', l'activité de rOEX1 semble ralentie devant les guanosines. Afin de vérifier cela, nous avons marqué en 3' deux 25-mer double brin différents a et b (Figure R26A). On remarque que les deux substrats présentent des schémas de dégradation différents. Pour le premier (**a.**), rOEX1 semble pauser tous les 4 nucléotides environ, alors que pour la seconde séquence (**b.**) la dégradation progresse de façon plus homogène mais ralentie devant les 13 derniers nucléotides. Par comparaison au marqueur de taille moléculaire et en comparant à la séquence, il semble que rOEX1 pause devant les guanines. Pour le confirmer, nous avons généré trois substrats double brin marqués en 3' et qui contiennent soit 1 G en position 6, soit 2 G en position 6 et 7, soit 3 G en position 6, 7 et 8 (Figure R26B). L'enzyme utilisée pour ce test a été rOEX1a car elle est la plus efficace. L'emplacement virtuel des G, mis en évidence en vert dans la séquence, est indiqué par des flèches de même couleur sur le gel. On remarque 2 et 3 bandes plus fortes pour les séquences comprenant 2 et 3 G respectivement et il ne semble pas y avoir de bande significative pour la séquence ne comprenant que 1 G. De plus, on remarque deux bandes plus fortes en position 18/19 (flèches grises) qui correspondent à une guanosine présente dans toutes les séquences. On peut donc affirmer que la processivité de OEX1 est dépendante de la séquence et qu'elle est ralentie par les G.

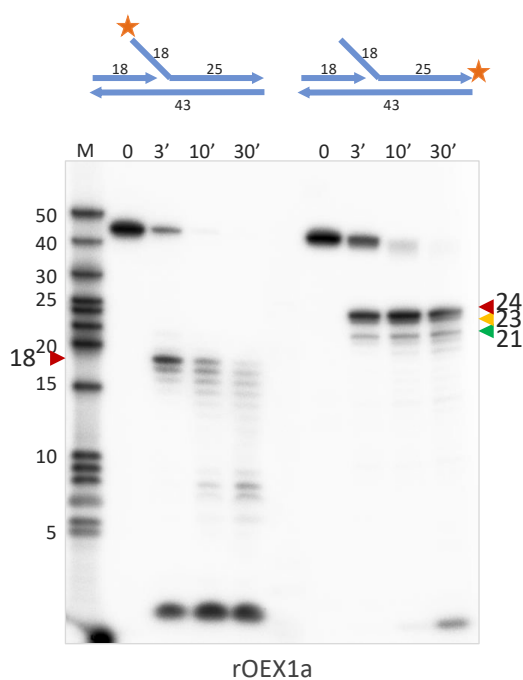
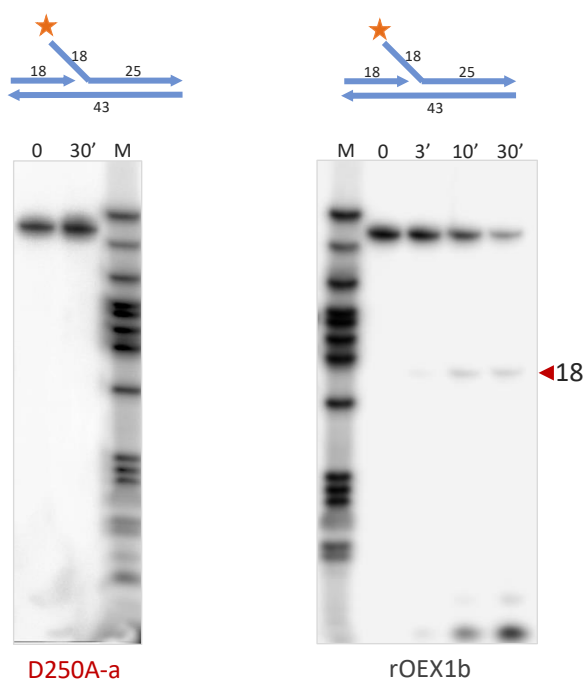
A**B****C**

Figure R27. Tests de l'activité de rOEX1 sur une structure de type flap en 5'.

(A) Séquences et structures des substrats testés. Les nucléotides radiomarqués sont indiqués par des étoiles. (B, C) Tests d'activité de rOEX1a et du mutant catalytique D250A-a ou de rOEX1b (C) sur la structure de type flap, radiomarquée en 5' ou en 3'. Les schémas représentant les structures testées sont indiquées au-dessus des pistes du gel, l'étoile montre la position du marquage. Les tests sont menés à pH 8 en présence de 2 mM MgCl₂ et 1,5 μM d'enzyme. Les réactions sont stoppées aux temps indiqués. Les triangles représentant les positions de clivage sont reportées sur les séquences. M : marqueur de taille en nucléotides.

III.2.c Activité de rOEX1 sur des substrats de type flap

Parmi les nucléases essentielles à la maintenance du génome on retrouve les flap-endonucléases. Leur activité est nécessaire dans des mécanismes comme la réparation par excision de base (BER) (Balakrishnan and Bambara, 2013b), la résolution d'intermédiaires de recombinaison ainsi que dans la maturation des fragments d'Okazaki dont la section simple brin est composée d'ARN (Balakrishnan and Bambara, 2013a). Dans la majeure partie des organismes cette activité est portée par la Flap EndoNuclease 1 FEN1 ou ses homologues fonctionnels, comme l'ADN polymérase I (Robins et al., 1994) et EXO IX (Anstey-Gilbert et al., 2013) chez les bactéries ; RAD27 chez la levure (Ohnishi et al., 2004) ou encore gp6 chez le bactériophage T7 (Mitsunobu et al., 2014a).

Nous avons voulu tester si OEX1 était capable de reconnaître et de cliver une structure de type flap. Pour cela nous avons généré un substrat mimant cette structure par hybridation de trois oligonucléotides, comme présenté en Figure R27A. Leur hybridation a été contrôlée par migration sur gel de polyacrylamide non-dénaturant et comparaison avec de l'ADN simple brin et double brin. Afin de caractériser au mieux l'activité de OEX1 sur cette structure, nous avons marqué, en 5' ou en 3', le brin ayant les 18 nucléotides de sa partie 5' non-hybridée et les 25 autres nucléotides hybridés. Des cinétiques de l'activité ont été réalisées et les produits des réactions analysés sur gel de polyacrylamide dénaturant, comme décrit précédemment. Les gels sont présentés en figure R27B. Pour le substrat marqué en 5', dès 3 minutes d'incubation on observe une rapide diminution du substrat intact et l'apparition d'un fragment de 18 nucléotides de long, correspondant à une activité flap-endonucléase. On remarque également une bande de moins de 5 nucléotides pouvant résulter d'une activité 5'-3' exonucléase sur le simple brin issu de la coupure précédente. La cinétique effectuée avec le substrat marqué en 3' nous permet confirmer qu'il s'agit bien d'une activité endonucléase. Comme le montre la Figure R27B, on observe un premier fragment de 24 nucléotides sans trace de fragment de taille intermédiaire. Une activité 5'-3' exonucléase sur le fragment simple brin antérieurement à l'activité flap-endonuclease aurait engendré des produits de dégradation allant de 43 à 25 nucléotides. Tous ces résultats nous montrent que rOEX1 possède une activité flap-endonucléase sur des structures flap en 5'. La protéine semble aussi dégrader l'ADN simple brin qui résulte du clivage. L'expérience réalisée avec le mutant catalytique D250A-a confirme que l'activité observée ne provient pas d'un contaminant.

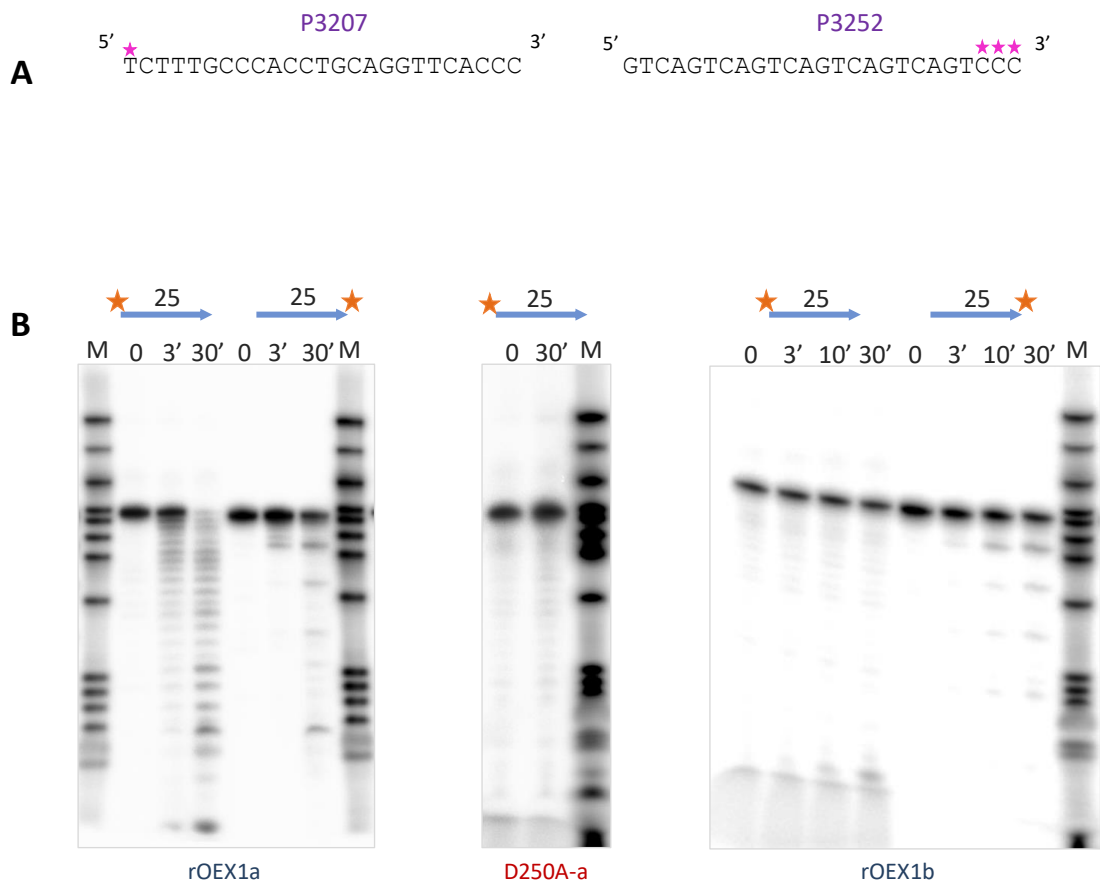


Figure R28. Test de l'activité de rOEX1 sur de l'ADN simple brin.

Les tests d'activité ont été menés à pH 8 en présence de 2 mM de MgCl_2 et de 1,5 μM d'enzyme. Les réactions ont été stoppées aux temps indiqués. **(A)** Séquences d'ADN simple brin testées, marquées en 5' ou en 3'. Les nucléotides radiomarqués sont indiqués par des étoiles.

(B, C) Tests d'activité sur l'ADN simple brin en présence de rOEX1a et de son mutant catalytique D250A-a **(B)** ou de rOEX1b **(C)**. Les schémas représentant les structures testées sont indiquées au-dessus des pistes du gel, l'étoile montre la position du marquage.

M : marqueur de taille moléculaire en nucléotides

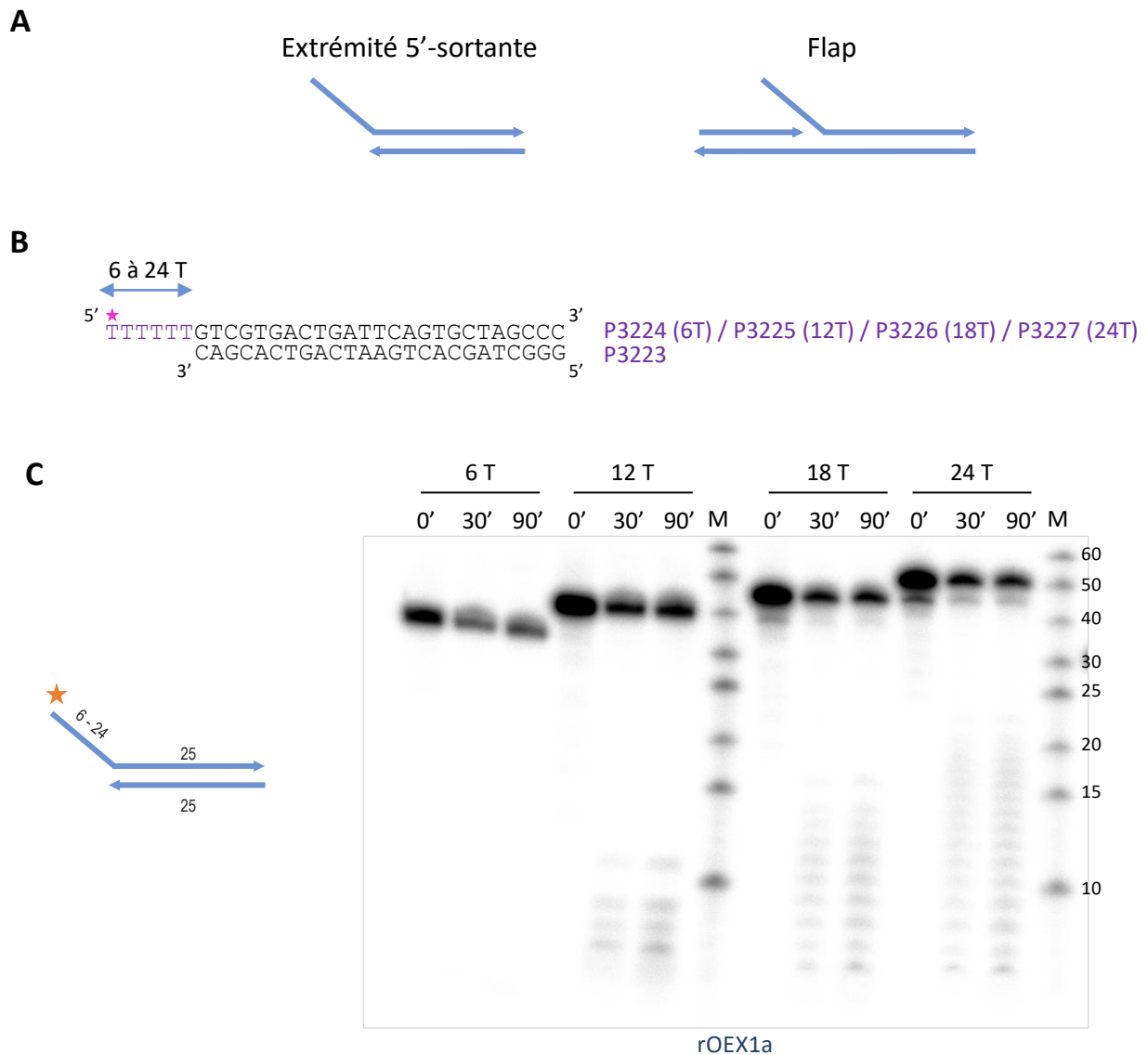


Figure R29. Test de l'activité de rOEX1a sur une extrémité 5'-sortant.

(A) Représentation schématique de la structure extrémité 5'-sortante et de la structure flap testée précédemment. (B) Séquence et structure des substrats utilisés. Le nucléotide radiomarqué est indiqué par une étoile. (C) Tests d'activité menés à pH 8 en présence de 2 mM de $MgCl_2$ et de 1,5 μM d'enzyme rOEX1a. Les réactions ont été stoppées à 0, 30 et 90 minutes. M : marqueur de taille moléculaire en nucléotides.

L'activité flap-endonucléase a également été testée avec rOEX1b, ce qui a montré que celle-ci reconnaît aussi les structures flap, mais qu'elle a une activité plus faible que rOEX1a pour la même concentration d'enzyme et le même temps de réaction (Figure R27C).

Ces résultats nous mènent vers un possible rôle de OEX1 dans la réparation par résolution d'intermédiaires de recombinaison et dans la voie du long patch du BER. Le BER et la recombinaison homologue étant les deux seuls mécanismes de réparation dont la présence dans la mitochondrie végétale a été démontrée. Une implication dans ces mécanismes pourrait expliquer le phénotype des mutants *oex1*.

III.2.d Activité de rOEX1 sur de l'ADN simple brin

Les résultats obtenus pour les structures de type flap montraient une dégradation de l'ADN simple brin généré après clivage. Afin de vérifier cette activité, nous avons marqué un 25-mer simple brin en 5' ou en 3' (Figure R28A). Les cinétiques ont été arrêtées à 3 et 30 minutes. Comme le montre la figure R27B, nous observons bien une dégradation de l'ADN simple brin, avec un profil de dégradation en échelle quelque que soit la position du marquage. rOEX1a serait donc capable de dégrader l'ADN simple brin de 5' en 3' ainsi que de 3' en 5'. L'activité est cependant bien moindre que pour les autres substrats testés, car après 30 minutes la totalité du substrat n'est toujours pas dégradée. Les résultats obtenus avec rOEX1b sont similaires mais on observe toujours moins d'activité spécifique qu'avec rOEX1a (Figure R28B). Les tests avec le mutant catalytique confirment que l'activité ne semble pas provenir d'un contaminant (Figure R28B). Bien que la faible activité sur l'ADN simple brin ait été montrée *in vitro*, il est possible qu'elle n'ait pas lieu *in vivo* et que ce résultat n'ait pas d'importance biologique. En effet, le milieu de réaction est optimisé avec une forte concentration en $MgCl_2$ et l'ADN simple brin est l'unique substrat mis à disposition.

III.2.e Activité de rOEX1 sur un ADN double brin possédant une extrémité 5'-sortante

Ce substrat a été généré par marquage d'un oligonucléotide en 5' suivi d'une hybridation à un oligonucléotide recouvrant partiellement la séquence. La partie simple brin de la structure est composée de 6, 12, 18 ou 24 thymidines en 5' afin d'éviter la formation de structures secondaires (Figure R29B). La réaction a été stoppée à 30 et 90 minutes. Les résultats sont présentés dans la figure R29C. On n'observe pas de coupure nette au niveau de la limite entre

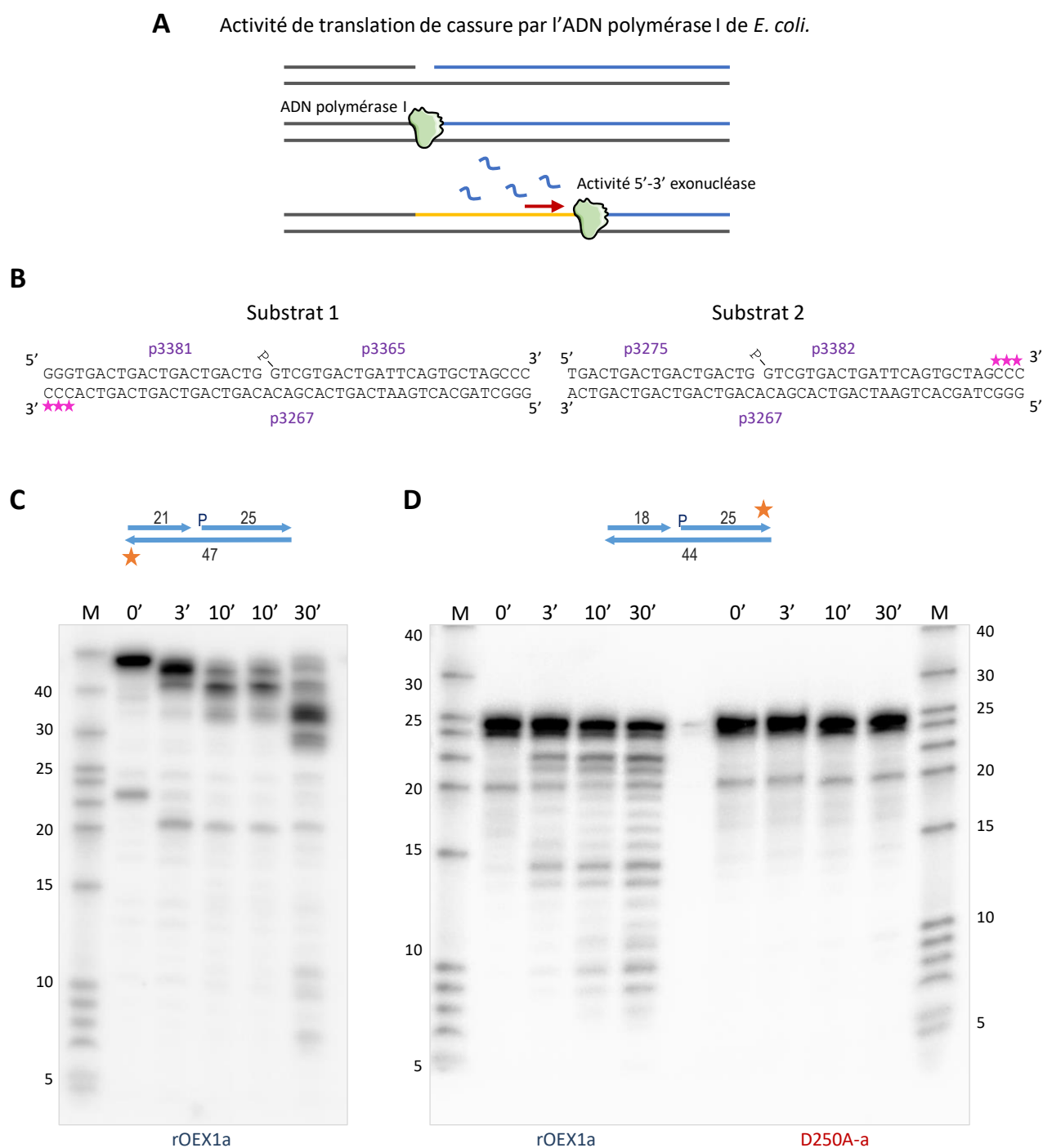


Figure R30. Test de l'activité de rOEX1a sur un gap simple brin dans l'ADN.

(A) Représentation schématique de l'activité de translation de cassure par l'ADN polymérase I.

(B) Séquences et structures des substrats utilisés dans les tests. Les nucléotides radiomarqués sont indiqués par une étoile. (C et D) Tests d'activité menés à pH 8 en présence de 2 mM de $MgCl_2$ et 1,5 μM d'enzyme. Les réactions sont stoppées aux temps indiqués.

M : marqueur de taille moléculaire en nucléotides.

le simple brin et le double brin, comme on a pu le voir pour la structure de type flap. On remarque cependant une activité endonucléase sur les substrats dont la partie simple brin est supérieure à 12 nucléotides. Le marquage étant en 5' de la molécule, le profil de dégradation en échelle est caractéristique d'une activité 3'-5' exonucléase, après une coupure endonucléase. Dans chaque cas, la première bande de dégradation se situe environ à la limite entre la partie double brin et simple brin. Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait que l'activité endonucléase est bien plus faible sur cette structure et, de ce fait, la partie simple brin générée est directement prise en charge par l'activité 3-5' exonucléase de rOEX1 sur l'ADN simple-brin.

III.2.f Extension d'un gap dans l'ADN par une activité 5'-3' exonucléase

L'ADN polymérase I bactérienne, grâce à une coopération entre ses activités 5'-3' exonucléase et ADN polymérase, est capable de réaliser une translation de coupure (ou déplacement de gap) (Bhardwaj et al., 2018). La protéine se fixe sur l'extrémité 3' OH de l'ADN en amont du gap, puis son domaine polymérase synthétise le brin manquant pendant que le domaine 5'-3' exonucléase dégrade le brin situé en aval du gap (Figure R30A).

Nous avons donc testé dans un premier temps si rOEX1 était capable de reconnaître un gap dans l'ADN et de l'étendre. Pour cela nous avons mimé ce type de structure par hybridation de trois oligonucléotides, de sorte à former une coupure simple brin d'un nucléotide. Les structures sont présentées en Figure R30B. Afin de vérifier que les trois oligonucléotides sont bien hybridés, une analyse sur gel de polyacrylamide non-dénaturant a été effectuée, et nous avons vérifié la taille par comparaison à la migration d'un ADN simple brin et à la migration de la structure intermédiaire comprenant seulement deux oligonucléotides. Comme nous avons montré que rOEX1 peut avoir une activité endonucléase sur des structures de type flap, nous avons vérifié dans un premier temps si elle peut créer une cassure double brin à la position du gap. Cela aurait faussé nos résultats car rOEX1 reconnaît et dégrade l'ADN double brin. Pour cela nous avons radiomarqué le substrat en 3', sur le brin complémentaire au gap et effectué une cinétique en regardant les produits formés à 0, 3, 10 et 30 minutes. Le résultat montre que l'activité majeure observée sur le gel est l'activité 5'-3' exonucléase sur le double brin (Figure 30C).

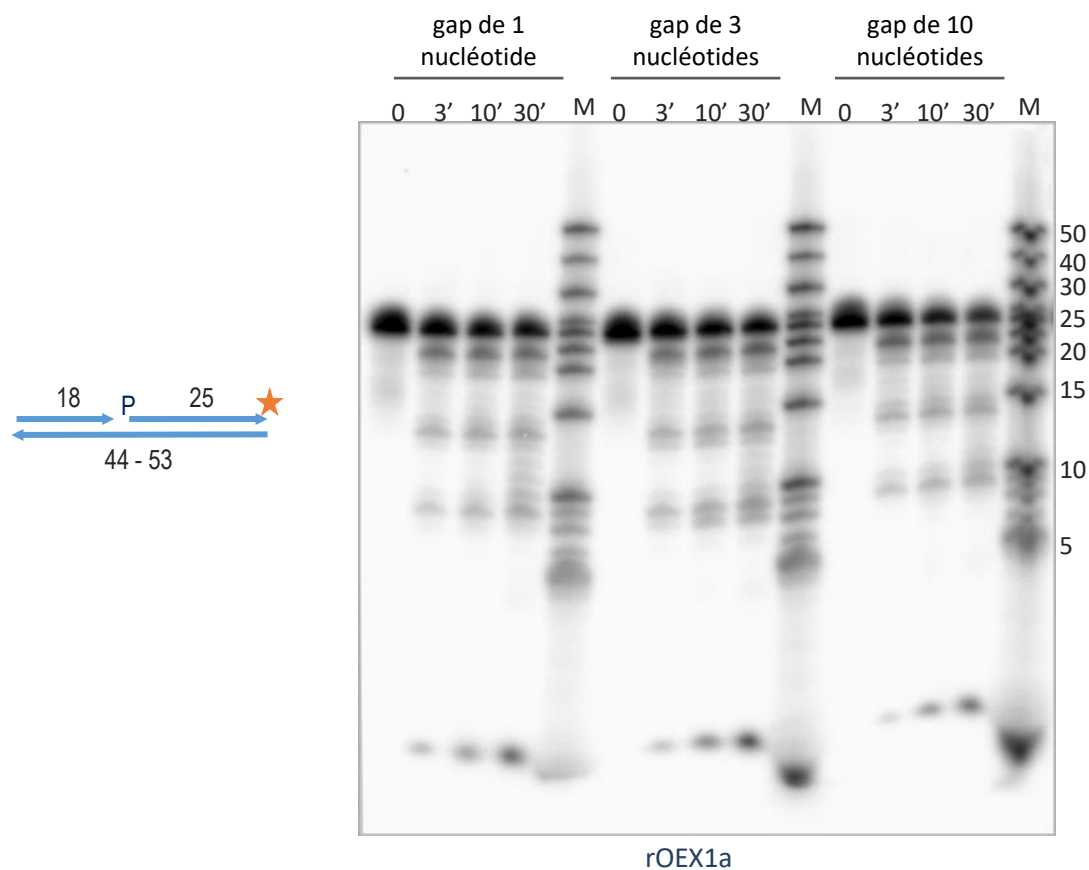


Figure R31. Tests de l'activité de rOEX1a sur des gaps de 1, 3 ou 10 nucléotides dans l'ADN.

Tests d'activité menés à pH 8 en présence de 2 mM de MgCl_2 et 1,5 μM d'enzyme. Les réactions sont stoppées aux temps indiqués et ont été menées en parallèle afin de pouvoir établir une comparaison pertinente. Le schéma de la structure testée est donné, l'étoile montre la position du marquage radioactif.

M : marqueur de taille moléculaire en nucléotides.

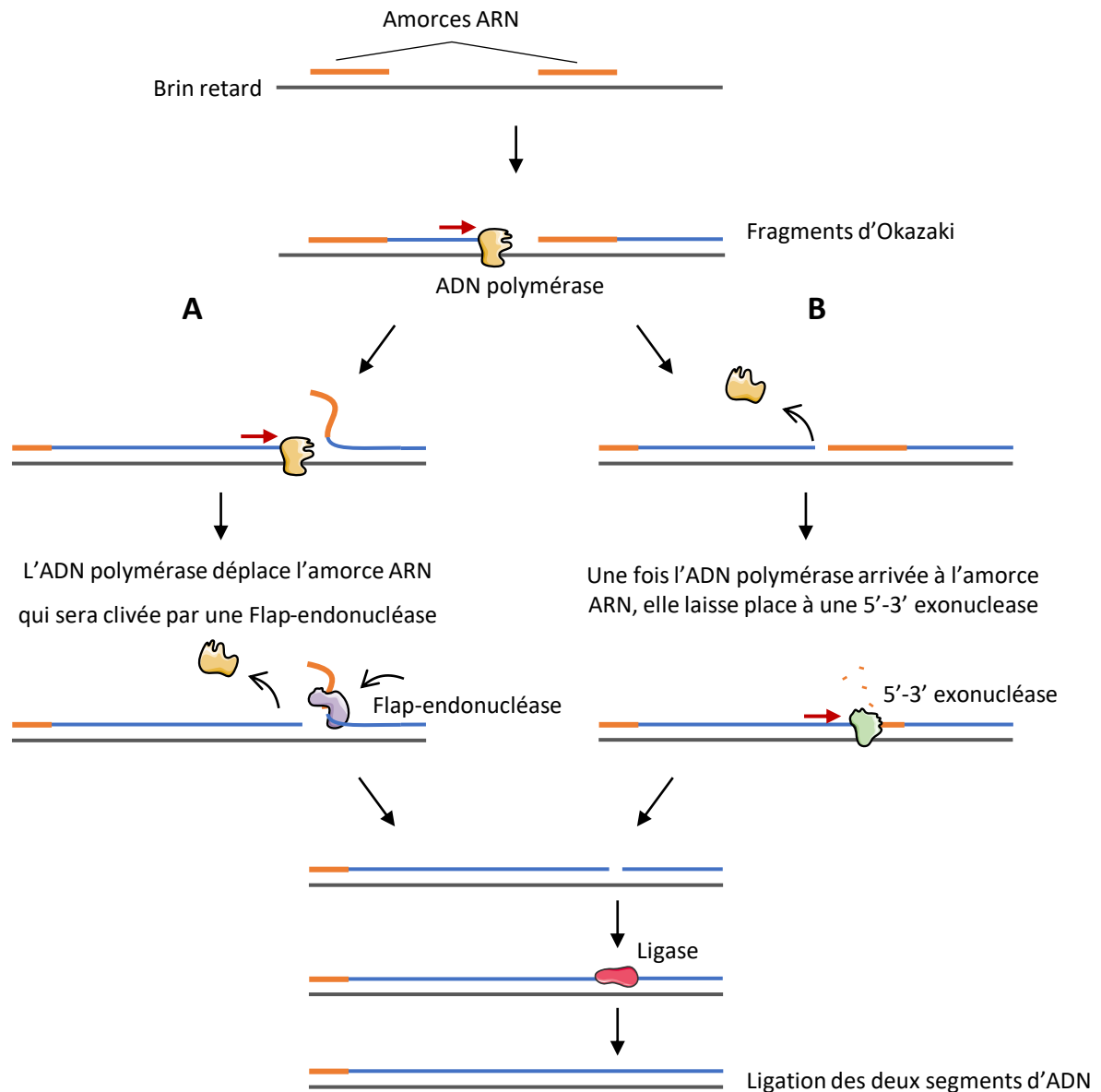


Figure R32. Mécanismes de maturation des fragments d'Okazaki.

Schéma simplifié des différents mécanismes de maturation des fragments d'Okazaki. Les facteurs impliqués diffèrent selon les espèces. Tout d'abord, l'ADN polymérase répliquative synthétise l'ADN complémentaire à partir des amorces ARN et lorsqu'elle rencontre l'amorce ARN suivante, on observe deux modèles majeurs. **(A)** L'ADN polymérase répliquative provoque un déplacement du brin ARN, générant ainsi une structure de type Flap. Une Flap-endonucléase est alors recrutée pour cliver le brin ARN et permettre la ligation des deux segments d'ADN par une ligase. **(B)** L'ADN polymérase répliquative se détache puis l'ADN polymérase I est recrutée pour dégrader l'ARN grâce à son activité 5'-3' exonucléase, et synthétiser l'ADN complémentaire grâce à son domaine polymérase. Une ligase est alors recrutée pour liguer les deux segments d'ADN.

Après avoir confirmé l'intégrité de la structure, nous avons testé le substrat marqué en 3' sur le brin contenant le gap. Sur le gel présenté en figure R30D, on observe une dégradation progressive du brin marqué de 5' vers 3'. La réaction est cependant moins efficace que sur une extrémité franche d'ADN double brin (Figure R25). L'expérience menée avec le mutant catalytique D250A-a n'a révélé aucune activité sur cette structure. Ces résultats suggèrent que OEX1 est capable de reconnaître un gap dans l'ADN et de l'étendre. Pour aller plus loin, nous avons voulu comparer l'activité de OEX1 sur 3 tailles de gaps différentes : 1, 3 et 10 nucléotides. Pour que les expériences soient comparables, la séquence du brin d'ADN radiomarké est la même dans les trois structures et les trois cinétiques ont été effectuées parallèlement afin de ne pas introduire de biais. Les résultats obtenus et présentés en figure R31 nous permettent de conclure que OEX1 est capable de reconnaître et d'étendre des gaps de 1 à 10 nucléotides. Cependant, le profil de dégradation est le même pour les trois structures, signifiant que l'activité n'est pas dépendante de la taille du gap.

III.3 Tests d'activité de rOEX1 sur différentes structures contenant de l'ARN

Compte tenu des activités observées jusqu'à présent chez rOEX1, nous pouvons émettre l'hypothèse que la protéine joue un rôle dans des mécanismes tels que la réparation par excision de base (BER) et la résolution d'intermédiaires de recombinaison. Son activité flap-endonucléase ainsi que sa capacité à étendre un gap nous oriente vers un possible rôle dans la maturation des fragments d'Okazaki. Deux modèles sont proposés dans la littérature pour l'élimination de l'amorce ARN et sont présentés schématiquement en figure R32. Dans un premier modèle, l'ADN polymérase synthétise le nouveau brin d'ADN complémentaire à partir d'une amorce ARN jusqu'à la suivante qu'elle va déplacer. Une structure de type flap est formée dans laquelle l'ARN est simple brin. Une flap-endonucléase est alors chargée de cliver ce brin non-hybridé puis une ligase est recrutée pour relier les deux fragments. Un second modèle propose la dégradation des fragments d'Okazaki par une activité 5'-3' exonucléase, puis l'ADN polymérase comble le gap avant qu'une ligase ne lie les fragments (Okazaki et al., 1971). Nous avons déjà testé l'activité de rOEX1 sur un substrat de type flap et avons montré qu'elle était capable de cliver ce type de structure. Il est également connu que l'ADN polymérase I est capable de dégrader des fragments d'ARN hybridés à l'ADN, notamment dans le cadre de mécanismes de "Ribonucleotide Excision Repair" (RER). OEX1

A



B

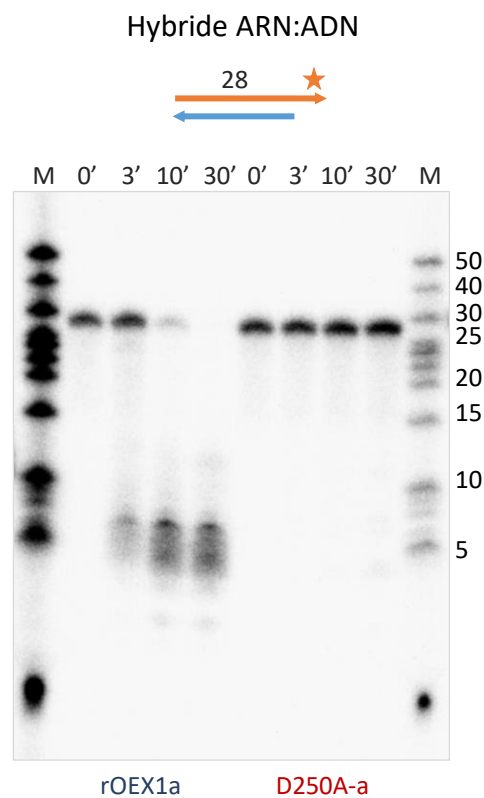


Figure R33. Test de l'activité de rOEX1a sur des hybrides ARN:ADN.

Tests d'activité menés à pH 8 en présence de 2 mM de MgCl_2 et 1,5 μM d'enzyme. Les réactions sont stoppées à 0, 3, 10 et 30 minutes. **(A)** Séquence du substrat hybride double brin utilisé lors des tests. La séquence d'ARN est indiquée en orange et la séquence d'ADN en noir, les nucléotides radiomarqués sont indiqués par des étoiles. **(B)** Test d'activité de rOEX1a et du mutant catalytique D250A-a sur hybride l'ARN:ADN double brin. M : marqueur de taille moléculaire en nucléotides.

A

CACCAACCACUCACCAACCACUCACUUU GTGGTTGGTGAGTGGTTGGTGAGTG	*** R27 P3491	P-TCTTTGCCCACCTGCAGGTTTCACCC AGAAACGGGTGGACGTCCAAGTGGG	*** P3203 P3204
---	------------------------------	---	--------------------------------

B

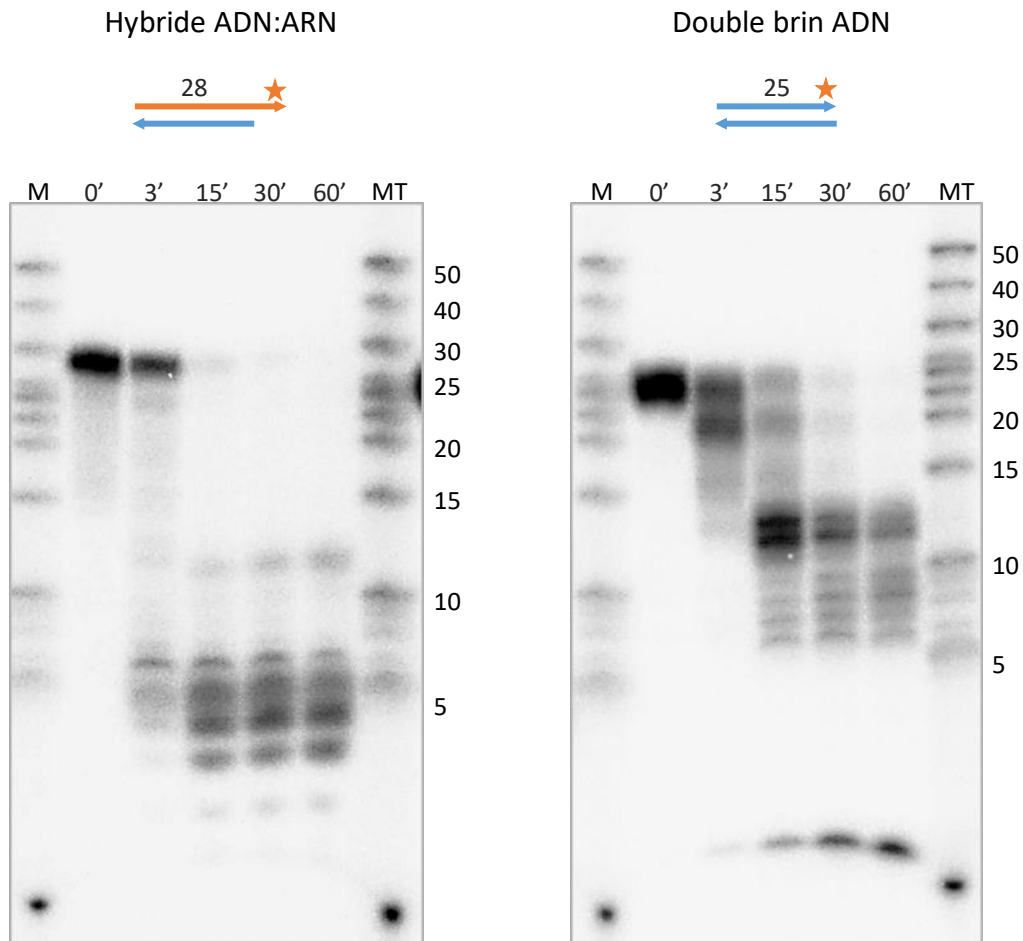


Figure R34. Comparaison de l'activité de rOEX1a sur ADN double brin et hybrides ARN:ADN.

Tests d'activité menés à pH 8 en présence de 2 mM de MgCl_2 et 1,5 μM d'enzyme. Les réactions sont stoppées aux temps indiqués. **(A)** Séquences de l'hybride ARN:ADN et de l'ADN double brin utilisées lors des tests. La séquence d'ARN est indiquée en orange et les nucléotides radiomarqués sont indiqués par des étoiles. **(B)** Tests d'activité réalisés sur les deux types de substrats afin de comparer la processivité de rOEX1a. M : marqueur de taille moléculaire en nucléotides.

étant homologue au domaine 5'-3' exonucléase de l'ADN Pol I, nous avons donc voulu tester sa capacité à dégrader l'ARN présent dans différentes structures.

A partir de ce point, nous avons mené la totalité des tests uniquement avec l'isoforme rOEX1a et son mutant catalytique. rOEX1b ne montrant jusque-là qu'une activité plus faible et l'ajout de conditions différentes aux tests d'activité demandant un temps non-négligeable nous avons décidé de nous concentrer sur rOEX1a. Ce choix nous a permis de tester plus de structures différentes dans le temps imparti pour ma thèse.

III.3.a Activité de rOEX1a sur des hybrides ADN:ARN

Dans un premier temps nous avons testé l'activité de rOEX1a sur un substrat double brin, un hybride ARN:ADN. Pour cela l'ARN a été radiomarké en 3' comme décrit dans le chapitre Méthodes en section VIII.3 puis hybridé à une séquence d'ADN complémentaire (Figure R33A). Les conditions expérimentales étaient les mêmes que celles utilisées avec les substrats ADN, avec une concentration d'enzyme de 1,5 μ M et en présence de $MgCl_2$ à 2 mM. Après analyse sur gel de polyacrylamide dénaturant, on observe une dégradation très rapide du brin d'ARN radiomarké, la totalité du substrat est dégradé après 15 minutes et forme des produits de dégradation de 7 nucléotides et moins (Figure R33B). On peut noter aussi la quasi-absence de fragments de taille intermédiaire, indiquant une activité non plus distributive comme observée pour les substrats ADN mais plutôt processive. L'ARN étant un substrat facilement dégradé par des nucléases pouvant contaminer le milieu de réaction ou le matériel, le même test effectué avec un mutant catalytique est essentiel. Ici on n'observe aucune dégradation de l'ARN avec le mutant catalytique même après 30 minutes, (Figure R33B) confirmant que OEX1 est capable de dégrader l'ARN dans un hétéroduplex ARN:ADN.

D'après ce premier test, rOEX1a semblait très processive. Nous avons donc voulu comparer sa vitesse de dégradation d'hybrides ARN:ADN et celle d'un double brin d'ADN au sein d'une même expérience. L'ADN double brin et l'hybride ARN:ADN ont été radiomarkés en 3'. Les résultats de cette expérience sont présentés en Figure R34. A 3 min d'incubation on observe déjà la dégradation des deux types de substrat. Cependant, alors que pour l'ADN double-brin il y a toujours accumulation de produits intermédiaires de dégradation, pour l'hybride ARN:ADN la dégradation du brin ARN est complète, il ne reste que des fragments de quelques nucléotides qui semblent être trop petits pour être pris en charge par l'enzyme. La différence

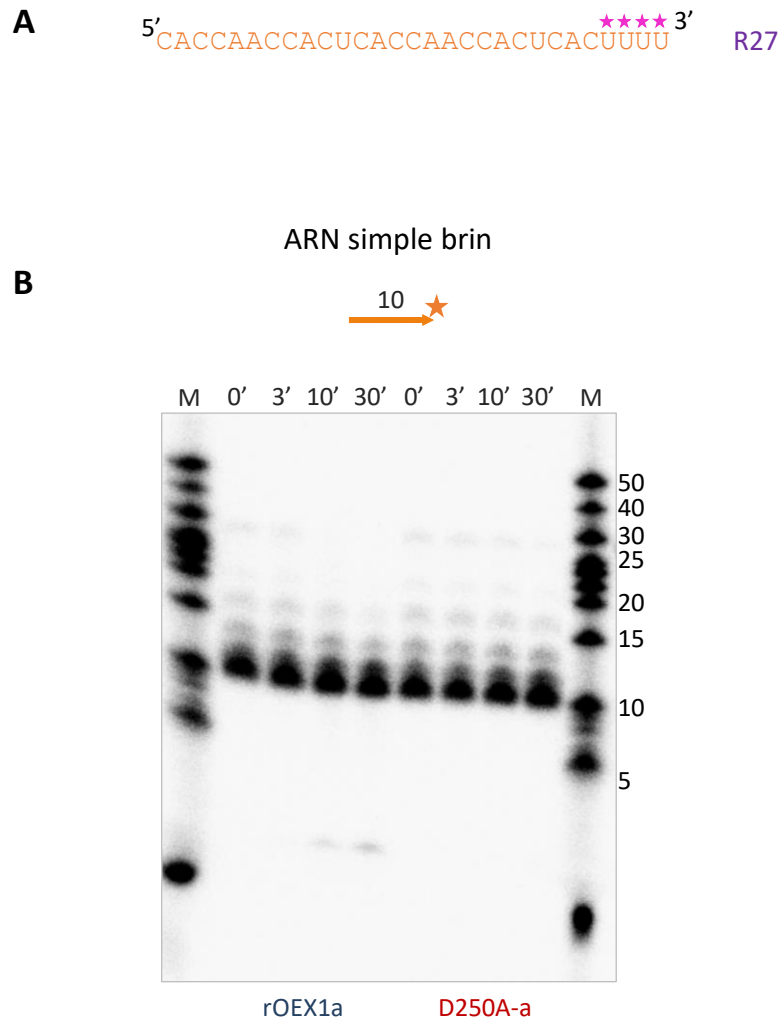


Figure R35. Test de l'activité de rOEX1a sur de l'ARN simple brin.

Tests d'activité menés à pH 8 en présence de 2 mM de MgCl_2 et 1,5 μM d'enzyme. Les réactions sont stoppées à 0, 3, 10 et 30 minutes. **(A)** Séquence du substrat ARN simple brin utilisé lors des tests. Les nucléotides radiomarqués sont indiqués par des étoiles. **(B)** Test effectué avec rOEX1a et le mutant catalytique D250A-a. On notera que le substrat utilisé pour ce test migre à 10 nucléotides au lieu des 29 attendus.

M : marqueur de taille moléculaire en nucléotides.

entre les deux activités est la plus visible à 15 minutes, où la quasi-totalité du substrat hybride est dégradé, alors qu'il reste encore du substrat ADN. On peut conclure de ses résultats que rOEX1a semble avoir une plus grande affinité pour les substrats de type hybrides ARN:ADN que pour les substrats d'ADN.

III.3.b Activité de rOEX1a sur l'ARN simple brin

Un test a été mené avec pour substrat de l'ARN radiomarké en 3', afin de vérifier l'éventuelle activité de rOEX1a sur de l'ARN simple brin. Une cinétique a été réalisée et les échantillons ont été analysés sur gel de polyacrylamide 17 % dénaturant. Le résultat est montré en figure R35. On n'observe pas d'activité de dégradation de l'ARN simple brin par rOEX1a. On note cependant l'apparition d'une légère bande aux alentours de 1 nucléotide après 30 minutes qui est absente chez le mutant catalytique. Cette activité extrêmement faible en comparaison de celles observées jusqu'à présent peut être considérée comme négligeable. Ces résultats nous montrent que l'ARN doit être sous forme hybride avec une séquence d'ADN pour être reconnu et dégradé par OEX1. Un point cependant reste à éclaircir. Comme on peut le voir sur le gel au temps t=0, le brin radiomarké migre à une taille d'environ 10 nucléotides, or nous avons radiomarké une séquence de 25 nucléotides à laquelle 1 à 5 uridines ont été ajoutées lors du marquage. L'ARN simple brin a donc été préalablement clivé par une endonucléase contaminante, probablement lors de la purification de l'ARN radiomarké par chromatographie sur Sephadex. Il est donc difficile d'évaluer la pertinence de ce résultat, car il est possible que rOEX1a nécessite d'une taille minimale de substrat. Une nouvelle expérience sera menée afin d'obtenir un résultat fiable concernant l'activité sur un ARN simple brin.

III.3.c Activité de rOEX1a sur une structure mimant un fragment d'Okasaki

Nous avons suggéré plus tôt une possible implication de rOEX1a dans la maturation des fragments d'Okazaki, vu ses activités de flap-endonucléase et d'extension de gap. Ces tests ont été menés sur des structures d'ADN uniquement. Or, lors de la maturation des fragments d'Okazaki, le rôle de la nucléase est la dégradation de l'amorce ARN. Afin de tester si OEX1 peut jouer un tel rôle, nous avons mimé la structure d'un fragment d'Okazaki avec un substrat similaire à celui utilisé lors des tests d'extension de gap, mais dont le brin radiomarké en 3'

A P3203 P-TCTTTGCCCACCTGCAGGTTCA CACCAACCACUCACCAACCACUCACUUUU R27
 AGAAACGGGTGGACGTCCAAGTCAGTCGTGGTTGGTGAGTGAGTG P3366

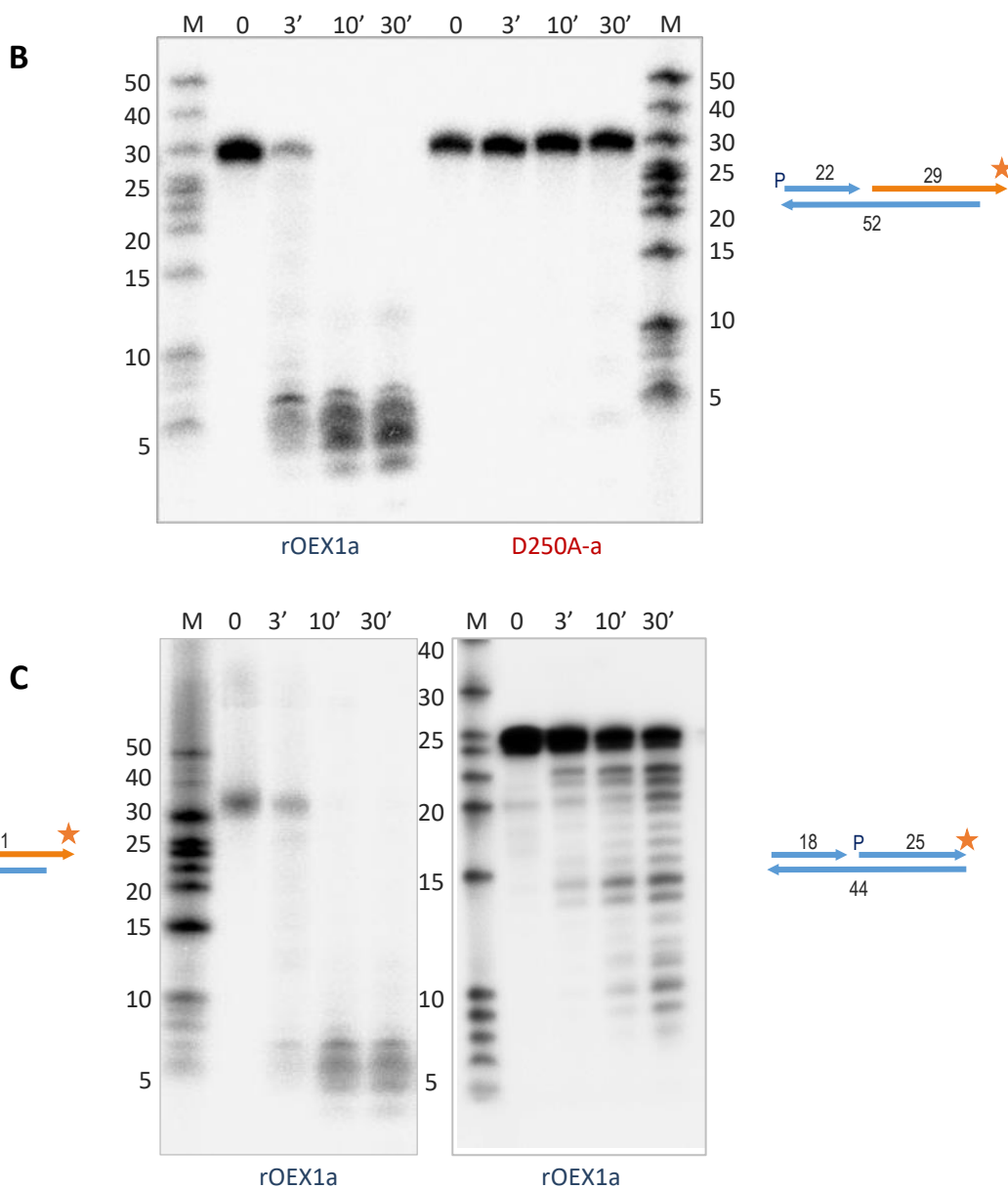


Figure R36. Test de l'activité de OEX1a sur une structure mimant un fragment d'Okazaki.

Tests d'activité menés à pH 8 en présence de 2 mM de MgCl_2 et 1,5 μM d'enzyme. Les réactions sont stoppées aux temps indiqués. **(A)** Séquences des oligonucléotides et structure du substrat mimant un fragment d'Okazaki. Les séquences d'ADN sont en noir, la séquence d'ARN est en orange et les nucléotides radiomarqués sont indiqués par des étoiles. **(B)** Tests d'activité menés avec rOEX1a et son mutant catalytique D250A-a sur le substrat. **(C)** Comparaison de l'activité de rOEX1a sur une structure mimant un fragment d'Okazaki et un ADN double brin contenant un gap. Les schémas représentant les structures testées sont indiquées à côté des gels, l'ARN est en orange et l'ADN en bleu. L'étoile montre la position du marquage.

M : marqueur de taille moléculaire en nucléotides.

est un ARN (Figure R36A). Le gap entre le brin d'ADN et le brin d'ARN est de cinq nucléotides. Le résultat de l'électrophorèse est présenté en figure 36B. Dès trois minutes, la majeure partie du substrat est dégradée. Tout comme pour la structure double brin hybride ARN:ADN, la dégradation est presque totale dès que le substrat est pris en charge par l'enzyme, indiquant une activité apparemment processive. Comme pour l'hybride ARN:DNA double brin, on retrouve un produit final de 4-6 nucléotides.

Lorsque l'on compare le test d'activité effectué sur la structure de type gap dans l'ADN à celle comprenant un ARN (Figure R36C), on remarque que rOEX1a est beaucoup plus processive sur cette dernière. Ce résultat combiné à ceux obtenus pour l'activité flap-endonucléase nous mènent à penser que OEX1 peut avoir un rôle dans la maturation des fragments d'Okazaki pendant la réplication de l'ADNmt. Cette activité peut également être impliquée dans des mécanismes comme la réparation par excision de ribonucléotides (RER) (Vaisman et al., 2014) qui consiste en la suppression des séquences d'ARN intégrées dans le génome lors de la réplication.

III.3.d Activité de rOEXa1 sur les R-loop

Une activité cruciale pour la stabilité du génome est la dégradation des R-loop. Bien qu'elles soient décrites comme jouant un rôle important dans des mécanismes tels que le switch de classe d'immunoglobulines ou la régulation de la transcription de certains gènes, elles doivent être régulées afin d'éviter de provoquer des instabilités. En effet, des ARN hybridés sur le génome peuvent être utilisés par les complexes de réplication comme amorces pour démarrer une réplication ectopique de l'ADN (Drolet and Brochu, 2019; Hegazy et al., 2020). Généralement, les enzymes responsables de la régulation et de la dégradation de ces R-loop sont des enzymes de type Ribonucléase H (Cerritelli and Crouch, 2009). A l'heure actuelle, aucune RNase H n'a été caractérisée comme présente dans les mitochondries de plantes, même si une récente étude place RNH1B (At5g51080) comme un possible candidat (Kuciński et al., 2020). La capacité d'OEX1 à dégrader des ARN hybridés à de l'ADN en fait un candidat potentiel pour la dégradation des R-loop. C'est pour cette raison que nous avons testé son activité sur une structure similaire. Pour construire cette structure, nous avons dans un premier temps hybridé deux ADN dont les séquences complémentaires se trouvent aux extrémités et formant une boucle dans la partie centrale. Ce produit est à son tour mis en

A



B

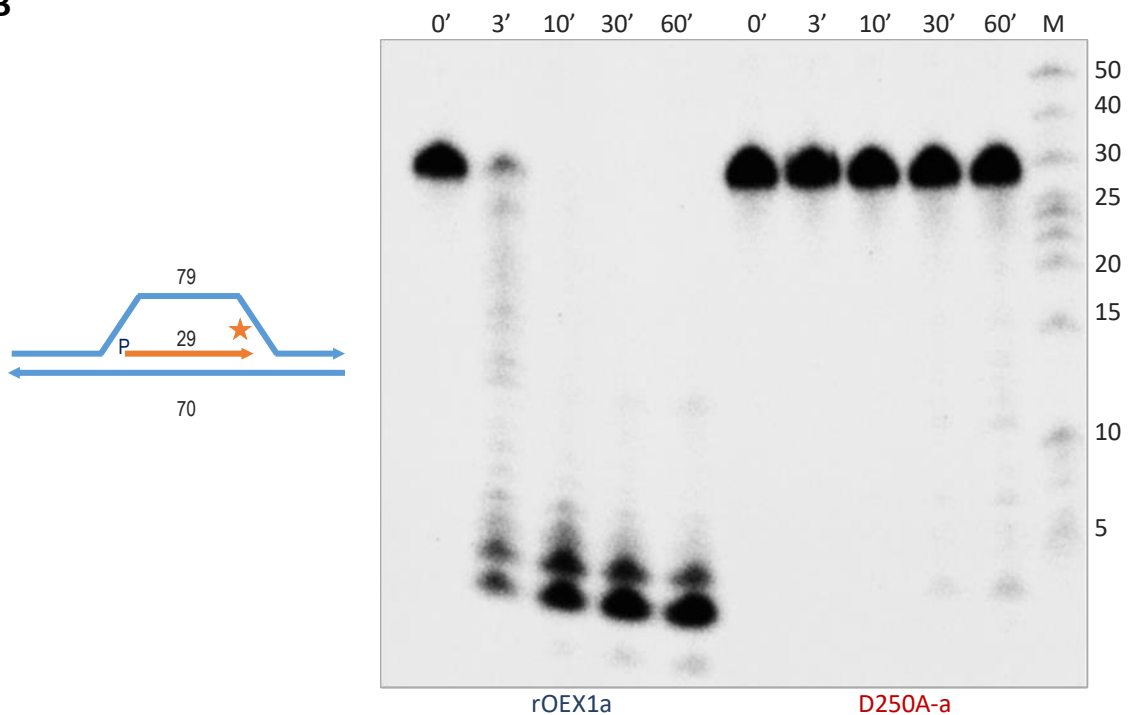


Figure R37. Test de l'activité de rOEX1a sur une structure mimant une R-loop

Tests d'activité menés à pH 8 en présence de 2 mM $MgCl_2$ et 1,5 μM d'enzyme. Les réactions sont stoppées aux temps indiqués. **(A)** Séquences des oligonucléotides et structure du substrat mimant une R-loop. La séquence d'ARN est en orange et les nucléotides radiomarqués sont indiqués par des étoiles. Les oligonucléotides biotinylés sont indiqués par un B encadré. **(B)** Tests d'activité menés avec rOEX1a et son mutant catalytique D250A-a sur la R-loop. M : marqueur de taille moléculaire en nucléotides.

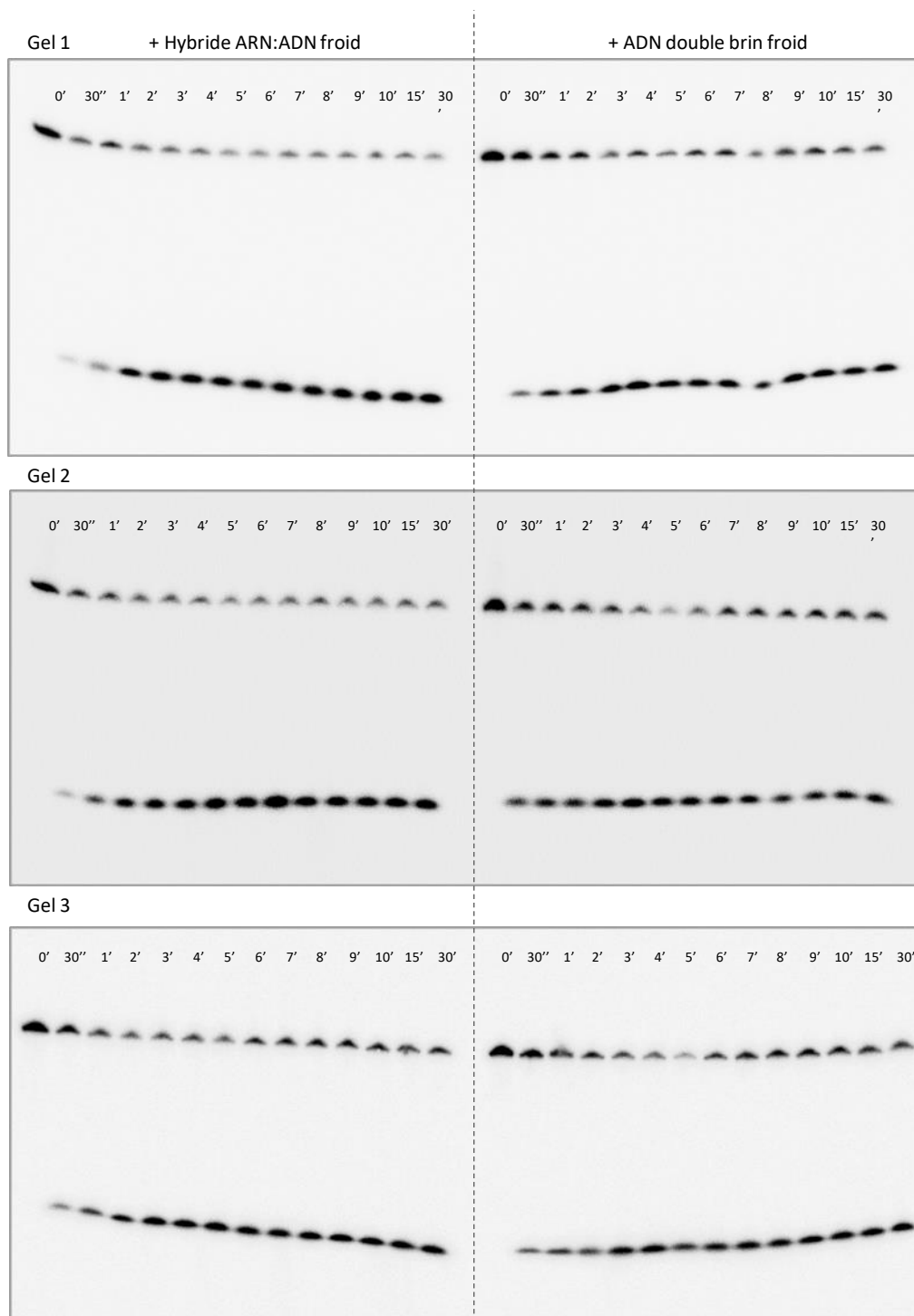


Figure R38. Tests d'activité d'OEX1 en présence de compétiteurs pour différents substrats.

Tests d'activité menés à pH 8 en présence de 2 mM MgCl_2 et 1,5 μM d'enzyme sur un substrat d'ADN double brin radiomarqué en 5'. Les réactions sont stoppées aux temps indiqués. La compétition se fait par ajout d'un substrat froid double brin hybride ARN:ADN (à gauche) ou double brin ADN (à droite). Le ratio substrat froid / substrat radiomarqué est de 200 / 1.

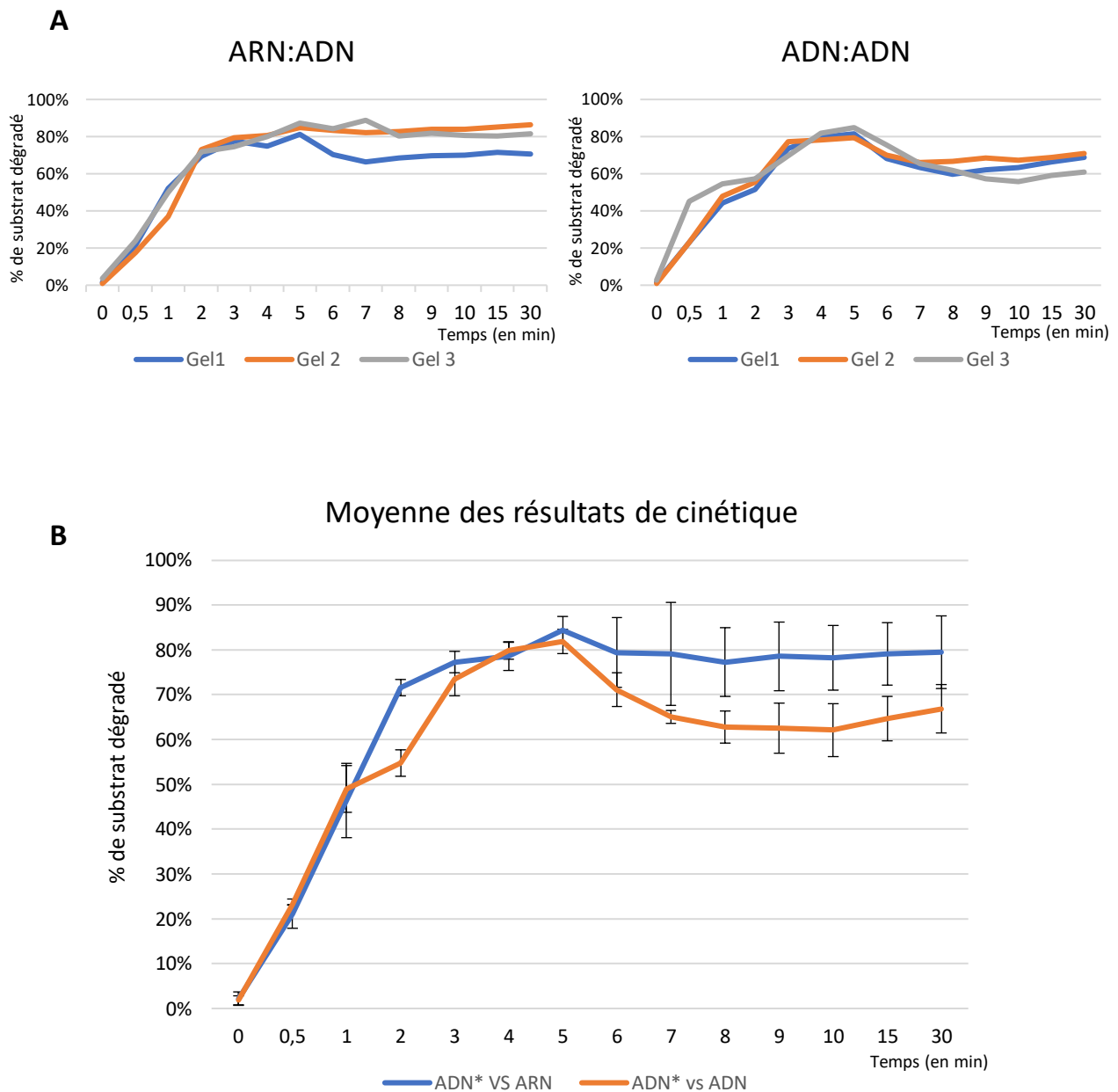


Figure R39. Cinétique de dégradation de l'ADN double brin en présence compétiteurs.

(A) Graphique représentant trois cinétiques de dégradation d'un ADN double brin marqué et 5' en présence, soit d'hybride ARN:ADN, soit d'ADN double brin, non marqués comme compétiteurs (ratio compétiteur froid / substrat marqué = 200). (B) Graphique représentant les moyennes des cinétiques et écarts types pour chaque compétiteur.

présence d'un ARN radiomarqué en 3' et de séquence complémentaire à un des brins d'ADN dans la boucle (Figure R37A). Du fait de la forte activité 5'-3' exonucléase de OEX1, nous avons biotinylé les oligonucléotides ADN en 5' dans le but d'inhiber leur dégradation et ainsi de garantir l'intégrité de la structure. Afin de contrôler l'hybridation des trois amorces, une migration sur gel de polyacrylamide non-dénaturant a été réalisée pour comparer les tailles du simple brin, du double brin et de la R-loop. Dès 3 minutes on observe la dégradation de la plupart du substrat initial (Figures R37B). Comme pour les autres substrats composés d'hybride ARN:ADN, on obtient très rapidement le produit final de sorte que la présence de produits intermédiaires n'est visible qu'au 1^{er} point de la cinétique (trois minutes). La même expérience a été menée avec le mutant catalytique et ne montre aucune activité, même après 60 minutes (Figure R37B). Ce résultat nous montre que l'activité 5'-3' exonucléase de rOEX1a pourrait être impliquée dans la dégradation de R-loops présents dans le mitogénome d'*A. thaliana*.

III.4 Comparaison de l'affinité de rOEX1a pour les hybrides et les ADN

Les résultats des tests d'activité présentés précédemment nous ont montré que rOEX1 était capable de reconnaître plusieurs structures allant de l'ADN double brin à la R-loop, et de les prendre en charge à travers différentes activités exonucléase ou endonucléase. Nous avons également vu que rOEX1a semblait plus processive sur les substrats comprenant des hybrides ARN:ADN que sur les substrats équivalents d'ADN uniquement. Nous avons donc décidé de mener une expérience permettant de calculer la constante d'affinité de rOEX1a pour chacun des deux substrats. Comprendre pour quel substrat rOEX1a a plus d'affinité peut permettre de nous orienter vers l'activité principale de la protéine *in vivo*. Pour cela nous avons réalisé une cinétique de l'activité de rOEX1a sur de l'ADN double brin radiomarqué en présence d'une concentration constante de substrat froid. Ce compétiteur est soit de l'ADN double brin, soit un hybride double brin ARN:ADN. L'expérience a été menée en triplicata (Figure R38). Le pourcentage de substrat formé a été calculé en rapportant la radioactivité mesurée dans la bande du bas (radioactivité libérée) avec celle mesurée dans la bande du haut (substrat non-dégradé). La quantification de ces bandes a été possible grâce au logiciel image-LabTM (Bio-Rad). Les résultats ont été reportés sur les graphiques en Figure R39. On atteint le maximum de la réaction dès 3 min avec environ 80 % de substrat dégradé en présence

d'hybride froid et en moyenne 70 % de substrat dégradé en présence d'ADN froid. Lorsque l'on compare les courbes, on remarque qu'il y a peu de différence et que la pente de dégradation du substrat est la même. Ces résultats suggèrent que rOEX1a a la même affinité pour l'ADN que pour les hybrides ARN:ADN (Figure 39).

III.5 Test de l'implication de OEX1 dans la dégradation des R-loop *in vivo* par DRIP

Les résultats obtenus lors des tests d'activité nous permettent de formuler l'hypothèse d'un rôle d'OEX1 dans la résolution des R-loop par dégradation du brin d'ARN. Les tests d'activité étant réalisés *in vitro*, ils doivent être confirmés *in vivo*. Une méthode permet d'évaluer de manière relative la quantité de R-loop dans un extrait d'ADN, il s'agit d'un DRIP ("DNA:RNA ImmunoPrecipitation") suivi d'une analyse par qPCR. Le DRIP consiste en l'immunoprécipitation, à l'aide d'anticorps spécifiques (anticorps S6.9), des hybrides ADN:ARN présents dans un échantillon d'acides nucléiques préalablement fragmentés (Boguslawski et al., 1986). Les ADN double brin contaminants sont alors éliminés par des lavages afin de ne conserver que les hybrides ADN:ARN. Ceux-ci sont alors soit étudiés par qPCR, soit l'ARN qui les compose est retro-transcrit puis analysé par RNAseq (Sanz and Chédin, 2019). Nous partons de l'hypothèse que, si OEX1 est bien impliquée dans la résolution des R-loop présents dans le mitogénome d'*A. thaliana*, il y aura une augmentation du taux de R-loop dans le mutant *oex1* par rapport au sauvage.

La méthode de DRIP suivie d'un séquençage (DRIP-Seq) est la plus couramment utilisée afin d'obtenir une plus grande précision quant à la position et la taille des R-loop. Cependant, l'étape de séquençage demande une quantité d'ADN relativement élevée mais aussi un enrichissement en ADN mitochondrial afin de ne pas "noyer" les données de séquençage avec des séquences provenant du noyau ou des chloroplastes. Cependant, la purification de mitochondries nécessite une grande quantité de plantes et le phénotype très sévère des mutants *oex1* nous conduit à un rendement très faible. Nous avons donc décidé d'étudier dans un premier temps la quantité relative de R-loop par qPCR.

Pour disposer de suffisamment de matériel pour procéder à une analyse par qPCR nous avons extrait l'ADN de 2 g de plantes sauvages (Col-0) et mutantes (*oex1-1*) à l'aide d'un kit (méthode décrite dans le chapitre Méthodes section IV.4). L'ADN a été fragmenté à l'aide d'enzymes de restriction puis immunoprécipité avec l'anticorps S9.6. Dans un premier temps nous avons

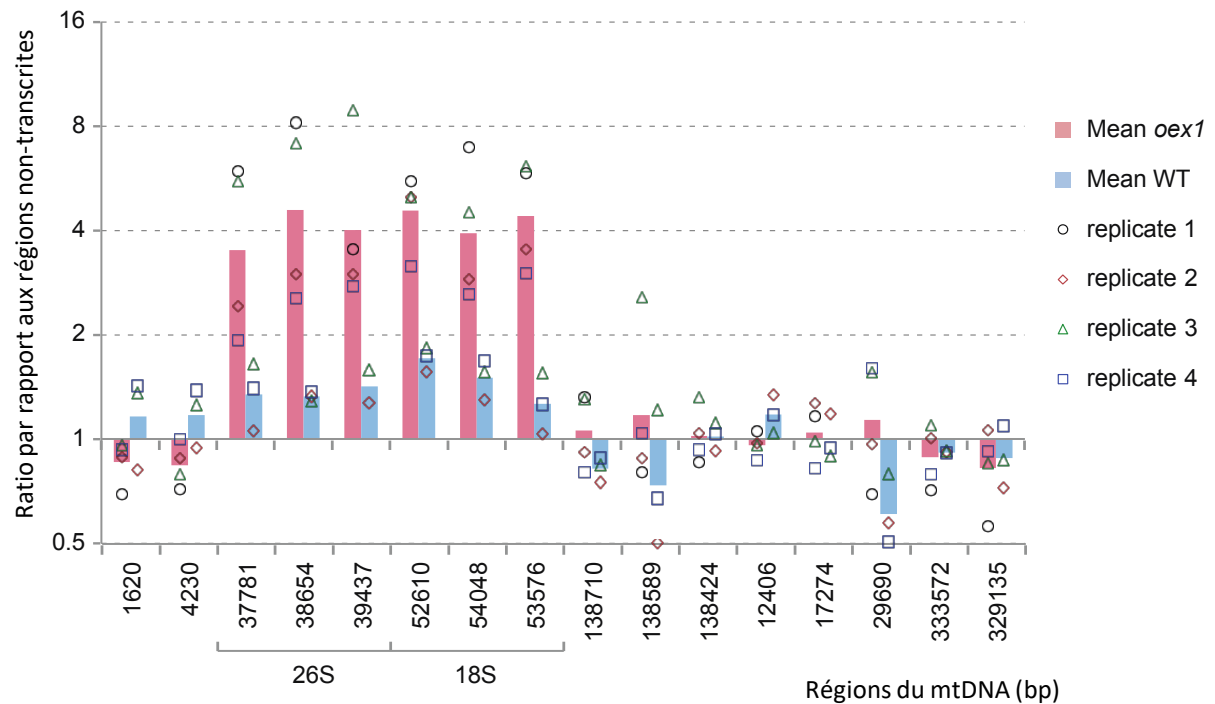


Figure R40. Analyse de l'accumulation de R-loop dans l'ADNmt de *oex1-1*.

Analyse par DRIP-qPCR des hybrides ARN:ADN présents dans l'ADNmt de plantes sauvages Col-0 et de plantes mutantes *oex1-1*. Les régions du génome testées sont celles activement transcrites correspondant aux gènes des ARN ribosomiques 26S et 18S (18S#1, #2 et #3). Les résultats ont été normalisés par rapport au bruit de fond retrouvé pour des régions du génome qui ne sont pas transcrites. Les coordonnées dans le génome sont indiquées. Chaque test a été répété quatre fois. La moyenne des résultats est représentée en rouge pour *oex1-1* et en bleu pour Col-0. Les résultats sont présentés sur échelle logarithmique de base 2.

essayé de visualiser la présence de fragments immunoprécipités par qPCR en utilisant des amorces situées le long du mitogénome, sans cibler de séquence spécifique (Annexe 1). Bien que nous observions des différences entre le sauvage et le mutant, les résultats n'étaient pas significatifs (Résultats non montrés). Nous avons donc changé notre approche en ciblant les régions fortement transcrites et qui donc sont les plus susceptibles d'induire une accumulation de R-loop. Cette stratégie a été décrite précédemment dans la littérature (Bhatia et al., 2014; Yang et al., 2020b). Nous avons donc utilisé des amorces dessinées de sorte à amplifier les régions codant pour la petite et la grande sous-unité de l'ARN ribosomique (18S et 26S) qui sont connues pour être fortement transcrites. Nous avons également amplifié des régions témoins de l'ADNmt qui ne sont pas transcrites, selon des résultats publics de RNA-seq (Figure R40). Les résultats présentés sont ceux obtenus de quatre expériences indépendantes réalisées sur des lots de plantes sauvages et mutantes indépendants. La comparaison du taux d'hybrides ARN:ADN est normalisé par rapport aux régions non-transcrites de l'ADNmt, afin d'éliminer le bruit de fond. On observe une accumulation du taux d'hybrides ARN:ADN dans les mutants *oex1-1* en comparaison au sauvage au niveau des séquences codant pour l'ARNr 18S et 26S, jusqu'à 8 fois plus dans certains réplicas. Ces résultats témoignent d'un dysfonctionnement dans la régulation des R-loop lorsque OEX1 est absent, et nous confortent quant à son rôle dans la résolution de ces structures qui sont source d'instabilité génomique.

Chapitre 2 : Etude de OEX2

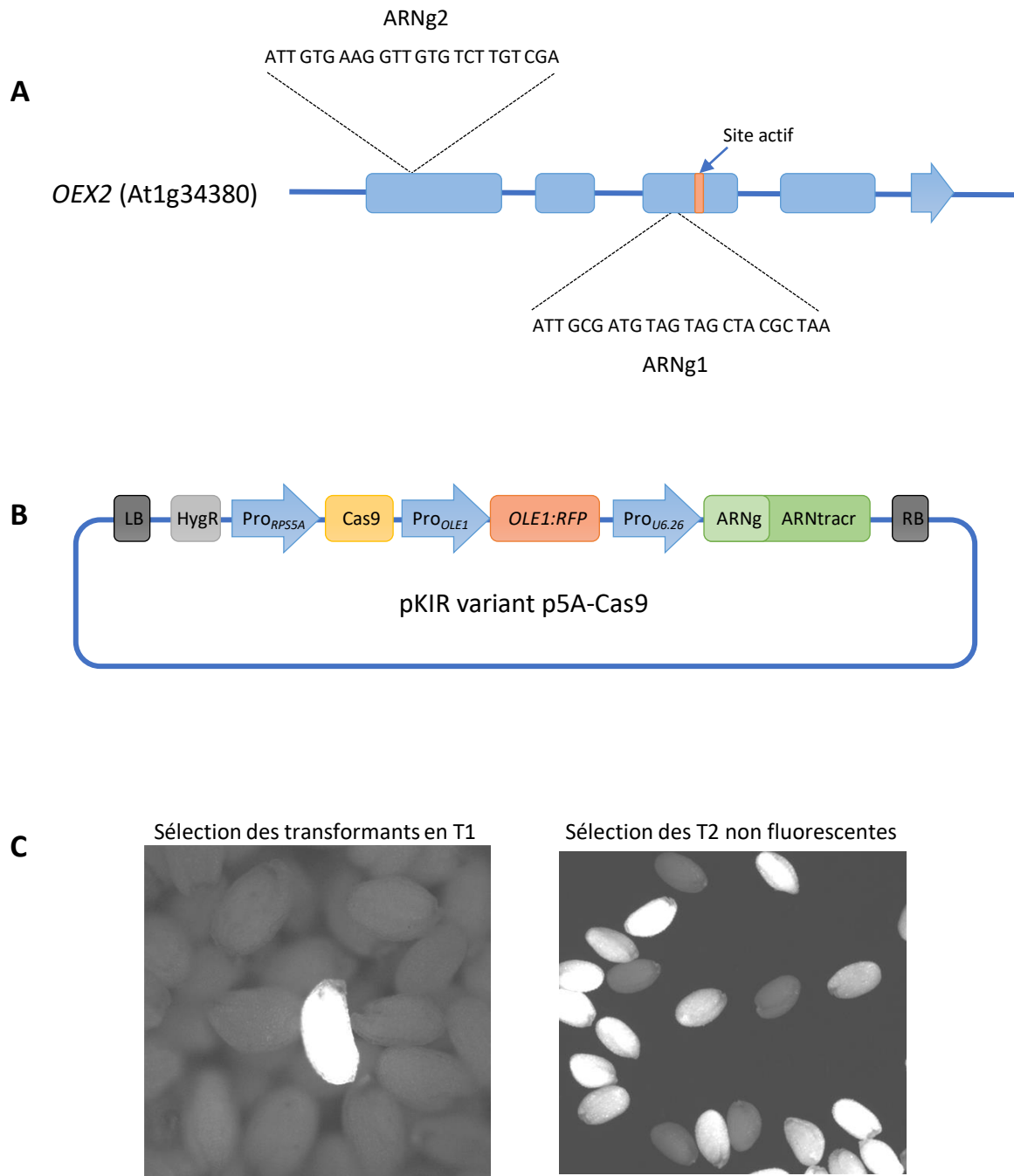


Figure R41. Génération de mutant *oex2* grâce à la technologie CRISPR/Cas9.

(A) Représentation du gène *OEX2* et des séquences cibles des ARN guides (ARNg1 et ARNg2). Les séquences ont été dessinées à l'aide du site internet *crispor.tefor.net* et ciblent soit une région bordant le site actif (ARNg1), soit le premier exon (ARNg2). (B) Représentation du vecteur utilisé pour transformer les plants d'*Arabidopsis*. (C) Photos de graines observées à la loupe binoculaire à fluorescence permettant la sélection des graines possédant la construction en T1, puis des graines T2 qui par ségrégation ne contiennent plus le transgène.

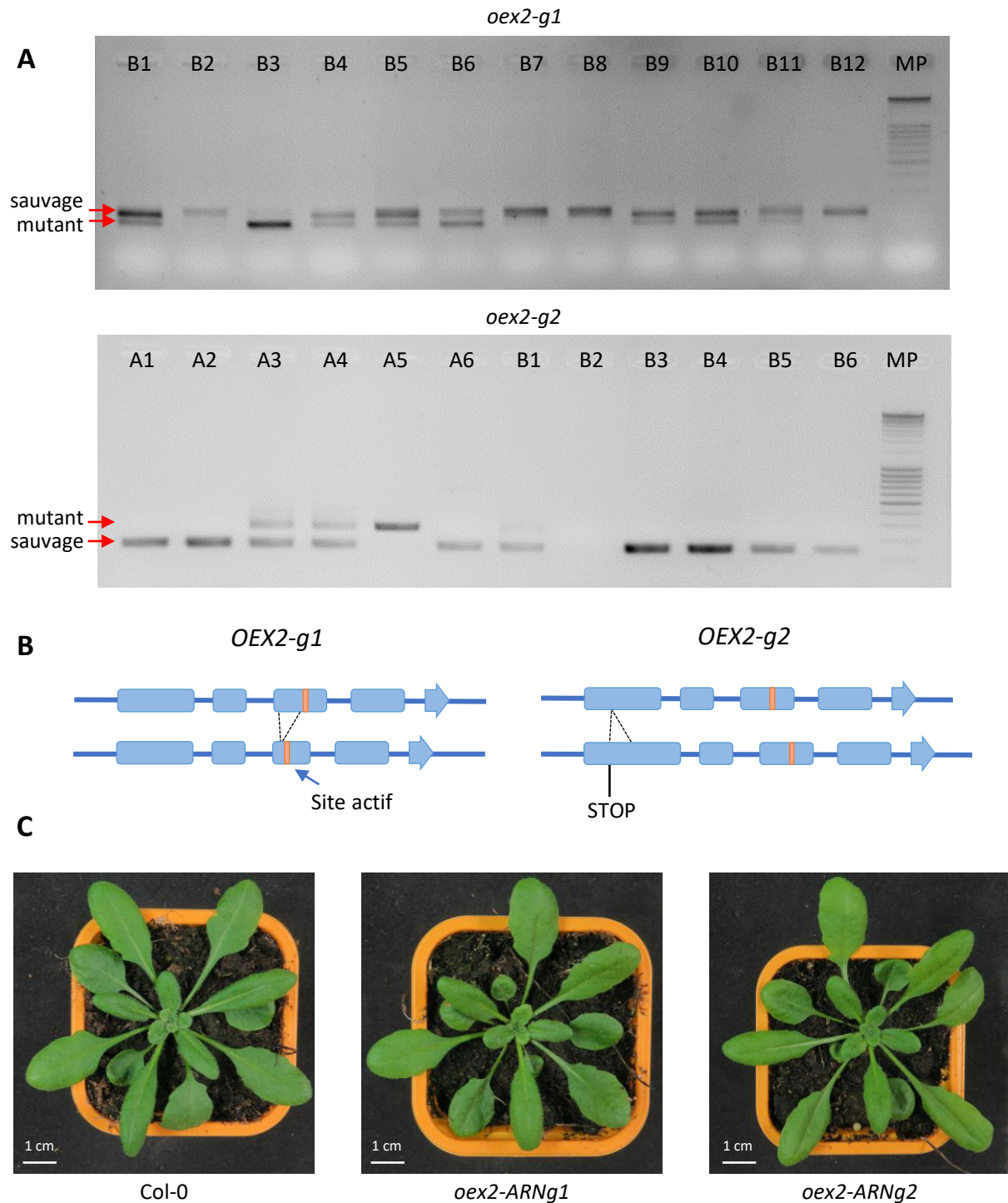


Figure R42. Caractérisation des mutants de *oex2*.

(A) PCR réalisées à l'aide d'amorces bordant les sites cibles de la mutation permettent de distinguer facilement les allèles mutants et sauvages de *OEX2*. L'électrophorèse est réalisée sur gel d'agarose 2 % afin de suffisamment résoudre les bandes. (B) Représentation du gène *OEX2* ainsi que des deux mutations générées par CRISPR/Cas9. La mutation induite par l'ARN guide 1 provoque une délétion de 6 acides aminés proche du site d'actif, la mutation induite par l'ARN guide 2 produit un codon STOP ainsi qu'une insertion visible par PCR. (C) Photos de plantes sauvages (Col-0) et mutantes (*oex2-g1* et *oex2-g2*) au stade rosette.

I. Génération d'un mutant *oex2*

Contrairement au gène *OEX1* étudié dans le chapitre précédent, aucun mutant d'insertion T-DNA n'est disponible pour le gène *OEX2* dans les banques de graines. Plusieurs candidats apparemment disponibles ont été commandés, mais aucun n'a été validé comme contenant une insertion dans le gène *OEX2*. Afin de pouvoir mener une étude phénotypique et de pouvoir générer un double mutant *oex1 oex2*, il nous était indispensable d'obtenir des plantes déficientes dans l'expression de *OEX2*. Au sein de notre unité, Anthony Gobert développe des plasmides et des protocoles pour de la mutation dirigée du génome d'*A. thaliana* par la technologie CRISPR/Cas9. Le gène *OEX2* (At1g34380) est composé de 5 exons et deux ARN guides ont dessinés et générés. Le premier qui cible une région du troisième exon bordant le site actif et le second qui cible le premier exon, dans le but d'obtenir une protéine tronquée (Figure R41A). Leurs séquences ont été introduites dans le variant p5A-Cas9 du plasmide pKIR (Tsutsui and Higashiyama, 2017). La construction comprend le gène codant pour la protéine Cas9 sous contrôle du promoteur constitutif RPS5A, le gène codant pour la protéine de fusion OLE1:RFP sous contrôle du promoteur du gène *OLE1*, et le gène codant pour l'ARN guide sous le contrôle du promoteur U6-26 permettant la transcription par l'ARN polymérase III (Figure R41B). Cette construction a été choisie car elle permet de sélectionner les graines transformées par fluorescence. La fusion de la RFP ("Red Fluorescent Protein") à OLE1 permet sa localisation dans les tissus oléagineux de la graine. Il est alors possible de sélectionner les graines transformées par observation à la loupe binoculaire à fluorescence (Figure R41C). Les graines transformées sélectionnées sont semées et les plantes adultes sont ensuite génotypées à l'aide d'amorces flanquant la région cible. Le but est de cribler les plantes pour des lignées dont l'amplicon a une taille différente par rapport au gène sauvage, indiquant une insertion ou une délétion faisant suite à la coupure par Cas9. Par ce procédé nous avons trouvé deux mutants. Un premier dérivé de l'ARN guide 1, présentant une délétion que l'on appellera *oex2-g1*, et un second dérivé de l'ARN guide 2 présentant une insertion que l'on appellera *oex2-g2* (Figure R42A et B). Afin de confirmer les résultats obtenus par PCR, nous avons séquencé l'ADN des mutants dans les régions concernées. Le mutant *oex2-g1* présente une délétion de 18 nucléotides, soit 6 acides aminés au niveau protéique. La mutation ne provoque pas de décalage de cadre de lecture, mais est située dans la région bordant le site actif. Le

mutant *oex2-g2* quant à lui présente une insertion dans l'ADN ainsi qu'une mutation "non-sens" introduisant un codon STOP au début du gène. Il s'agit donc d'un mutant perte de fonction. Les graines provenant de ces deux lignées mutées sont récoltées puis les graines non-fluorescentes sont sélectionnées à la loupe binoculaire à fluorescence. Cette étape permet d'éliminer la construction CRISPR/Cas9 afin qu'elle ne provoque pas de mutation hors-cible dans les générations suivantes.

II. Phénotype des mutants *oex2*

La génération de deux mutant distincts obtenus à l'aide d'ARN guides différents nous permet de confirmer qu'un phénotype est spécifique à la mutation de OEX2 et non dû à un effet de mutation hors-cible. De ce fait, durant la suite de notre étude, toutes nos expériences ont été menées en parallèle avec les deux mutants *oex2-g1* et *oex2-g2*.

Les plantes *oex2* ne présentent aucun phénotype visible, ni de retard de croissance (Figure R42C). Les plantes développent des hampes florales et présentent une fertilité normale, ceci même après plusieurs générations. L'absence de OEX2 ne semble donc pas affecter le développement de la plante. Cependant OEX2 étant homologue à OEX1 qui pourrait être aussi adressée au chloroplaste, une fonction redondante des deux protéines pourrait expliquer cette absence de phénotype.

III. Application d'un stress génotoxique sur les mutants *oex2*

Dans le but de tester l'implication de OEX2 dans la réparation, nous avons étudié la résistance des plantes *oex2* face à un stress génotoxique. La plupart des stress génotoxiques altèrent de façon non-spécifique les trois génomes présents dans la cellule, il est donc difficile de distinguer les phénotypes liés à l'altération des génomes organellaires ou nucléaire. Afin d'induire des lésions spécifiquement dans la mitochondrie et le chloroplaste, nous avons utilisé la ciprofloxacine (CIP), un antibiotique connu pour inhiber la gyrase bactérienne (LeBel, 1988). Les mitochondries et les chloroplastes possèdent deux gyrases, GYRA et GYRB, d'origine bactérienne et sensibles à la CIP (Evans-Roberts et al., 2016), cela nous permet de cibler

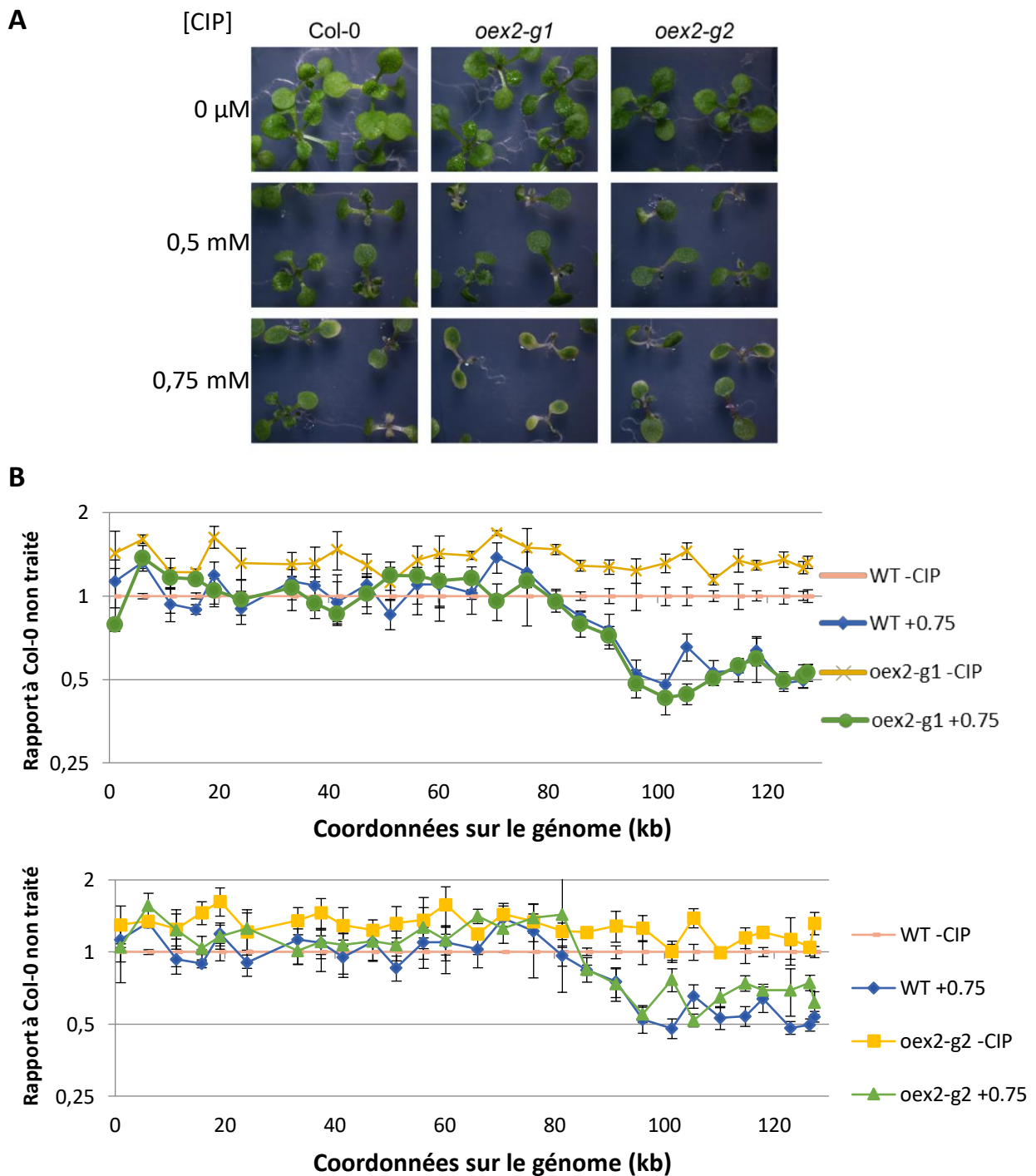


Figure R43. Culture *in vitro* d'Arabidopsis sous stress-génotoxique et analyse du génome chloroplastique.

(A) Photos de plantules d'Arabidopsis sauvage (Col-0) et mutants *oex2* (*oex2-g1* et *oex2-g2*) prises 10 jours après germination sur milieu supplémenté avec 0, 0,5 ou 0,75 μ M de ciprofloxacine (CIP). La sensibilité des plantes à l'agent génotoxique se caractérise par une incapacité à développer la première paire de vraies feuilles. (B) Analyse par qPCR le long du génome chloroplastique de plantules mutantes (*oex2-g1* et *oex2-g2*) soumises à un stress à la ciprofloxacine, en comparaison avec des plantules Col-0 (WT). Les données ont été normalisées par rapport aux gènes de référence *ACT1* (At2G37620) et *UBQ10* (At4G05320).



Figure R44. Phénotype des double mutants *oex1 oex2*.

Les plantes double mutantes *oex1 oex2* ont été obtenues par croisement entre une plante hétérozygote *oex1-1* et le mutant homozygote *oex2* obtenu avec l'ARN guide 2. Le double-mutant présente un phénotype caractéristique des mutant *oex1-1*.

spécifiquement les génomes organellaires. Des plantules *oex2-g1*, *oex2-g2* et Col-0 ont été semées sur milieu gélosé contenant différentes concentrations en CIP, comme décrit dans le chapitre méthodes section III.7. Après 12 jours, le phénotype des plantes est observé. La ciprofloxacine inhibe l'apparition des premières feuilles à une concentration qui dépend de la sensibilité de la plante. Les résultats préliminaires montrent une légère augmentation de la sensibilité des mutants *oex2* par rapport plantes sauvages (Figure 43A). Afin d'observer l'impact de la CIP sur le génome chloroplastique du mutant en comparaison à celui du sauvage, nous les avons analysés par qPCR selon la méthode décrite dans le chapitre Méthodes section V.5. En effet, il avait été montré que des mutants de facteurs impliqués dans la réparation du génome du chloroplaste sont très affectés dans la réplication de leur génome en présence de CIP (Ret et al., 2018). L'étude a été réalisée sur les mutants *oex2-g1* et *oex2-g2* en présence de 0 et 0,75 μ M de CIP. Les plantes soumises à 0,75 μ M de CIP montrent une diminution du nombre de copie de la région postérieure à 80 kb. Cette région correspond à la séquence répétée inversée et à la région SSC. La réplication différentielle de ces régions du génome du chloroplaste en présence de CIP avait déjà été décrite (Ret et al., 2018). Cependant, l'effet sur la réplication du génome est le même pour le sauvage Col-0 que pour *oex2*. L'absence de OEX2 ne semble donc pas avoir d'effet sur la stabilité du génome chloroplastique même sous condition de stress génotoxique (Figure 43B).

IV. Etude du double mutant *oex1 oex2*

L'absence de phénotype pour les mutants *oex2* peut s'expliquer par une possible redondance de l'activité de OEX2 avec une autre protéine. Comme nous l'avons montré dans la partie "contexte de l'étude", la protéine OEX1 pourrait être aussi adressée au chloroplaste et son absence dans le chloroplaste, dans une plante mutante *oex1-1* complémentée avec la construction AOX1:OEX1 adressant OEX1 uniquement dans la mitochondrie, ne semble pas causer de phénotype particulier non plus. Afin d'étudier la redondance de ces protéines, nous avons procédé à un croisement de *oex2-g2* avec *oex1-1*. Du fait de la quasi-stérilité des plantes *oex1-1*, des plantes *oex1-1* hétérozygotes ont été utilisées. A la génération T2, les double mutants homozygotes *oex1 oex2* obtenus montrent le même phénotype que les mutants simples *oex1-1* au stade rosette, sans montrer d'aggravation (Figure R44). Une observation de

ces plantes à un stade plus avancé nous permettra d'observer si le phénotype des inflorescences est le même. Ainsi, apparemment il n'y a pas de synergie des phénotypes, indiquant que les activités de OEX1 et de OEX2 dans le chloroplaste ne sont pas redondantes. Après ces analyses, et au cours de la rédaction de ce manuscrit, nous avons obtenu les résultats de localisation de OEX1:GFP exprimée de façon constitutive dans des plantes transgéniques d'*Arabidopsis*. Ces résultats montrent que OEX1 ne semble pas avoir de localisation chloroplastique dans *A. thaliana* (Figure R4). Ce serait en accord avec les résultats obtenus pour les doubles mutants *oex1 oex2*.

V. Production et purification de OEX2

Comme OEX1, OEX2 est une protéine possédant un domaine 5'-3' exonucléase composé des domaines PIN et H3TH. Dans l'optique de tester son activité sur différents substrats, nous avons entrepris de la surproduire dans *E. coli* et de la purifier. Pour cela, nous avons amplifié l'ADN complémentaire du gène *OEX2* déplété d'une partie de sa séquence codant pour la partie N-terminale (67 codons), ceci afin d'éliminer la séquence d'adressage et d'augmenter la solubilité de la protéine. La séquence amplifiée a été insérée dans le vecteur pET28a, permettant la fusion de la protéine à une étiquette de 6-histidines du côté N-terminal de la protéine qui nécessaire pour l'étape de purification. Comme pour OEX1, nous appellerons la protéine recombinante rOEX2.

Ayant obtenu des résultats concluants avec OEX1, nous avons dans un premier temps transformé des bactéries *E. coli* de souche BL21(DE3) avec le vecteur codant pour rOEX2. Les bactéries ont été lysées par sonication comme décrit dans Méthode section VII.7. Afin de contrôler la solubilité de la protéine, des lysats totaux et des extraits de protéines solubles sont analysés par SDS-PAGE et coloration au bleu de Coomassie. La protéine est présente dans les fractions contenant les protéines totales provenant de cultures induites, mais est absente des fractions solubles (résultats non montrés). Nous avons effectué le même procédé dans la souche Rosetta 2(DE3) pLys d'*E. coli* qui possède un plasmide supplémentaire codant pour des ARNt plus spécifiques de l'usage des codons des eucaryotes. Cette propriété permet, dans certains cas, de favoriser la production de la protéine et d'augmenter sa solubilité (Tegel et al., 2010). Cependant, les résultats n'étaient meilleurs que ceux obtenus avec la souche

BL21(DE3). Nous avons également testé l'expression dans la souche ArcticExpress(DE3), codante pour des protéines chaperonne aidant le repliage de la protéine active même à de basses températures. Cette souche nous a permis d'induire l'expression de notre construction à 14 °C et d'obtenir rOEX2 dans la fraction soluble en petite quantité, mais nous avons été dans l'impossibilité de séparer rOEX2 de la chaperonne, pour réaliser des tests d'activité.

Discussion :

I. Avant-propos:

L'équipe qui m'a accueillie lors de ma thèse est spécialisée dans les mécanismes de maintenance et de réparation de l'ADN mitochondrial de plante. Elle avait, avant mon arrivée, identifié OEX1 et OEX2 comme deux possibles exonucléases organellaires par recherche de candidats homologues au domaine 5'-3' exonucléase de l'ADN polymérase I. Ce domaine, essentiel aux mécanismes de réplication et de réparation de l'ADN chez les bactéries, est absent dans les deux ADN polymérases organellaires POL1A et POL1B. Mon projet était l'étude de ces protéines chez *Arabidopsis*, dans un premier temps par la caractérisation des mutants. Un mutant d'insertion T-DNA était disponible pour *OEX1*, mais pour *OEX2* des mutants ont dû être générés par la technologie CRISPR/Cas9. Dans un second temps, l'objectif était de tester l'activité de ces protéines sur différents substrats pour confirmer leur activité 5'-3' exonucléase et identifier d'autres substrats possibles reconnus par ces enzymes. Mon projet s'est principalement concentré sur *OEX1* qui, par la disponibilité d'un mutant d'insertion T-DNA et par la facilité d'exprimer et purifier la protéine recombinante, était plus abordable à étudier en trois ans.

II. L'Absence de OEX1 est critique pour la mitochondrie

L'étude des phénotypes du mutant *oex1-1* nous confirme l'importance de cette protéine pour le bon fonctionnement d'*Arabidopsis*. Les plantes *oex1-1* sont très affectées dans leur croissance et leur développement ainsi que dans leur fertilité. Ainsi, à partir de la troisième génération, les plantes sont trop affectées pour donner une descendance. Cette quasi-stérilité s'explique d'une part par un pistil et des stigmates très affectés et déformés, et d'autre part par un pollen peu viable. De ce fait, lors des croisements, il m'était difficile de fixer du pollen au stigmate du mutant car il était soit absent soit peu collant, et toutes mes tentatives de polliniser un pistil sauvage avec du pollen *oex1-1* se sont soldées par un échec.

Durant l'étude des mutants *oex1-1* nous avons également observé une variation dans les phénotypes entre les plantes d'une même génération. Bien que le phénotype global soit le même pour toutes, la sévérité varie et certaines plantes ne développent pas du tout de hampe

florale dès la première génération. Cette variabilité s'observe également au niveau de l'instabilité du génome mitochondrial en analysant le nombre de copies de différentes régions du génome. En effet, le profil de variation de la stœchiométrie de l'ADNmt, bien qu'il soit similaire pour la plupart des plantes, peut fortement varier d'une plante à l'autre et est corrélé à la sévérité du phénotype observé. La variabilité du phénotype dépend possiblement du degré d'affection du génome mitochondrial mais aussi des régions touchées. Ces variations de la stœchiométrie du génome et la formation de sous-génomes ont déjà été observées dans les mutants des facteurs RADA, REG1, RECA2, RECA3, MSH1 et OSB1 qui sont impliqués dans la surveillance et la réparation de l'ADNmt (Chevigny et al., 2019; Wallet et al., 2015). Cependant, uniquement pour *oex1* et pour *radA* la pénétrance des phénotypes développementaux est de 100%, alors que pour RECA3, MSH1 et OSB1 la plupart des mutants de première génération ont des phénotypes sauvages. La raison pour laquelle les plantes *oex1* et *radA* sont si affectées reste inconnue.

L'augmentation du nombre de copies d'une région ou sa disparition pourrait impacter le transcriptome de la mitochondrie pour les régions affectées contenant des gènes. Cependant, toutes les régions qui sont significativement réduites en nombre de copies ne contiennent pas de gènes et, ni pour *radA* ni pour *oex1*, il n'a été possible d'identifier des gènes mitochondriaux connus qui seraient significativement affectés dans leur expression. De même, dans le cas de la mutation *recA2* qui est létale au stade de pousse, il n'a pas été possible de corrélérer un défaut du transcriptome avec le phénotype léthal (Miller-Messmer et al., 2012). Une possibilité est que les remaniements de l'ADNmt activent l'expression d'orfs qui seraient toxiques pour la mitochondrie, comme il a été proposé dans le cas de *radA* (Chevigny et al., 2019). Il sera nécessaire d'étudier le transcriptome mitochondrial des mutants par d'autres approches que la RT-qPCR, et en particulier par RNAseq, pour identifier tous les changements d'expression des séquences de l'ADNmt.

Une autre possibilité est que les problèmes de maintenance du mitogénome déclencheraient une réponse rétrograde affectant l'expression de gènes nucléaires qui contrôlent le développement de la plante. Effectivement, dans le cas du mutant *radA*, il a été montré que des gènes qui inhibent la progression du cycle cellulaire sont activés, en particulier les gènes SMR5 et ANAC084, qui dans le cadre de la DDR ("DNA-damage Response") nucléaire sont nécessaires pour l'arrêt en phase G2 en réponse à des dommages de l'ADN (Chevigny et al., 2019). Cela pourrait être dû à la libération de ROS. Il sera important de vérifier si, dans le cas

de *oex1-1*, il y a aussi induction de gènes de la DDR nucléaire comme réponse rétrograde. Ainsi, une analyse du transcriptome global de *oex1-1* par RNAseq s'impose.

Lors du rétrocroisement de plantes *oex1-1* avec des plantes sauvages Col-0, nous avons réintroduit un allèle sauvage *OEX1* dans un contexte cytoplasmique *oex1-1* de première génération. Nous avons observé un retour à un phénotype sauvage, suggérant que la présence d'un allèle sain *OEX1* permettrait, à des plantes peu affectées à l'origine, de retrouver un génome mitochondrial fonctionnel. Des résultats similaires ont été observés pour les mutants *recg1* et *osb1* (Chevigny et al., 2019; Wallet et al., 2015; Zaegel et al., 2006). L'analyse des formes parentales et recombinées des plantes issues du rétrocroisement de *recg1* avec une plante sauvage montre une ségrégation composée notamment de révertants ayant restauré les formes parentales, ainsi que de plantes dans lesquelles une forme remaniée du mitogénome est devenue prédominante. Ces résultats suggèrent que, dans la première génération de mutants, les formes recombinées du génome sont encore minoritaires et peuvent donc être éliminées par réinsertion d'un allèle sain. On peut supposer que si un shift stœchiométrique a lieu ensuite, la forme recombinée deviendra prédominante, et l'ajout d'un allèle sain ne permettra pas de retour en arrière. C'est ce qui a été observé pour les mutants *osb1*, affectés dans l'expression d'une protéine de type "ssDNA-binding" spécifique des organelles des plantes (Zaegel et al., 2006). Des études de l'ADNmt de plantes issues du rétrocroisement de *oex1-1* sont prévues afin de confirmer que la stœchiométrie du génome est restaurée elle aussi. Il serait également intéressant de réaliser ces rétrocroisements sur des plantes plus affectées, mais leur phénotype rend cette expérience infaisable.

Chez les plantes *oex1-1* nous avons également observé des mitochondries plus petites que chez les plantes sauvages, ce qui a déjà été observé dans les mutants *osb1* (Zaegel et al., 2006). Une hypothèse pouvant être avancée est que les mitochondries altérées étant moins performantes que les saines, un signal rétrograde est perçu par le noyau qui augmente alors le taux de division des mitochondries, dans le but de compenser un manque d'énergie (Barr et al., 2005; Zaegel et al., 2006).

Me basant sur des expériences de localisation subcellulaire d'OEX1 réalisées dans *Nicotiana benthamiana* avant mon arrivée au laboratoire, j'ai réalisé des expériences en supposant que OEX1 était adressée à la fois à la mitochondrie et au chloroplaste. Mais la localisation par transformation stable d'*Arabidopsis* que j'ai réalisé en fin de thèse nous a montré qu'en réalité OEX1 semble être strictement mitochondriale. Ainsi, l'analyse de l'hémi-complémentation de

plantes *oex1-1* par une construction ne permettant l'adressage d'OEX1 que dans les chloroplastes et l'analyse de double mutants *oex1 oex2* ne semblent plus aussi pertinentes. Cette nouvelle information nous permet néanmoins de nous interroger sur la pertinence des résultats de localisation en expression transitoire et lorsqu'ils sont réalisés sur un autre modèle que celui étudié. L'étude de la localisation par expression transitoire dans les cellules foliaires de *N. benthamiana* est couramment utilisée car plus rapide et plus simple à mettre en place, et ne nécessite pas d'attendre que la plante transformée produise des graines, ni de sélectionner les transformants. Cependant, même si cette technique produit des résultats pertinents dans la majorité des cas, nous avons ici un exemple qui montre qu'une seconde expérience, impliquant une transformation stable de l'organisme étudié, est nécessaire pour valider les résultats.

Lors des expériences d'hémi-complémentation, nous avons observé un retour à un phénotype sauvage lorsque OEX1 est adressée strictement à la mitochondrie et un phénotype mutant lorsque OEX1 est strictement chloroplastique. Ces résultats corrélerent avec ceux obtenus lors de la localisation dans *Arabidopsis* et nous confirment que OEX1 joue un rôle prépondérant dans la mitochondrie. Des analyses par qPCR du génome mitochondrial des plantes hémi-complémentées sont prévues afin confirmer la restauration totale du phénotype sauvage. L'expérience de complémentation permettant l'expression de OEX1 sous promoteur endogène ($Pro_{OEX1}:OEX1$) nous a permis de confirmer que les phénotypes observés étaient la conséquence de l'absence de OEX1 dans la plante. Cependant, il n'y a pas de complémentation lorsque l'expression de OEX1 est sous contrôle d'un promoteur fort ($Pro_{35S}:OEX1$). Nous avons pensé dans un premier temps à un possible "silencing", mais l'immuno-détection menée avec l'anticorps anti-OEX1 montre la présence de la protéine dans ces plantes. L'absence de complémentation vient probablement du fait que OEX1 joue un rôle important dans les premiers stades de développement de la graine, stade durant lequel le promoteur P35S est faible. Les résultats des analyses de l'expression de OEX1 par fusion promoteur:GUS montrent qu'effectivement cette protéine est principalement exprimée dans les tissus jeunes, à division rapide et nécessitant donc une forte activité des mitochondries. Lorsque OEX1 est absent, la mitochondrie ne pourrait plus fournir suffisamment d'énergie à des tissus comme le pistil ou les anthères pour produire des gamètes viables, expliquant le très faible taux de fertilité des mutants. Pour confirmer cette hypothèse, ce serait intéressant de tester les capacités

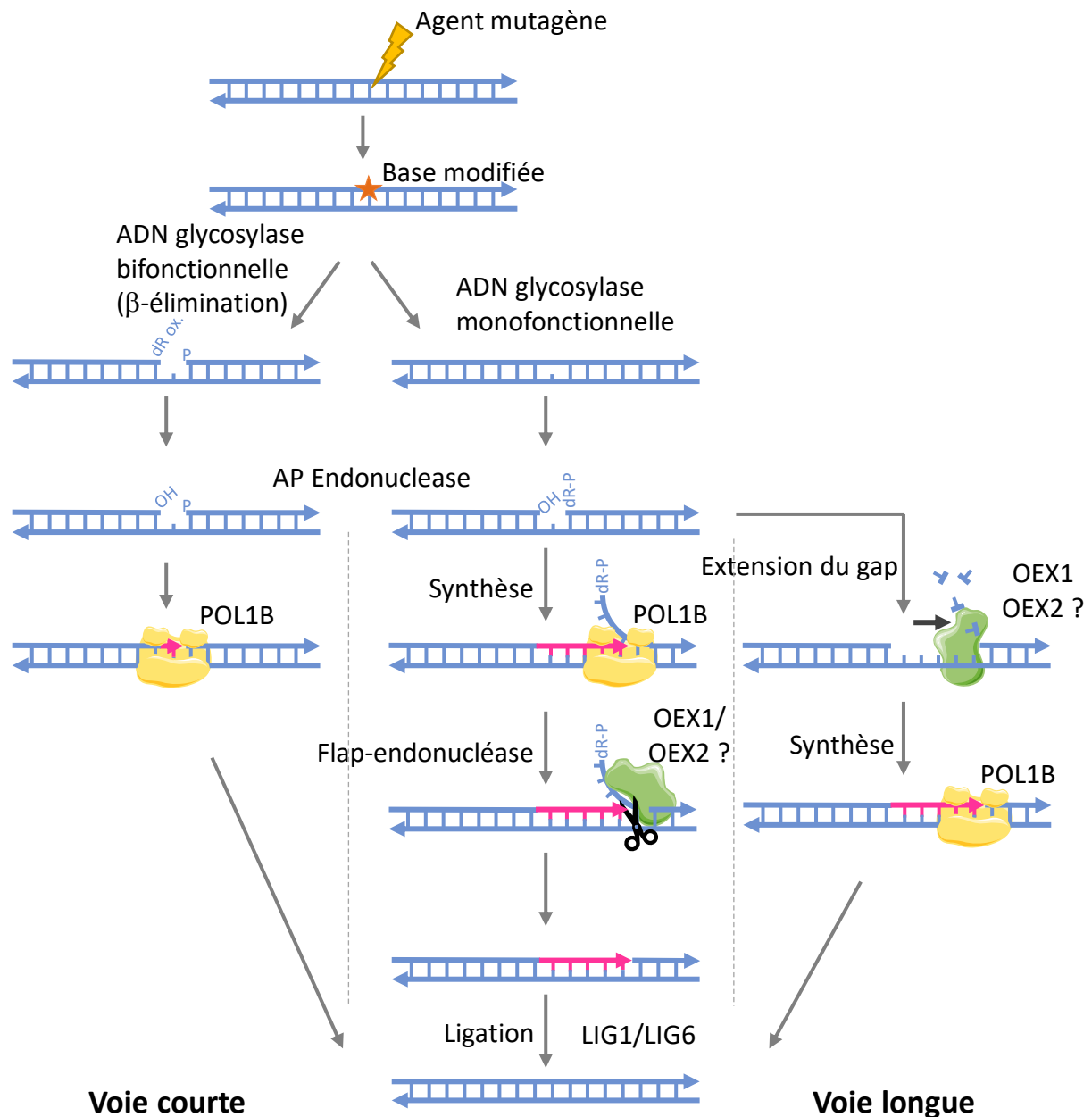


Figure D1. Proposition de mécanisme du BER dans les organelles.

Les bases modifiées, suite à l'action d'un agent mutagène, sont excisées par une ADN glycosylase monofonctionnelle ou bifonctionnelle. Les premières excisent la base tandis que les secondes clivent le site abasique en 3' de la lésion pouvant laisser une unité désoxyribose oxydée (dR ox.) en 3'. Ensuite, dans les 2 cas, une AP-endonuclease crée une extrémité OH en 3' utilisable par l'ADN polymérase. Dans la voie courte du BER, l'ADN polymérase comble le gap. Lors de la voie longue, l'ADN polymérase déplace le brin sur une dizaine de nucléotides formant une structure flap clivée par OEX1 dans la mitochondrie et possiblement OEX2 dans le chloroplaste. Une seconde hypothèse est la dégradation du brin altéré par OEX1/OEX2 avant la synthèse par l'ADN polymérase. Le BER se termine par la ligation des brins par une ligase, LIG1 dans la mitochondrie et LIG6 dans le chloroplaste. D'après Chevigny et al., 2020.

respiratoires des mitochondries purifiées des mutants et des mutants complémentés comparées aux mitochondries des plantes sauvages.

III. L'implication de OEX1 dans la réplication et les mécanismes de maintenance de l'ADN mitochondrial

III.1 Implication de OEX1 dans les mécanismes du BER et du RER

Le BER est un mécanisme principal de réparation des lésions de l'ADNmt. Dans les mitochondries de plantes, une activité BER a été détectée (Boesch et al., 2009; Ferrando et al., 2019). Ce mécanisme peut emprunter deux voies, la voie courte n'éliminant qu'une base ou la voie longue durant laquelle, après excision de la base altérée, plusieurs nucléotides sont remplacés. Lorsque la voie longue est empruntée, la polymérase déplace le brin déjà existant, formant une structure de type flap qui est ensuite clivée par une flap-endonucléase. Il a été montré que l'ADN polymérase I d'*E. coli*, dont le domaine 5-3' exonucléase est similaire à OEX1, est capable de réaliser ce clivage (Bhardwaj et al., 2018).

Dans les mitochondries de plantes, c'est l'ADN polymérase POL1B qui semble la plus impliquée dans le mécanisme de réparation de l'ADN (Cupp and Nielsen, 2013; Parent et al., 2011; Trasviña-Arenas et al., 2018), mais elle est dépourvue du domaine permettant de cliver cette structure. Nos résultats ont montré que OEX1 était capable de reconnaître et de cliver la structure flap puis, dans un second temps, semble dégrader le produit simple brin qui résulte du clivage. Ces résultats suggèrent que OEX1 pourrait être impliquée dans une voie longue du BER. Dans toutes les voies du BER, la base modifiée est reconnue et clivée, laissant un site apurinique (AP). Les étapes suivantes créent un "gap" de 1 nucléotide dans l'ADN. Dans la voie longue du BER, deux modèles peuvent être proposés. Dans le premier, POL1B se lie à l'ADN et comble la lacune en allongeant le brin déjà existant, formant une structure de type flap, puis OEX1 intervient pour cliver la partie simple brin (Figure D1). Le second modèle met en jeu la coordination des activités polymérase de POL1B et exonucléase de OEX1, le brin en aval de la lésion est dégradé par l'activité 5'-3' exonucléase, pendant que la polymérase remplit le gap (Figure D1). Nos tests enzymatiques ont montré que OEX1 est capable de reconnaître et

allonger des gaps, mais de façon peu efficace. Le modèle de formation d'une structure de type flap est donc plus probable car l'activité flap-endonucléase de OEX1 semble plus efficace.

Les résultats obtenus par double hybride montrant une interaction entre OEX1 et POL1B nous confortent dans cette hypothèse. Cependant, si OEX1 semble être capable d'interagir avec POL1B, elle ne semble pas former de complexe stable. En effet, une étude des complexes protéiques de la mitochondrie d'*Arabidopsis* par gel "Bleu Natif" et identification des protéines par spectrométrie de masse a montré que OEX1 est présente dans un complexe de masse moléculaire inférieure à 100 kDa (Senkler et al., 2017). Comme l'ADN polymérase POL1B a une masse moléculaire de 117 kDa à elle seule, cela exclu une interaction stable entre ces protéines. Il faut cependant noter que cette étude a été réalisée dans des feuilles matures d'*Arabidopsis* et que le profil d'expression de *OEX1* montre que le gène est transcrit majoritairement dans les tissus jeunes et en division. Ainsi, d'éventuels partenaires protéiques de OEX1 peuvent ne pas être présents dans les feuilles matures et fausser ce résultat. Des tests supplémentaires sur l'interactome de OEX1 sont nécessaires. Pour cela les plantes *oex1* complémentées avec OEX1 fusionnée à un tag HA pourront être utilisées pour des expériences de co-immunoprécipitation et identification des possibles partenaires.

L'implication de OEX1 dans la voie du BER pourrait être étudiée en comparant le taux de modifications de bases dans l'ADN mitochondrial de plantes *oex1-1* et sauvages, car c'est le BER qui se charge de leur élimination. Pour cela, une étude des SNP ("single nucleotide polymorphisms") peut être envisagée. En effet, les modifications de bases présentes dans l'ADN peuvent, après répllication, induire des mutations ponctuelles si elles ne sont pas réparées. Ainsi, dans l'ADN d'un mutant d'un facteur impliqué dans la voie du BER, on peut s'attendre à voir une accumulation de SNPs en comparaison à l'ADN d'une plante sauvage. L'équipe dirigée par le Dr. Sloan (Université du Colorado) a mis au point un système de quantification des SNP dans le génome mitochondrial d'*Arabidopsis* (Wu et al., 2020) basé sur la méthode de "*duplex sequencing*" décrite par (Kennedy et al., 2014). Effectivement, pour être sûr qu'un SNP détectée soit bien une mutation ponctuelle et non le fruit d'une erreur de séquençage, chaque molécule d'ADN doit être séquencée plusieurs fois. Nous pourrions utiliser cette technique pour confirmer l'implication de OEX1 dans le BER. Cependant, cette technique nécessite une grande quantité de matériel, mais du fait du phénotype fortement altéré de *oex1* il nous est difficile de produire suffisamment de graines homozygotes pour une purification des mitochondries et l'extraction de quantités suffisantes d'ADNmt.

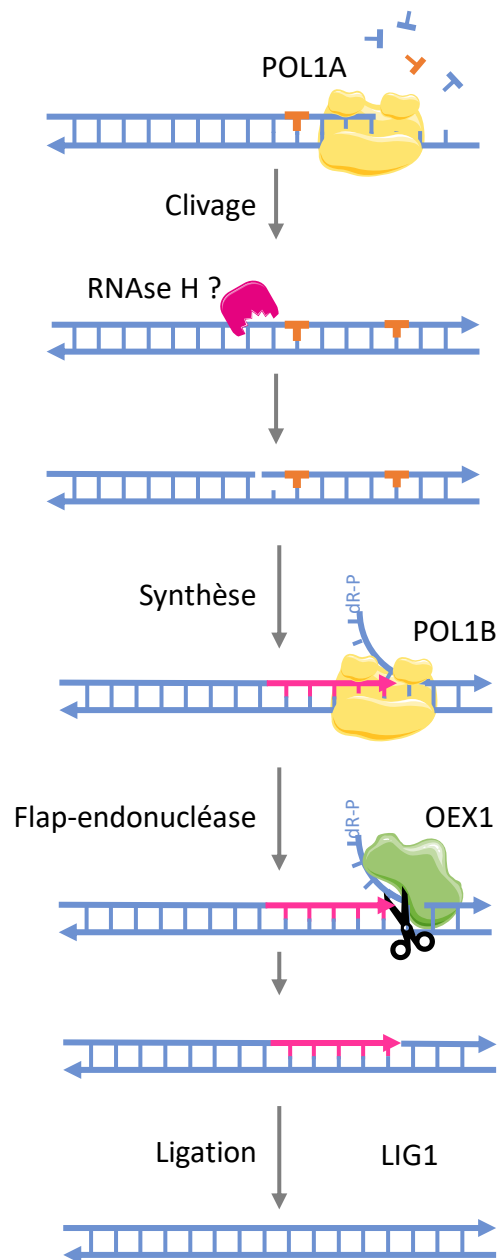


Figure D2. Proposition de mécanisme du RER dans la mitochondrie

Lors de la réplication, l'ADN polymérase POL1A peut incorporer par erreur des ribonucléotides dans l'ADN. Ces erreurs sont corrigées par le mécanisme du RER. Une RNase H non identifiée clive le brin altéré en amont de l'erreur. POL1B synthétise à nouveau un fragment d'ADN en déplaçant le brin comprenant les ribonucléotides, formant une structure flap qui peut être clivée par OEX1. Les deux segments sont liés par la ligase LIG1. L'ADN est en bleu ou rose et les ribonucléotides en orange.

L'activité flap-endonucléase de OEX1 pourrait également être impliquée dans la voie de réparation par excision de ribonucléotides (RER, pour "Ribonucleotide Excision Repair"). Bien qu'aucune étude ne fasse état de l'incorporation de ribonucléotides dans l'ADNmt de plante due à des erreurs d'incorporation par les ADN polymérases, il est très peu probable que ces polymérases en soit exemptes, car ce type d'erreur a été retrouvé chez des ADN polymérases très fidèles (Nick McElhinny et al., 2010; Vaisman et al., 2014). Le mécanisme du RER est très similaire à celui du BER et pourrait être présent dans les mitochondries. Chez les bactéries, lorsqu'il y a présence de ribonucléotides dans l'ADN, la RNase H clive le brin contenant l'incorporation, l'ADN polymérase I est alors recrutée et déplace le brin altéré en formant une flap. Cette structure est ensuite clivée par la flap-endonucléase. Ainsi, pour le mécanisme du RER dans les mitochondries d'*A. thaliana*, on peut proposer un modèle similaire à celui du BER et dans lequel la structure flap est clivée par OEX1 (Figure D2). Bien qu'aucune RNase H n'ait encore été montrée comme présente dans les mitochondries de plante, RNH1B semble un candidat potentiel (Kuciński et al., 2020). Des travaux de localisation ont échoué à montrer son adressage mitochondrial, mais comme nous avons pu en faire l'expérience avec OEX1, il est possible que les résultats soient faussés, considérant que ces expériences ont été réalisées par transformation transitoire dans des protoplastes d'*A. thaliana* et non par transformation stable. De plus, une telle activité est normalement nécessaire au bon fonctionnement d'un génome, il est donc peu probable qu'aucune RNase H ne soit présente dans les mitochondries végétales.

III.2 Implication de OEX1 dans la recombinaison homologue

L'activité flap-endonucléase est également nécessaire dans la voie de la recombinaison homologue (HR). Avec le BER, la HR est un des mécanismes centraux de la réparation et maintenance de l'ADNmt des plantes. Elle nécessite plusieurs activités nucléases pour son fonctionnement.

La première est une 5'-3' exonucléase en charge de la résection de brin au niveau d'une cassure double brin. Chez les bactéries, la résection des brins est assurée par le complexe RecBCD, ou RecJ si c'est la voie RecFOR qui est empruntée. Dans ces deux voies la processivité des complexes est élevée. Le complexe RecBCD, par exemple, peut dérouler l'ADN double brin et se déplacer à raison de 1,5 kb/s (Han et al., 2006; Karabulut et al., 2020).

Single Strand Annealing (SSA)

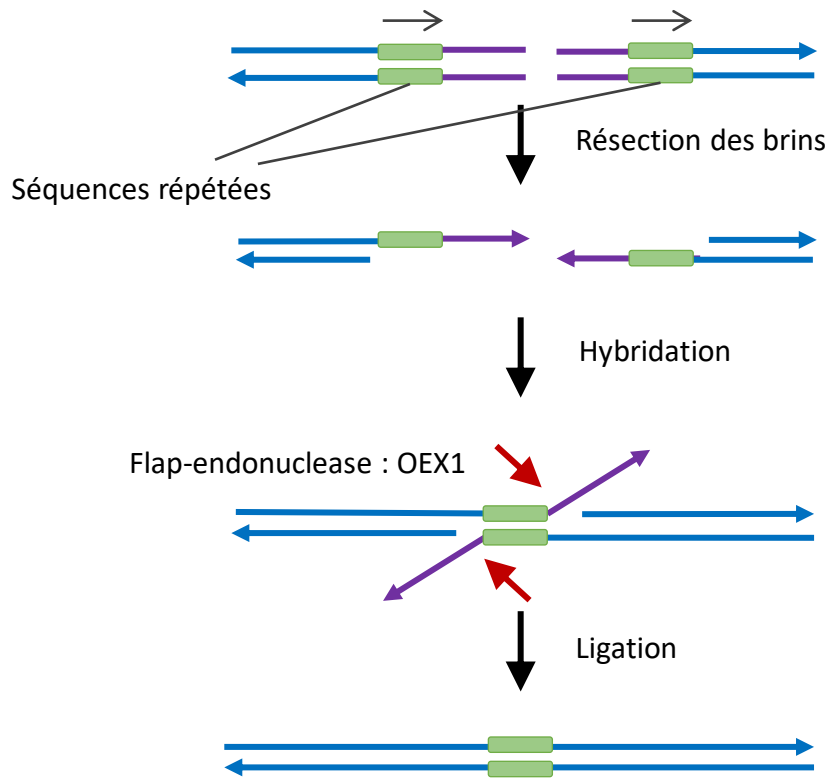


Figure D3. Schéma représentant la voie du SSA : Dans la voie du SSA, l'hybridation de deux séquences répétées a pour conséquence la formation de structures flap. Nous proposons que OEX1 peut résoudre ce type de structure par son activité flap-endoronuclease.

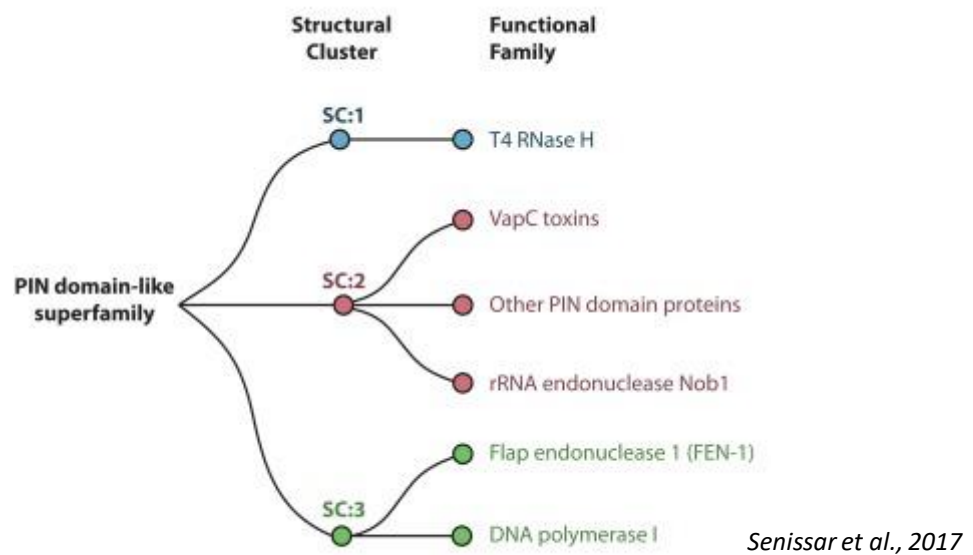


Figure D4. Arbre représentant les différentes familles de protéines contenant le domaine PIN. D'après Senissar et al., 2017.

L'activité 5-3' exonucléase de OEX1 reconnaît l'ADN double brin à coupe franche et dégrade un brin de 5' en 3', indiquant un possible rôle dans la résection des brins nécessaire à l'initiation de la recombinaison homologe. Cependant, chez les bactéries cette étape est très rapide, alors que les tests réalisés sur l'ADN double brin marqué en 3' nous montrent une activité de OEX1 plutôt distributive et non processive sur ce type de substrat. Son rôle dans la résection des brins est donc peu probable. Cependant il faut rappeler que ces tests ont été réalisés *in vitro*, dans des conditions artificielles. Il n'est pas exclu qu'*in vivo* OEX1 nécessite de s'associer à d'autres facteurs augmentant sa processivité, par exemple à des hélicases, comme c'est le cas dans le complexe RecBCD.

L'activité flap-endonucléase décrite précédemment, quant à elle, est également nécessaire dans certaines voies de la recombinaison homologe, notamment dans celle du SSA (Figure D3). Lorsque les séquences répétées s'hybrident, les parties simple-brin situées en 3' de celles-ci forment une structure flap. Cette section doit être clivée pour que la ligase puisse reconstituer un ADN double brin intègre. On peut donc suggérer un rôle de OEX1 dans la résolution de ce type d'intermédiaires de recombinaison (Figure D3).

III.3 Implication de OEX1 dans la maturation des fragments d'Okazaki

Le domaine PIN (PiLT N-terminus) d'une protéine est un domaine nucléase retrouvé dans tous les embranchements. Il est divisé en plusieurs sous-familles et on le retrouve notamment dans des facteurs de type RNase, flap-endonucléase ainsi que dans les ADN polymérases possédant une activité 5'-3' exonucléase (Senissar et al., 2017) (Figure D4). Il est très souvent retrouvé dans des enzymes qui clivent l'ARN de façon séquence-spécifique ou structure-spécifique. OEX1 contenant un domaine PIN, nous avons cherché à tester une potentielle activité de OEX1 sur les hybrides ARN:ADN. Les fragments d'ARN hybridés à l'ADN sont courants dans les génomes, ils sont notamment générés lors de la réplication par une primase et servent d'amorce sur laquelle l'ADN polymérase répliquative peut se fixer et initier la synthèse de l'ADN. C'est le cas dans la réplication de l'ADN mitochondrial des animaux (Falkenberg, 2018). Dans le cas de la réplication bidirectionnelle de l'ADN, les fragments d'Okazaki sont nécessaires à la réplication du brin retardé, mais délétères s'ils ne sont pas maturés. Une activité nucléase est donc nécessaire pour éliminer la partie ARN des fragments d'Okasaki. La réplication du génome mitochondrial d'*Arabidopsis* est décrite comme similaire à celle présente dans le

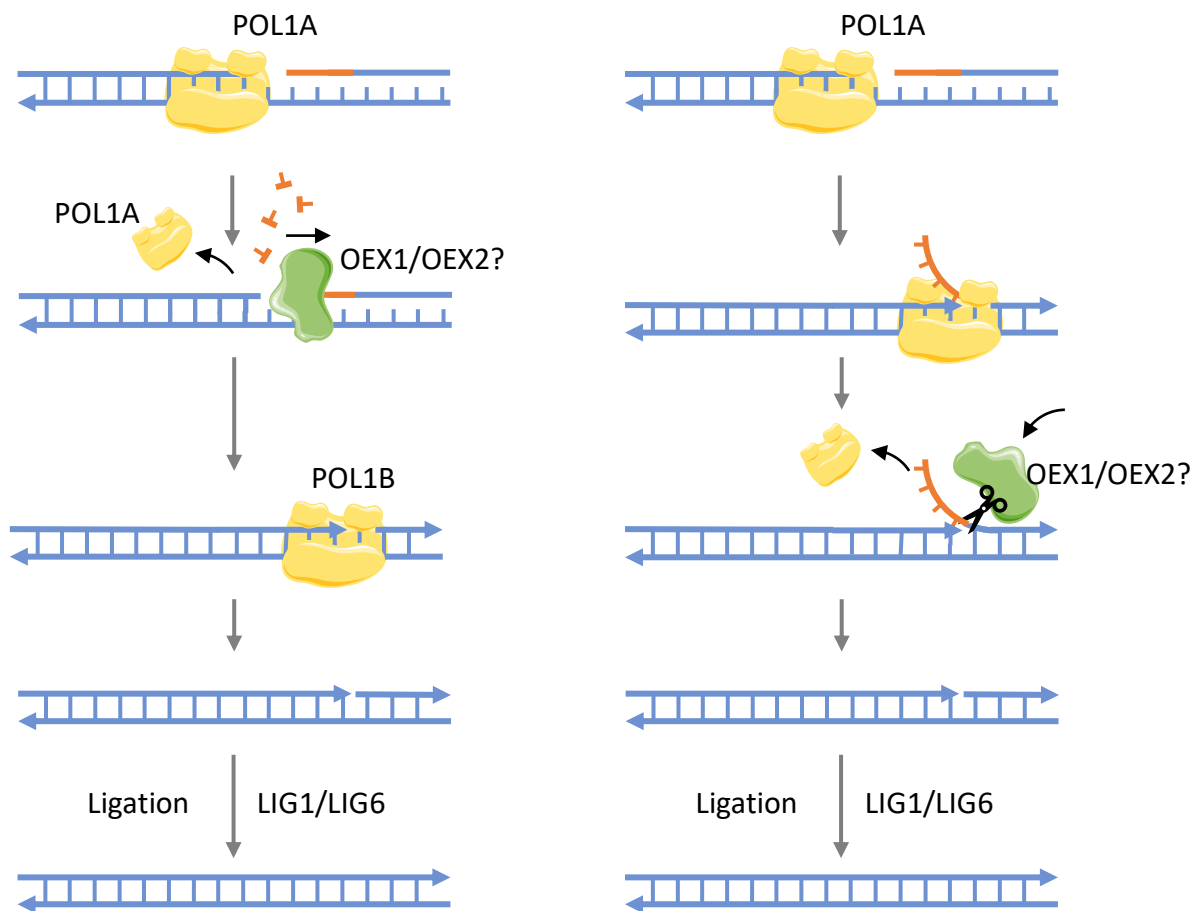


Figure D5. Proposition de mécanisme de maturation des fragments d'Okazaki chez les organelles. Lorsque l'ADN polymérase répliquative POL1A/B rencontre un fragment d'Okazaki, elle se détache et laisse place à une 5'-3' exonucléase qui va dégrader le brin ARN. Nous proposons que OEX1 soit cette nucléase dans les mitochondrie et que OEX2 joue ce rôle dans les chloroplastes. Une fois l'ARN dégradé, OEX1 laisse sa place à POL1B qui va combler le gap formé. Les brins sont liés par LIG1 dans la mitochondrie et LIG6 dans le chloroplaste. Un second modèle possible est représenté à droite, dans lequel POL1A/B continue la synthèse en déplaçant le brin ARN. Elle génère ainsi une structure flap qui est clivée par OEX1 dans la mitochondrie et possiblement par OEX2 dans le chloroplaste. Les deux brins sont liés par l'action des ligases. Les ADN sont schématisés en bleu et les ARN en orange.

bactériophage T7 (Morley et al., 2019). Chez ce phage, c'est la protéine codée par le gène 6 (gp6), une 5'-3' exonucléase possédant également une activité flap-endonucléase, qui est en charge de la maturation des fragments d'Okazaki (Mitsunobu et al., 2014a; Serwer et al., 1990). Nous avons testé dans un premier temps la capacité de OEX1 à reconnaître un hybride double brin ARN:ADN et avons ensuite testé son activité sur une structure mimant un fragment d'Okazaki dans une fourche de réplication, structure composée d'un brin d'ADN mimant le brin matrice sur lequel un brin d'ADN puis un brin d'ARN se succèdent (Figure R27). De par ces expériences, nous avons observé une dégradation très rapide du brin ARN, et OEX1 semble plus processive sur l'ARN que sur l'ADN. Bien que nous ayons marqué le brin d'ARN en 3', le produit final apparaît sans intermédiaire, suggérant une activité processive de OEX1 sur ce type de substrat, contrairement à l'activité distributive observée sur les substrats ADN. Comme le substrat mimant le fragment d'Okazaki est structuralement le même que celui mimant le gap d'ADN, nous avons comparé la processivité de la protéine sur les deux structures afin de confirmer que OEX1 dégrade l'ARN bien plus rapidement que l'ADN. Ces résultats suggèrent que l'élimination des séquences d'ARN hybridées à l'ADN est l'un des rôles principaux de OEX1. Le mécanisme de maturation des fragments d'Okazaki de la mitochondrie végétale pourrait donc être modélisé comme celui représenté en figure D5, pour lequel l'amorce ARN est dégradée petit à petit et non déplacée. Mais il n'est pas exclu que le modèle faisant intervenir l'activité flap-endonucléase existe et que les deux modèles co-existent. En effet, chez le bactériophage T7, c'est la flap-endonucléase gp6 qui reconnaît la structure et clive la partie ARN, or une activité nette de flap-endonucléase de OEX1 a été démontrée durant cette thèse. Il serait judicieux de générer un substrat de type flap mais dont la partie simple brin est un ARN tel que décrit par (Mitsunobu et al., 2014a) pour évaluer la possibilité de cette voie dans la maturation des fragments d'Okazaki.

Malgré la différence de vitesse de dégradation apparente entre les substrats ARN:ADN et ADN:ADN lors de nos tests d'activité, l'expérience visant à mesurer l'affinité de OEX1 pour l'un ou l'autre substrat nous montre des vitesses initiales de dégradation similaires. Il sera nécessaire de refaire l'expérimentation, en particulier en utilisant des concentrations croissantes en substrat compétiteur froid.

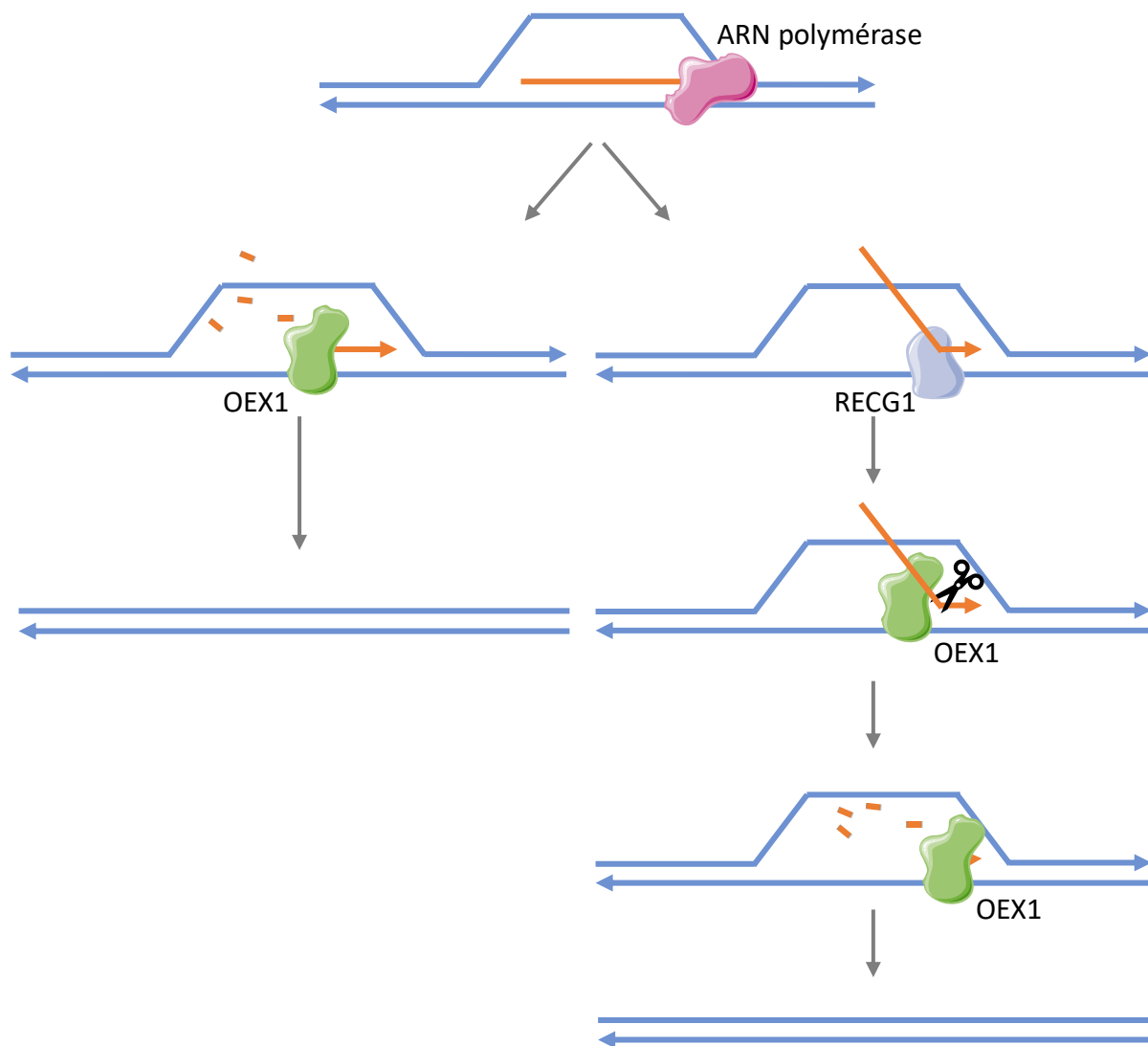


Figure D6. Proposition de modèles de résolution des R-loop faisant intervenir OEX1

Deux voies sont possibles pour la dégradation des R-loop dans les mitochondries de plantes. Dans un premier cas, OEX1 dégrade le segment ARN de 5' en 3'. Dans le second modèle, une hélicase comme RECG1 dissocie l'ARN de l'ADN, formant une structure flap. OEX1 clive cette structure et dégrade le bout d'ARN restant. L'ADN est en bleu et l'ARN en orange.

III.4 Implication de OEX1 dans l'élimination des R-loop

Du fait de la très forte activité de dégradation de l'ARN dans les hybrides ARN:ADN par OEX1, nous avons testé si cette enzyme pouvait être impliquée dans la résolution des R-loop. Ces structures, relativement fréquentes au niveau des régions transcrites, sont source d'instabilité (Drolet and Brochu, 2019; Gan et al., 2011). Nous avons dans un premier temps testé l'activité de OEX1 sur des structures mimant ces R-loop. Comme dans la R-loop que nous avons construit les ADN présentent des extrémités franches, nous avons utilisé des oligonucléotides biotinylés en 5' dans l'optique d'inhiber l'activité 5'-3' exonucléase de OEX1 sur la partie ADN double brin. Par ces expériences, nous avons observé une dégradation rapide du brin ARN dans la R-loop, ce qui suggère un rôle de OEX1 dans l'élimination des R-loop. Cette hypothèse a été confirmée par les résultats de DRIP-qPCR. Selon ces résultats, et au moins pour les régions très transcrites codant pour les ARN ribosomiques, il semble qu'il y a une accumulation de R-loop dans le mitogénome de *oex1-1* par rapport à celui du sauvage.

On peut donc proposer deux modèles d'action de OEX1 dans ce mécanisme. Dans un premier modèle, OEX1 pourrait agir comme une RNase H et dégrader l'ARN au sein de la structure (Figure D6). Un second modèle fait intervenir RECG1, une hélicase détectée dans les mitochondries de plantes, qui pourrait détacher l'ARN hybridé à l'ADN pour former une structure de type flap qui serait ensuite clivée par OEX1 (Figure D6). L'étude du phénotype et du taux de R-loop d'un double mutant *oex1 recg1* permettrait de voir si RECG1 est impliquée dans la maturation de R-loop. Les résultats du DRIP ayant été obtenus dans les dernières semaines de ma thèse, les croisements de mutants n'ont pas pu être menés pour le moment. Concernant le choix de l'analyse du DRIP par qPCR, le protocole sur lequel j'ai basé ma méthodologie conseille d'extraire environ 15 µg d'acides nucléiques à partir d'une culture de cellules humaines (Sanz and Chédin, 2019). Dans notre cas, nous travaillons avec des plantes entières, rendant l'extraction plus complexe que pour une culture cellulaire. En suivant le protocole décrit dans le chapitre Méthodes, à partir de 2 g de plantes il a été possible d'obtenir environ 10 µg d'acides nucléiques totaux. Or notre étude concerne uniquement l'ADN mitochondrial qui est minoritaire au sein des acides nucléiques totaux, nécessitant ainsi soit d'augmenter la profondeur de séquençage, soit de purifier des mitochondries de plantes en amont de l'extraction d'ADN. J'ai tenté à plusieurs reprises de purifier des mitochondries de mutants *oex1-1* mais nous avons rencontré plusieurs difficultés. Habituellement, lors de nos

purifications de mitochondries d'*Arabidopsis*, nous utilisons des fleurs ou des plantules qui sont des tissus riches en mitochondries et possédant peu de chloroplastes. Cette condition est impossible avec les plantes *oex1-1* car elles ne produisent qu'une dizaine d'inflorescences alors qu'une plante sauvage en compte une centaine. Il nous était également impossible de purifier des mitochondries à partir de plantules car le phénotype altéré de *oex1-1* n'est visible qu'à partir du stade 6 feuilles et que la stérilité du mutant nous empêche d'avoir suffisamment de graines homozygotes. Il est donc impossible de distinguer les 75 % de plantes non-homozygotes mutantes au stade plantule. J'ai donc essayé un enrichissement en mitochondries à partir de rosettes de plantes sauvages et mutantes. Bien que l'enrichissement en mitochondries soit significatif pour les plantes sauvages, la quantité d'ADN enrichi en ADNmt extrait à partir des plantes *oex1-1* était quasi-nulle. Ces résultats sont probablement dus au fort phénotype des mutants. Une solution est la complémentation de *oex1-1* par une construction sous promoteur inductible qui nous permettrait ainsi d'obtenir 100 % de graines homozygotes pour réaliser une purification de mitochondries sur des plantules *oex1*.

IV. Caractérisation de OEX2

La mutation du gène *OEX2* par la technologie CRISPR Cas9 nous a permis d'obtenir deux mutants provenant d'ARN guides différents. Le premier se caractérise par une délétion de 18 nucléotides à proximité du site actif. Cette délétion correspondant à exactement 6 codons, ne provoque pas de décalage du cadre de lecture, mais sa proximité avec le site actif impacte probablement la structure et l'activité de la protéine. En effet, par alignement de séquence nous remarquons que ces 6 codons sont peu conservés en termes de séquences, mais que leur présence et leur nombre sont quant à eux très conservés chez *OEX1* et *OEX2* et dans les domaines 5'-3' exonucléase des ADN polymérase I (encadré en rouge dans la figure D7). Leur présence joue certainement un rôle dans la conformation de la protéine et l'emplacement du site actif. Nous avons également reporté l'emplacement de cette délétion sur la structure du fragment 5'-3' exonucléase de l'ADN polymérase I (Figure D8), confirmant que cette délétion impacte très probablement l'activité de la protéine. Le second mutant obtenu par CRISPR-Cas9 présente un codon stop dans le premier exon, cette mutation engendre donc une protéine tronquée et inactive. Les mutants *oex2* présentent un phénotype sauvage. Les premiers

travaux de localisation de OEX1 nous suggérant un double adressage aux mitochondries et aux chloroplaste, nous avons supposé que le phénotype sauvage de *oex2* provenait d'une redondance des activités de OEX1 et OEX2 dans le chloroplaste. Dans cette optique nous avons croisés les deux mutants afin de caractériser le phénotype du double mutant *oex1 oex2*. Le double mutant présentait le phénotype habituel observé chez les mutant *oex1*. Dans le même temps nous avons obtenu le résultat de localisation de OEX1 en expression stable qui confirmait son absence dans le chloroplaste.

La redondance des activités avec OEX1 n'est donc plus une explication valable pour le phénotype sauvage du mutant *oex2*. Les exonucléases étant impliquées principalement dans les mécanismes de réparation, nous avons soumis des mutants *oex2* à un stress génotoxique causé par l'exposition à la ciprofloxacine. Des résultats préliminaires montrent une légère diminution de la capacité à développer les premières feuilles chez les mutants, ce qui pourrait indiquer un rôle de OEX2 dans la réparation du génome du chloroplaste. Ces expériences doivent être reproduites afin de confirmer ce résultat préliminaire.

Il est aussi possible que OEX2 soit redondante avec d'autres activités présentes dans le chloroplaste, par exemple avec la RNase H plastidiale RNH1C, qui a été montrée capable de maturer des structures R-loop (Yang et al., 2017). Il serait donc intéressant de tester la double mutation *oex2 rnh1C*.

OEX2 étant composée des mêmes domaines PIN et H3TH que OEX1, nous avons voulu tester son activité sur différents substrats pour comprendre son rôle au sein du chloroplaste. Malheureusement la protéine recombinante que nous avons générée est insoluble et malgré tous les essais, nous n'avons pas réussi à l'obtenir dans une fraction soluble. Nous gardons cependant un espoir de pouvoir réaliser des tests d'activité avec OEX2, car une étudiante en stage de master dans notre laboratoire a réussi à exprimer et purifier la protéine OEX2 orthologue provenant du maïs. En effet, les séquences de gènes codant pour des protéines similaires varient d'une espèce à l'autre, pouvant ainsi faire varier la solubilité d'une protéine lors de l'expression en *E. coli*. Cette étudiante a donc tenté de purifier la protéine OEX2 d'*Arabidopsis*, de riz et de maïs dans la souche Arctic Express. La protéine recombinante de maïs obtenue est pure et relativement concentrée, nous ouvrant ainsi la possibilité de réaliser des tests d'activité.

Pour finir, des résultats publiés dans une étude font état de la présence de OEX2 dans les nucléoïdes de chloroplastes (Majeran et al., 2012). Comme les nucléoïdes des chloroplastes

contiennent les éléments essentiels à la maintenance et expression du l'ADNcp (Pfalz and Pfannschmidt, 2013), nos hypothèses d'un rôle de OEX2 dans la réparation du génome chloroplastique sont confortées.

V. Conclusions

D'après les résultats obtenus durant ma thèse, il paraît évident que OEX1 joue un rôle fondamental dans la réplication, la maintenance et la réparation du génome mitochondrial d'*A. thaliana*. Nous proposons ainsi plusieurs modèles impliquant OEX1 dans la voie longue du BER, soit par son activité flap-endonucléase, soit par extension de gap grâce à l'activité 5'-3' exonucléase. Nous pensons également qu'elle joue un rôle dans la résolution des intermédiaires de recombinaison de la HR de par son activité flap-endonucléase. Enfin, sa capacité à dégrader les ARN hybridés à une séquence d'ADN suggère qu'elle est impliquée dans la maturation des fragments d'Okazaki, ainsi que dans l'élimination des R-loop. Il est important cependant de noter que les résultats des tests d'activité ont été obtenus par des expériences *in vitro* et qu'ils peuvent donc différer de la réalité biologique observée dans les mitochondries de plantes. C'est pourquoi les expériences de DRIP, ainsi que d'autres expériences *in vivo*, comme l'identification de SNPs par séquençage et l'étude des partenaires de OEX1, devraient nous aider à mieux comprendre ses fonctions dans la mitochondrie d'*Arabidopsis thaliana*. Les futurs travaux sur OEX2 nous permettront aussi de comprendre ses éventuels rôles dans le chloroplaste. Mais considérant le chemin parcouru, les travaux que j'ai développés pendant ma thèse nous ont permis de significativement avancer dans notre compréhension des mécanismes de maintenance du génome mitochondrial des plantes.

Matériel

I. Matériel bactérien

I.1 La souche GV3101 d'*Agrobacterium tumefaciens*

Pour la transformation de plantes d'*Arabidopsis thaliana* (*Arabidopsis*) par floral-dip (Clough and Bent, 1998), la souche GV3101 dérivant de la souche C58C1 d'*Agrobacterium tumefaciens* a été utilisée. Elle possède un gène de résistance à la rifampicine ainsi que le plasmide Ti désarmé pMP90. Ce dernier code pour les gènes de virulence nécessaires au transfert de l'ADN-T dans les cellules végétales et porte le gène de la résistance à la gentamycine. Ces agrobactéries ont été transformées selon la technique décrite dans la partie Méthodes I.3.

I.2 La souche TOP10 d'*Escherichia coli*

La souche TOP10 a été utilisée pour l'ensemble des clonages visant à amplifier un plasmide. Les bactéries de cette souche ont été transformées par choc thermique selon la technique décrite dans la partie Méthodes I.1. La souche TOP10 est déficiente pour le gène *recA1*, limitant les recombinaisons non-désirées risquant d'éliminer la construction intégrée, et pour le gène de l'endonucléase *endA1*, conférant la stabilité des plasmides. Elle contient aussi la mutation *lacZΔM15* qui permet l'α complémentation et la sélection blanc-bleu des colonies recombinantes en présence d'IPTG et de X-gal. Elle est résistante à la streptomycine.

TOP10 : F-*mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) φ80*lacZΔM15* Δ*lacX74* *recA1* *araD139* Δ(*ara leu*) 7697 *galU* *galK* *rpsL* (Str^R) *endA1* *nupG*

I.3 La souche BL21 (DE3) d'*Escherichia coli*

La souche BL21 (DE3) a été utilisée pour l'expression et la purification de protéines. Grâce au gène codant pour l'ARN polymérase du phage T7 sous contrôle du promoteur *lacUV5* (un promoteur inductible à l'IPTG), elle permet le contrôle de la transcription du gène et de la production de la protéine d'intérêt. Cette souche est déficiente dans les gènes codant pour les protéases Lon et ompT, la rendant idéale pour de la surproduction de protéines.

BL21(DE3): F⁻ *ompT* *hsdS_B* (*r_B⁻m_B⁻*) *gal* *dcm*

I.4 La souche Rosetta (DE3) pLysS d'*Escherichia coli*

La souche Rosetta a été utilisée pour l'expression et la purification de protéines. Elle dérive de la souche BL21 mais possède un plasmide supplémentaire codant pour des ARNt reconnaissant des codons fréquents chez les eucaryotes mais rares chez les procaryotes. Le plasmide pLysS code également pour le lysozyme du phage T7, permettant de s'affranchir de l'expression basale hors conditions d'induction. Cette souche est résistante au chloramphénicol.

Rosetta(DE3) pLysS : $F^- ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B^- m_B^-) \lambda(DE3 [lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5]) [malB^+]_{K-12}(\lambda^S)$ pLysSRARE[T7p20 ileX argU thrU tyrU glyT thrT argW metT leuW proL ori_{p15A}](Cm^R)

I.5 La souche ArcticExpress (DE3) d'*Escherichia coli*

La souche ArcticExpress a été utilisée pour l'expression et la purification de protéines. Grâce au gène codant pour l'ARN polymérase du phage T7 sous contrôle du promoteur *lacUV5* (un promoteur inductible à l'IPTG), elle permet le contrôle de la transcription du gène et de la production le contrôle de la transcription du gène et de la de la protéine d'intérêt. Cette souche contient les gènes *cpn10* et *cpn60* codant pour des protéines chaperonnes GroES et GroEL actives à basse température, permettant l'aide au repliement de la protéine en induisant à 14 °C. Cette souche est déficiente dans les gènes codant pour les protéases Lon et ompT, la rendant idéale pour de la surproduction de protéines.

ArcticExpress(DE3) : $F^- ompT hsdS_B(r_B^- m_B^-) dcm^+ Tet^R gal \lambda(DE3) endA Hte [cpn10 cpn60 Gent^R]$

II. La levure *Saccharomyces cerevisiae* de souche AH109

La souche de levure AH109, de signe sexuel MATa a été utilisée pour les tests d'interaction par double hybride. Elle contient les gènes rapporteurs *HIS3*, *ADE2*, *LacZ* et *MEL1*. Elle est déficiente dans les voies de biosynthèses de la leucine et du tryptophane.

AH109 : MATa, *trp1-901*, *leu2-3*, *112*, *ura3-52*, *his3-200*, *gal4Δ*, *gal80Δ*, *URA3::MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-LacZ*, *LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3*, *GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2*

III. Matériel végétal

III.1 Conditions de culture des plantes d'*Arabidopsis thaliana*

Les plantes d'*A. thaliana* d'écotype Columbia (Col-0) sont cultivées soit en terre soit en milieu *in vitro*. Les plantes cultivées en terre sont exposées à une photopériode jours-longs, soit 16 heures d'exposition à la lumière à 21 °C et 8 heures à l'obscurité à 18 °C, ou en cycle de 12 heures d'exposition à la lumière à 21 °C et 12 heures à l'obscurité à 18 °C. Les plantes sont exposées à la lumière de néons (Osram BioluxT5) ou de LED (Philips LEDtube SA1 Master). Les plantes cultivées *in vitro* sont exposées à la lumière sous néons durant 16 heures à 21 °C et sont à l'obscurité durant 8 heures à 17 °C.

III.2 Mutant d'insertion d'ADN-T *oex1* d'*Arabidopsis thaliana*

Le mutant *oex1-1* (GK_911E05) d'*A. thaliana* (écotype Columbia Col-0) provient de la collection GABI-Kat (Kleinboelting et al., 2012) de l'université de Bielefeld, distribué en Europe par le Nottingham Arabidopsis Stock Center (NASC).

IV. Milieux de culture

IV.1 Milieu YPD

Pour la culture de levures, le milieu YPD ou "Yeast extract Peptone Dextrose" est utilisé (1 % (p/v) extrait de levure, 2 % (p/v) peptone, 2 % (p/v) glucose). C'est un milieu complet contenant tous les acides aminés nécessaires à la croissance des levures. Il peut être supplémenté de 1,5 % (p/v) d'agar afin d'en faire un milieu gélosé.

IV.2 Milieu SD

La sélection des levures se fait par croissance sur milieu minimum supplémenté en certains acides aminés. Pour cela, le milieu SD ("Synthetic Defined")(Sigma-Aldrich®, Saint-Louis, Missouri, États-Unis) est utilisé, il est composé de SD-Lac 1X; de glucose 2 % et de base d'azote de levure à 6,7 g/L, sans acides aminés. Il est complété avec différents mélanges d'acides

aminés, dépourvus de leucine (SD-L ; 1,62 g/L), de tryptophane (SD-W ; 0,74 g/L), des deux (SD-LW; 0,65 g/L) et sans histidine (SD-LWH ; 0,62 g/L). Le pH est ajusté à 5,8. Le milieu peut être supplémenté de 1,5 % (p/v) d'agar afin d'en faire un milieu gélosé.

IV.3 Milieu MS

La culture des plantes *in vitro* se fait sur milieu gélosé MS (Murashike et Skoog). Le milieu est composé de micro- et macro-éléments disponibles sous forme de poudre pré-mélangée M0255 (Duchefa Farma®, Haarlem, Pays-Bas) à laquelle on ajoute 1 % (p/v) de saccharose. Le pH est ajusté à 5,8. Le milieu peut être supplémenté de 0,8 % d'agar afin d'obtenir un milieu MS gélosé.

V. Vecteurs plasmidiques et outils génétiques

V.1 pGEM-T Easy

Pour le clonage de produit de PCR, le vecteur pGEM-T Easy (Promega®, Madison, Wisconsin, États Unis) est utilisé. Le vecteur est vendu linéarisé avec des extrémités 3'-sortantes composées d'une thymidine permettant l'insertion directe de produits de PCR générés avec les *Taq* ADN polymérases classiques, qui normalement ajoutent un A supplémentaire en 5' des produits d'amplification. Le pGEM-T Easy est un vecteur à haut nombre de copies, il est idéal pour multiplier un plasmide. Le site d'insertion se trouve au milieu du gène codant pour le peptide alpha de la β galactosidase, permettant l'inactivation de ce dernier en présence de l'insert. Cela permet d'effectuer une sélection par coloration blanc-bleu décrite en I.4. Il porte également le gène de résistance à l'ampicilline.

V.2 pDONR/Zeo

Pour le clonage de type Gateway® (Walhout et al., 2000) décrit dans le chapitre Méthodes section V.9, le vecteur donneur pDONR/Zeo a été utilisé. Il contient les sites AttP1 et AttP2 nécessaires à la réaction de recombinaison avec les sites AttB1 et AttB2 qui flanquent la séquence à insérer. Le vecteur contient le gène suicide *ccdB* codant pour une protéine capable d'interférer avec l'ADN gyrase bactérienne (Bernard and Couturier, 1992) qui est toxique pour

les souches de bactérie courantes. Ce gène est éliminé lors de la recombinaison permettant ainsi de sélectionner les bactéries possédant le vecteur contenant l'insert. Le pDONR/Zeo possède un gène de résistance à la zéocine pour sa sélection.

V.3 pGWB13, pGWB14 et pGWB604

Les plasmides de type pGWB sont des vecteurs binaires de destination, utilisés dans le cadre de clonages Gateway®. Ils contiennent les sites AttR1 et AttR2 nécessaires pour la recombinaison avec les séquences AttL1 et AttL2 présentes dans le vecteur donneur. Ces deux sites flanquent le gène suicide *ccdB*. Les vecteurs de type pGWB codent pour le gène de la résistance à la kanamycine. Le vecteur pGWB13 ne contient pas de promoteur, permettant d'en insérer un spécifique, alors que le pGWB14 contient le promoteur de l'ARN 35S du CaMV ("Cauliflower Mosaic Virus"). Les deux vecteurs ajoutent une étiquette HA en C-terminal de la protéine recombinante. Ils ont été utilisés dans les expériences de complémentation du mutant *oex1*. Le pGWB604 quant à lui permet la fusion de la protéine d'intérêt à la GFP en C-terminal, et ne possède pas de promoteur intégré. Ce dernier a été utilisé pour les expériences de localisation de la protéine OEX1 sous promoteur endogène par transformation stable de plantes d'*A. thaliana*. Ces plasmides contiennent le gène *bar* de *Streptomyces hygroscopicus*, codant pour une phosphinothricin N-acetyltransferase qui confère la résistance à l'herbicide glufosinate, permettant la sélection des plantes transformées.

V.4 pGADgwT7 et pGBKgwT7

Dans les expériences d'interaction protéiques par l'approche de double hybride de levure, les vecteurs pGADgwT7 et pGBKgwT7 ont été utilisés. Ils possèdent tous deux le gène suicide *ccdB* entouré par les sites AttR1 et AttR2 nécessaires au clonage Gateway®. Ils permettent d'exprimer des protéines de fusion avec le domaine activateur (pGADgwT7) ou avec le domaine de liaison à l'ADN (pGBKgwT7) du facteur de transcription GAL4, sous contrôle du promoteur constitutif ADH1. Les protéines de fusion contiennent en plus une étiquette HA en position N-terminale. La sélection du pGADgwT7 dans la bactérie se fait par résistance à l'ampicilline et par la présence du gène *LEU2* dans la levure. Quant au vecteur pGBKgwT7, la sélection dans la bactérie se fait par résistance à la kanamycine et par la présence du gène *TRP1* pour la sélection dans la levure.

V.5 pMDC162

Le vecteur pMDC162 a été utilisé pour l'étude de l'activité du promoteur *Pro_{OEX1}* dans *A. thaliana*. Il possède le gène suicide *ccdB* entouré par les sites AttR1 et AttR2 nécessaires au clonage Gateway®. Il permet la fusion d'un promoteur d'intérêt au gène rapporteur GUS codant pour la β -glucuronidase (Curtis and Grossniklaus, 2003). Le plasmide code pour le gène de résistance à la kanamycine permettant la sélection dans les bactéries et pour le gène de résistance à l'hygromycine permettant la sélection dans les plantes.

V.6 pET28a

Pour la surexpression et la production de protéines recombinantes dans *E. coli*, le vecteur pET28a a été utilisé. Il permet un haut niveau d'expression de la protéine d'intérêt fusionnée à une étiquette de poly-histidine en N-terminal. Cette étiquette est nécessaire pour l'étape de purification de la protéine par affinité au nickel, comme décrit dans le chapitre Méthode, section VII.8. L'expression de la protéine de fusion est régulée par le promoteur de l'ARN polymérase du phage T7. L'expression de cette dernière étant elle-même contrôlée par le promoteur *lac*, elle est réprimée par la protéine *lacI* en l'absence d'IPTG, un analogue de l'allolactose. Ce vecteur porte le gène de résistance à la kanamycine.

V.7 pKAMA-ITACHI Red

Ce vecteur est utilisé pour l'édition du génome d'*A. thaliana* par CRISPR/Cas9. Il code pour la protéine Cas9 sous contrôle du promoteur constitutif de la sous-unité S5 du ribosome (RPS5A), et pour l'ARN guide souhaité sous promoteur de l'ARNsn U6, permettant sa transcription par l'ARN polymérase III (Tsutsui and Higashiyama, 2017). L'insertion de la construction confère une résistance à l'hygromycine ainsi qu'une fluorescence des tissus oléagineux de la graine grâce à l'expression de la RFP ("Red Fluorescent Protein") sous contrôle du promoteur du gène *OLE1*.

V.8 Gènes de synthèse

La production de la protéine OEX2 étant compliquée du fait de son caractère insoluble, des gènes de synthèse codant pour la protéine OEX2 d'*A. thaliana* ainsi que pour les orthologues d'*Oryza sativa* (riz) et de *Zea mays* (maïs) et optimisés pour l'utilisation des codons d'*E. coli* ont été commandés via le site IDT (<https://eu.idtdna.com>).

V.9 Oligonucléotides

La liste des oligonucléotides utilisés pour les expériences de génotypage, d'amplifications de séquences, de qPCR et de tests d'activités est présentée en annexes 1 et 2.

VI. Outils informatiques

Les comparaisons et alignements de séquences, les assemblages informatiques des constructions, les analyses de restriction et la phylogénie ont été réalisés avec le logiciel MacVector (Mac Vector, Inc.).

Le logiciel PhyMLv3 a été utilisé pour générer les arbres phylogénétiques (<http://www.phylogeny.fr>) (Dereeper et al., 2008).

Les modélisations des structures de OEX1 ont été réalisées avec Pymol (<https://pymol.org>), à partir de la structure connue de l'ADN polymérase I de *Thermus aquaticus* (Kim et al., 1995).

Les quantifications relatives de bandes radioactives sur gel de polyacrylamide ont été réalisées à partir des images de phosphorimager grâce au logiciel ImageLab de Bio-Rad (Image Lab Software | Bio-recherche | Bio-Rad (bio-rad.com)).

Les recherches bibliographiques ont été menées dans la base de données PubMed, du NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Les études *in silico* des gènes d'*A. thaliana* ont été réalisées avec les bases de données TAIR (<https://www.arabidopsis.org>).

Les données de transcriptomique d'*A. thaliana* ont été consultées sur le site ePLANT (<https://bar.utoronto.ca/eplant>).

Le logiciel UNICORN 7.0 a été utilisé pour analyser les fractions de protéines résultant de la purification par gel filtration.

Les prédictions de localisation subcellulaire des protéines ont été faites grâce aux sites TargetP, Predotar et SUBA4.

<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP>

<https://urgi.versailles.inra.fr/Tools/Predotar>

<https://suba.live/suba-app/factsheet.html?id=AT3G52905.1>

VII. Microscopie

Les observations des organes et tissus de plantes dans le cadre d'analyses de phénotypes et de coloration GUS ont été menées à l'aide d'un loupe binoculaire Olympus sz2-ilst (Olympus Lifesciences, Tokyo, Japon).

Les observations de localisation intracellulaire et de sélection de transformants impliquant des protéines fluorescentes telles que la GFP ou la RFP ont été réalisées à l'aide d'un microscope confocal LSM700 (Zeiss, Jena, Allemagne). Dans la configuration utilisée, la GFP est excitée à 488 nm et observée à 504-540 nm, et la RFP est excitée à 555 nm et observée à 560-615 nm. Pour la co-localisation avec la chlorophylle, l'échantillon est excité à 488 nm et observé à des longueurs d'onde supérieures à 650 nm.

L'acquisition d'images des compartiments cellulaires a été menée à l'aide du microscope électronique à transmission Hitachi H7500 TEM (Hitachi, Krefeld, Germany). Les images ont été réalisées avec une tension de 80 kV grâce à la plate-forme "microscopie et imagerie cellulaire, par Mathieu Erhardt et Jérôme Mutterer.

Méthodes

I. Méthodes relatives aux bactéries

I.1 Transformation d'*Escherichia coli* par choc thermique

La transformation de bactéries par choc thermique consiste à stimuler l'entrée d'ADN dans les bactéries, en induisant une forte diminution du potentiel de membrane de ces dernières par passage d'un bain de glace à un bain chaud, en présence de CaCl_2 (Panja et al., 2006). En pratique, une aliquote de 50 μL de bactéries thermo-compétentes d'*E. coli* est ajouté à 50-200 ng du plasmide à transformer et incubées 30 min dans la glace, avant d'être plongées dans un bain-marie à 42 °C pendant 60 secondes, induisant le choc thermique. Les bactéries sont ensuite incubées 5 min dans la glace pour permettre le retour d'un potentiel de membrane normal avant d'y ajouter 700 μL de milieu SOC (2 % (p/v) tryptone ; 0,5 % (p/v) extrait de levure; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl_2 ; 20 mM glucose) et d'incuber une heure à 37 °C. Cette incubation a pour but de permettre aux bactéries de reconstituer leur paroi après le choc thermique ainsi que de leur laisser le temps de synthétiser l'agent de résistance aux antibiotiques de sélection. Les bactéries sont alors étalées sur milieu solide LB-agar additionné des antibiotiques permettant la sélection des bactéries transformées à la concentration indiquée dans le tableau T1

Pour les *E. coli* ayant intégré le plasmide pGEM®-T (Promega®), une sélection de type blanc-bleu est effectuée suivant la méthode décrite en I.4.

Les boîtes de Petri sont alors incubées pendant 12 h à 18 h à 37 °C.

I.2 Préparation d'agrobactéries thermo-compétentes

Une colonie d'*A. tumefaciens* de la souche GV3101 est mise en pré-culture dans 2 mL de milieu YEP (1 % (p/v) peptone ; 1 % (p/v) extrait de levure ; 0,5 % (p/v) NaCl) à 28 °C durant la nuit. Le lendemain, 500 mL de milieu YEP est inoculé à partir de la préculture puis mis à pousser à 28 °C jusqu'à obtenir une $\text{DO}_{600} = 0,5$. Le milieu est centrifugé 5 min à 5 000 g puis le culot est repris dans 100 mL de 150 mM NaCl. Après une nouvelle centrifugation, le culot est repris dans 10 mL de 20 mM CaCl_2 froid. Les bactéries sont prêtes pour une transformation par choc thermique, mais peuvent aussi être congelées dans l'azote liquide et conservées à -80 °C plusieurs semaines.

I.3 Transformation d'*Agrobacterium tumefaciens* par choc thermique

La transformation des agrobactéries par choc thermique est similaire au principe décrit en I.1 pour *E. coli*. Cent nanogrammes d'ADN plasmidique sont ajoutés à 200 µL d'agrobactéries thermo-compétentes puis le mélange est incubé 30 min dans la glace. Il est ensuite congelé dans l'azote liquide, puis incubé 3 min dans un bain-marie à 37 °C afin d'appliquer un choc thermique. Un millilitre de milieu YEP est ajouté aux bactéries transformées, puis celles-ci sont placées deux heures à 28 °C sous légère agitation. Cette étape permet aux bactéries d'exprimer le gène permettant la résistance à l'antibiotique de sélection. Le mélange est ensuite étalé sur des boîtes de Petri contenant du milieu LB complémenté avec l'antibiotique adéquat et mis à incuber deux à trois jours à 28 °C.

I.4 Sélection des bactéries transformées avec le vecteur pGEM®-T (Promega®)

Le vecteur pGEM®-T (Promega®) est à la base de tous nos clonages. Il est le premier vecteur dans lequel est insérée la construction d'intérêt. Il contient la séquence *LacZ'* codant pour l' α peptide de la β -Galactosidase dont la transcription peut être induite par l'IPTG. Elle est capable de compléter une forme déficiente de β -galactosidase codée par le chromosome de la bactérie hôte (mutation *lacZ* M15) pour former une β -galactosidase complète, une enzyme capable d'hydrolyser des β -galactosides en oses simples. Lorsque l'enzyme est mise en présence du substrat X-Gal, le produit de l'hydrolyse est bleu. Le plasmide acheté commercialement est linéarisé de façon à couper le gène *LacZ'* en deux, de sorte que l'insertion l'inactive. Ainsi, en ajoutant du X-Gal dans le milieu de culture, il est possible de discriminer les bactéries contenant un plasmide recombinant (blanches) de celles contenant le plasmide vide recircularisé (bleues). Pour cela, 0,08 mM d'IPTG ainsi que 10 µg/mL d'X-Gal sont additionnés au milieu LB solide. L'observation de la coloration et la sélection se fait le lendemain de l'étalement. Une incubation de quelques heures en chambre froide peut permettre une meilleure distinction de la couleur bleue.

I.5 Préparation de glycérol stocks

Afin de pouvoir conserver les bactéries transformées à long terme, 500 µL d'une pré-culture saturée de la bactérie d'intérêt sont ajoutés à 500 µL de glycérol stérile, le mélange (glycérol stock) est congelé dans l'azote liquide et stocké à -80 °C. Pour remise en culture, un petit

morceau de cellules congelées est récupéré avec un cure-dent stérile et étalé sur boîte de LB-agar contenant l'antibiotique de sélection adéquat.

II. Méthodes relatives aux levures

II.1 Préparation de levures chimio-compétentes

A l'aide d'une préculture lancée la veille, une culture de 50 mL dans le YPD (Matériel, IV.1) est ensemencée avec la quantité nécessaire de *Saccharomyces cerevisiae* pour obtenir une $DO_{600nm} = 0,2$. La culture est incubée à 30 °C jusqu'à atteindre une DO_{600nm} d'environ 0,6 puis les cellules sont sédimentées par centrifugation à 5 000 g. Le culot est lavé trois fois avec 2 mL d'eau stérile puis deux fois avec 2 mL de TE/LiAc 1X (1 mM EDTA ; 100 mM acétate de lithium; 10 mM Tris-HCl pH 7,5) avant d'être resuspendu dans 250 µL de TE/LiAc 1X.

Pour nos expérimentations, nous avons utilisé la souche de levure AH109.

II.2 Transformation de levures par choc thermique

Afin de transformer les levures *S. cerevisiae* rendues compétentes, 50 µL de levures sont mises en présence de 500 ng de plasmide, de 50 µg d'ADN de sperme de saumon soniqué et bouilli et de 350 µL de solution PEG/TE/LiAc (40 % (p/v) PEG-4000; 1 mM EDTA; 100 mM acétate de lithium; 10 mM Tris-HCl pH 7,5), puis le mélange est vortexé. Le choc thermique se fait à 42 °C pendant 20 min. Le mélange est ensuite centrifugé 30 secondes à 13 000 g, le culot est resuspendu dans 1 mL d'eau stérile et une aliquote de 100 µL est étalée sur milieu sélectif. Le plasmide pGADgwT7 permet aux levures de produire elles-mêmes de la leucine et le plasmide pGBKgwT7 permet aux levures de biosynthétiser du tryptophane. Les levures transformées avec les deux plasmides sont ainsi sélectionnées sur milieu SD-LW. Les levures sont incubées 48 h à 30 °C (Gietz and Schiestl, 2007).

II.3 Test d'interaction entre deux protéines par la technique du double hybride de levure

La méthode du double hybride de levure permet l'étude *in vivo* d'interaction entre deux protéines d'intérêt. Le principe repose sur la reconstitution du facteur de transcription GAL4 permettant l'expression du gène *HIS3* codant pour un facteur essentiel à la biosynthèse de

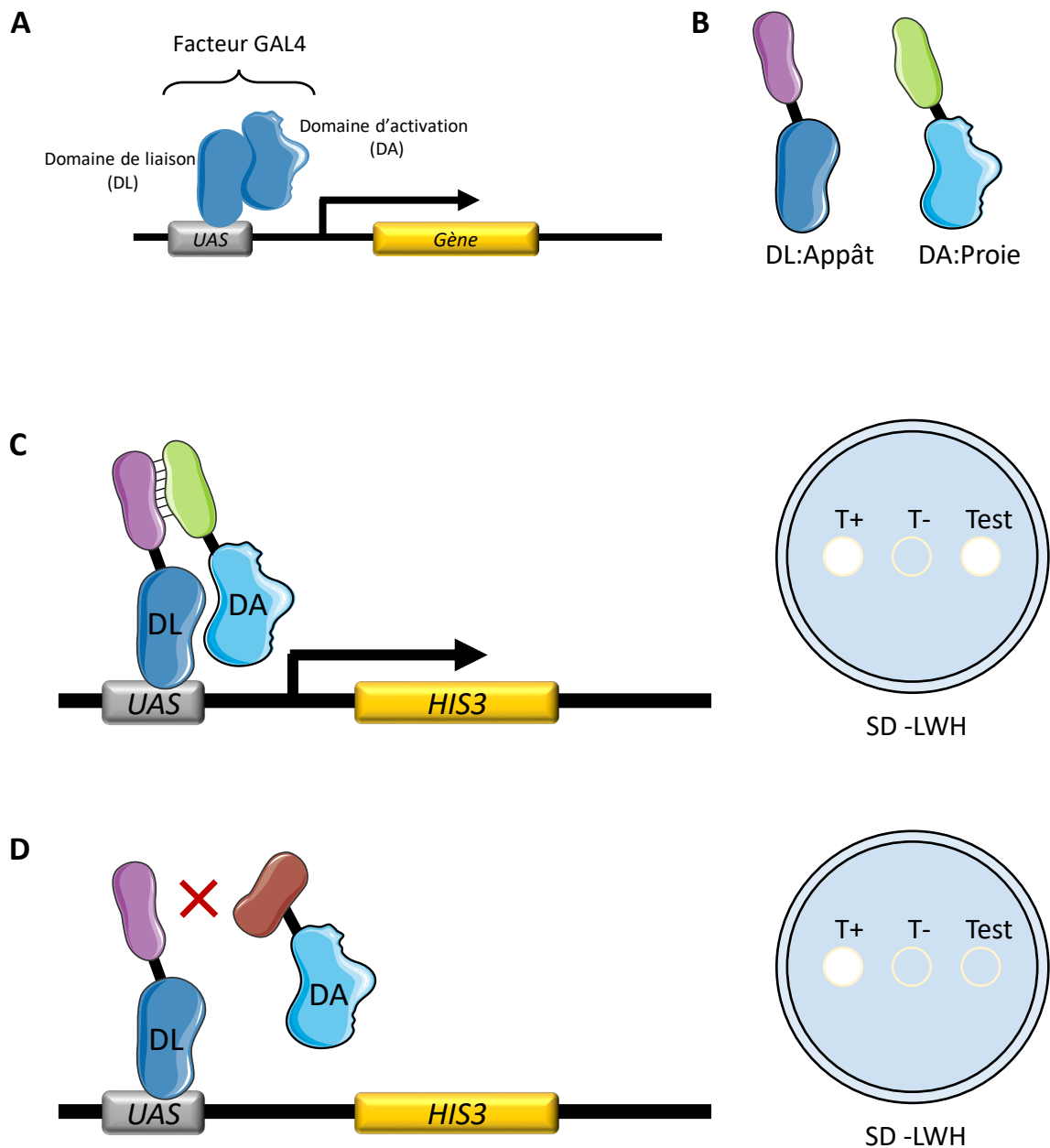


Figure MM1. Schéma résumant le principe du double hybride de levure

(A) Le facteur de transcription GAL4 de levure est composé d'un domaine de liaison à l'ADN et d'un domaine d'activation. Il reconnaît une séquence d'activation UAS en amont du gène et permet sa transcription. (B) Protéines de fusion entre la protéine appât et le domaine de liaison (DL), et entre la protéine proie et le domaine d'activation (DA). (C) Dans le cas d'une interaction entre les protéines appât et proie, le facteur GAL4 est reconstitué par rapprochement des deux domaines, activant la transcription du gène *HIS3*. Les levures peuvent alors pousser sur milieu SD-LWH sans histidine. (D) S'il n'y a pas d'interaction, le facteur GAL4 n'est pas reconstitué et les levures ne peuvent pas pousser sur milieu sélectif sans histidine.

T+ = témoin positif ; T- = témoin négatif ; SD -LWH = Milieu DS sans Leucine, Tryptophane et Histidine.

l'histidine. Cet acide aminé est nécessaire à la croissance de la levure et doit être synthétisé par celle-ci lorsque le milieu en est dépourvu. Pour ce faire, les deux protéines d'intérêt sont fusionnées chacune à un domaine de GAL4 : l'une au domaine d'activation et l'autre au domaine de liaison à l'ADN. Ainsi, dans le cas d'une interaction entre les deux protéines, elles créent un rapprochement des deux domaines et le facteur de transcription GAL4 est reconstitué, permettant la biosynthèse de l'histidine. La levure peut alors se développer et former des colonies. En cas de non-interaction, la levure ne poussera pas en milieu sélectif dépourvu d'histidine (Lin and Lai, 2017) (Figure MM1). Afin d'introduire les deux constructions codant pour les deux protéines de fusion à tester dans une seule et même levure, la méthode de co-transformation a été appliquée. La souche de levure AH109 est transformée comme décrit précédemment avec les deux plasmides à tester. Les transformants sont alors déposés sur milieu sélectif SD-LW permettant de ne sélectionner que les levures possédant les deux plasmides. Les colonies sont mises en préculture dans 3 mL de milieu sélectif approprié pendant la nuit, sous agitation à 220 rpm à 30 °C. Les cultures sont ensuite centrifugées à 4 000 g pendant une minute, puis le culot est repris dans 500 µL d'eau stérile. Enfin l'interaction entre les deux protéines d'intérêt est testée par dépôt de dilutions séquentielles (1 ; 1/10 ; 1/100 ; 1/1000) sur milieu gélosé SD-LWH. L'analyse des résultats se fait par observation de la croissance ou non des levures. Un dépôt sur boîte contenant le milieu gélosé SD-LWH supplémenté de 1 mM de 3-amino-1,2,4-triazole (3-AT) permet d'augmenter la stringence de l'interaction. Un contrôle négatif est nécessaire pour chaque protéine testée, il consiste en la conjugaison avec une levure contenant le plasmide vide.

III. Méthodes relatives aux plantes

III.1 Etude de l'activité d'un promoteur par fusion au gène rapporteur GUS

Afin d'étudier la spécificité tissulaire du promoteur d'un gène, il peut être fusionné à un gène rapporteur permettant la visualisation de son activité. Le gène *GUS* code pour la β -glucuronidase, une enzyme capable de cliver le X-Gluc pour donner un précipité de couleur bleue (Jefferson et al., 1987). La fusion du promoteur d'un gène d'intérêt au gène GUS permet d'indiquer dans quels tissus et à quels stades de croissance le promoteur est actif. La protéine GUS n'étant pas toxique, son expression n'altère en rien le développement de la plante. Afin

Antibiotique	Concentration	Usage
Ampicilline	100 µg/mL	Sélection bactérienne
Carbénicilline	200 µg/mL	Sélection transformant d'Arabidopsis
Céfotaxime	250 µg/mL	Sélection transformant d'Arabidopsis
Chloramphénicol	25 µg/mL	Sélection bactérienne
Ciprofloxacine	0,25 à 2 µM	Stress génotoxique sur Arabidopsis
Hygromycine B	15 µg/mL	Sélection transformant d'Arabidopsis
Kanamycine	50 µg/mL	Sélection bactérienne
Rifampicine	30 µg/mL	Sélection bactérienne
Spectinomycine	50 µg/mL	Sélection bactérienne
Streptomycine	50 µg/mL	Sélection bactérienne
Zéocine	25 µg/mL	Sélection bactérienne

Tableau T1. Liste des antibiotiques utilisés, leur concentration ainsi que leur domaine d'utilisation

d'obtenir des lignées stables, les plantes utilisées pour ce test sont transformées par la méthode du "floral-dip" décrite en III.3. Le plasmide codant le gène rapporteur utilisé est le pMDC162, les séquences des promoteurs d'intérêt y ont été insérées par clonage Gateway, décrit en V.9. Ce plasmide contient le gène *bar* qui confère la résistance à l'herbicide glufosinate, permettant la sélection des plantes transformées. Pour la visualisation de l'expression par coloration, des plantules âgées de quelques jours ainsi que les tissus à tester sont prélevés et déposés dans 1 mL de 90 % (v/v) d'acétone froid. Les échantillons sont laissés sur glace pendant 15 à 20 min. L'acétone est éliminée et remplacée par 1 mL de solution de rinçage (0,5 mM $K_3Fe(CN)_6$; 0,5 mM $K_4Fe(CN)_6$; 50 mM Na_2HPO_4 pH 7,2), puis par 1 mL de solution de coloration (0,5 mM $K_3Fe(CN)_6$; 0,5 mM $K_4Fe(CN)_6$; 2 mM X-Gluc; 50 mM Na_2HPO_4 pH 7,2). La solution de coloration doit totalement immerger les tissus à tester. Afin d'améliorer la pénétration du X-Gluc dans les cellules, les échantillons sont placés sous vide pendant une minute puis incubés la nuit à 37 °C et à l'obscurité. La solution de coloration est alors éliminée et une série de lavages à concentrations croissantes en éthanol (15 % ; 30 % ; 50 % et 70 % (v/v)) est effectuée. Les échantillons sont observés à la loupe binoculaire et peuvent être conservés plusieurs mois dans 70 % (v/v) d'éthanol.

III.2 Transformation transitoire de cellules végétales par biolistique

La transfection de cellules végétales par biolistique a pour principe l'envoi d'un plasmide codant la séquence d'intérêt dans les cellules de plante, à l'aide de billes d'or ou de tungstène. Ces billes sur lesquelles est précipité l'acide nucléique sont projetées à l'aide d'un canon à particules. Cette technique permet l'expression transitoire des séquences codées par le plasmide dans les cellules transfectées. Afin de préparer les billes, 10 µg de plasmide sont mis en présence de 20 à 30 µL d'une suspension de billes d'or de 1 µm de diamètre. A ce mélange sont ajoutés 3,8 M de $CaCl_2$ et 60 mM de spermidine, le tout est mis en incubation 20 min à 4 °C sous agitation. Afin d'éliminer les composants non fixés, les billes sont lavées quatre fois avec 1 mL d'éthanol absolu puis re-suspendues dans 35 µL d'éthanol absolu. Une aliquote de la suspension est utilisée pour bombarder une jeune feuille de *Nicotiana benthamiana*, disposée au préalable sur une boîte de Petri (face abaxiale vers le haut) contenant du milieu MS gélosé (4,9 g de milieu MS0255 Duchefa en poudre, 0,8 % (p/v) d'agarose, 1 % (p/v) de saccharose, pH 5,8). Le bombardement est effectué à l'aide du PDS-1000/He™ (BioRadR), sous

vide (0,1 bar) avec un disque de rupture calibré pour 1 100 psi. Les feuilles transformées sont incubées la nuit à 22 °C et à l'obscurité, afin de permettre l'expression des gènes portés par le plasmide, puis observées au microscope confocal.

III.3 Agrotransformation de plants d'*Arabidopsis thaliana* par la méthode du “floral-dip”

Une préculture de 3 mL d'*A. tumefaciens* de souche GV310, transformée avec un plasmide binaire contenant les constructions d'intérêt est préparée la veille. Elle est utilisée pour ensemençer 500 mL de milieu LB pour obtenir une $DO_{600nm} = 0,2$. La culture est effectuée à 28 °C sous agitation jusqu'à obtention d'une $DO_{600nm} = 0,8$. Les bactéries sont centrifugées pendant 20 min à 5 000 g, le culot est suspendu dans 10 mL de 10 mM $MgCl_2$, puis mélangé à 500 mL de solution de transformation composée de 5 % (p/v) saccharose et 0,04 % (v/v) de Silwett L-77®, un agent mouillant permettant d'améliorer les rendements de l'infection. Des plantes d'*A. thaliana* d'environ quatre semaines (possédant des jeunes hampes florales) sont utilisées pour la transformation. Le “floral dip” ayant pour objet la transformation des ovules de la plante (Desfeux et al., 2000), les graines déjà fécondées ne sont pas concernées. De ce fait, les siliques en formation sont coupées avant la transformation.

Les plantes préparées sont immergées quelques secondes dans la suspension d'agrobactéries, puis déposées sur du papier absorbant pour égoutter le surplus. Les plantes sont ensuite placées sous conditions habituelles de culture (voir chapitre Matériel section III.1) dans une mini-serre dont le fond est tapissé de papier absorbant imbibé d'eau afin de garantir une humidité suffisante. La mini-serre est entourée d'un voile opaque permettant de ne pas exposer les plantes à la lumière. Il est retiré après 48 heures et l'arrosage est stoppé environ deux semaines après transformation pour permettre aux siliques de sécher. Une fois les plantes séchées, les graines sont récoltées et les transformants sélectionnés selon la méthode décrite en III.4 et 5.

III.4 Sélection par antibiotiques des plantes transformées

Les graines sont préalablement stérilisées selon la méthode décrite en III.6. Les graines stériles sont étalées sur milieu gélosé MS (4,9 g de milieu MS0255 Duchefa en poudre, 0,8 % (p/v) d'agarose, 1 % (p/v) de saccharose, pH 5,8) supplémenté avec l'antibiotique de sélection dont les concentrations d'usage sont indiquées dans le Tableau T1. De la carbénicilline à 200 µg/mL

et de la céfotaxime à 250 µg/mL peuvent être ajoutées au milieu, permettant l'élimination de bactéries ou champignons contaminants. Les boîtes sont mises à 4 °C à l'obscurité durant 48 heures afin de stratifier les graines et induire une germination synchronisée. Les boîtes de Petri sont ensuite mises en chambre de culture à 25 °C pour la germination (conditions d'éclairage décrites dans le chapitre Matériel section III.1).

Sélection à la kanamycine : la kanamycine est une molécule se liant à la sous-unité 30S du ribosome bactérien. Du fait de l'origine bactérienne des organelles, elle possède également un effet inhibiteur sur la petite sous-unité du ribosome chloroplastique (Recht et al., 1999). Les plantules non transformées sont chlorosées, leur croissance est stoppée au stade cotylédons puis elles meurent.

Sélection à l'hygromycine B : l'hygromycine B bloque la synthèse des polypeptides chez les procaryotes et les eucaryotes, stoppant ainsi la croissance des plantes même à faible concentration (Gonz et al., 1978). Les plantules transformées présentent donc un hypocotyle plus allongé que les plantes non transformées.

Les plantules sélectionnées sont ensuite repiquées en terre dans des pots individuels et placées sous les conditions de culture décrites dans le chapitre Matériel section III.1.

III.5 Sélection des plantes transformées par résistance au glufosinate

Certains vecteurs binaires contiennent le gène *bar* de résistance au glufosinate (BASTA), un herbicide produit à l'origine par deux champignons du genre *Streptomyces* (Hoerlein, 1994). Les graines à sélectionner sont semées dans des plateaux contenant du terreau et mises en chambre de culture dans les conditions citées dans le chapitre Matériel section III.1. Une semaine après germination, une solution de glufosinate à 300 mg/L est vaporisée sur les jeunes plantules. Sous l'effet de l'herbicide les plantules non-transformées fanent en quelques jours. Les plantules résistantes sont repiquées en terre dans des pots individuels, puis génotypées afin de confirmer la présence de l'insert.

III.6 Stérilisation des graines d'*Arabidopsis thaliana*

Cette méthode a comme avantage une stérilisation rapide et l'obtention de graines sèches ne formant pas d'agrégat, permettant ainsi un semis individuel de chaque graine. Les graines à stériliser (environ 100 µL) sont placées dans des microtubes Eppendorf de 1,5 mL et incubées

avec 1 mL de 0,05 % (v/v) Triton X-100, 70 % (v/v) éthanol sous agitation. Après 10 min, le liquide est retiré et les graines sont lavées avec 1 mL de 70 % (v/v) éthanol sous agitation pendant 8 min. Enfin un dernier lavage à 100 % (v/v) d'éthanol est effectué pendant quelques secondes puis le liquide est retiré. Cette étape permet une meilleure élimination de l'eau présente sur les graines. Les graines stériles sont alors séchées sous hotte à flux laminaire pendant 30 à 45 min avant d'être semées sur milieu gélosé.

III.7 Induction d'un stress génotoxique par la ciprofloxacine

L'application de stress génotoxiques sur des plantes permet de générer des lésions sur le génome et de tester la résistance de plantes sauvages ou mutantes à ces lésions. Cela nous permet notamment d'identifier l'implication ou non d'un facteur dans les mécanismes de réparation de l'ADN. La ciprofloxacine (CIP) est un antibiotique inhibant l'activité de ligation de la gyrase bactérienne, provoquant ainsi des cassures double brin dans l'ADN. Du fait des origines bactériennes des mitochondries et des chloroplastes, les génomes de plantes codent pour les sous-unités d'une gyrase strictement localisée dans les deux organelles (Wall et al., 2004). Ainsi, la CIP permet de cibler spécifiquement les génomes organellaires sans affecter le génome nucléaire (Evans-Roberts et al., 2016). On compare l'effet du traitement effectué sur des plantes sauvages et des plantes mutées en observant le phénotype visible (développement ou non de la paire de premières feuilles) ou d'éventuelles modifications au niveau de la stœchiométrie des différentes régions des génomes des organelles par qPCR. Dans la pratique, des graines de plantes que l'on souhaite étudier sont stérilisées selon la méthode décrite en III.6. Elles sont ensuite semées une à une à l'aide d'un cure-dent stérile sur milieu MS gélosé (4,9 g de milieu MS0255 Duchefa en poudre, 0,8 % (p/v) d'agarose, 1 % (p/v) de saccharose, pH 5,8) contenant différentes concentrations en ciprofloxacine (0; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 2 μ M). Un total de 100 graines sont disposées par boîte de Petri : 50 graines de plante mutante et 50 graines de plante sauvage. Les boîtes sont entreposées 48 h à l'obscurité à 4 °C pour assurer une germination synchronisée qui est essentielle pour la comparaison des phénotypes, puis mises en chambre de culture à 25 °C aux conditions de luminosité décrites dans le chapitre Matériel section III.1. L'observation est réalisée 12 jours après germination. Les plantules sont ensuite prélevées et congelées à l'azote liquide afin d'en extraire l'ADN pour des analyses par qPCR.

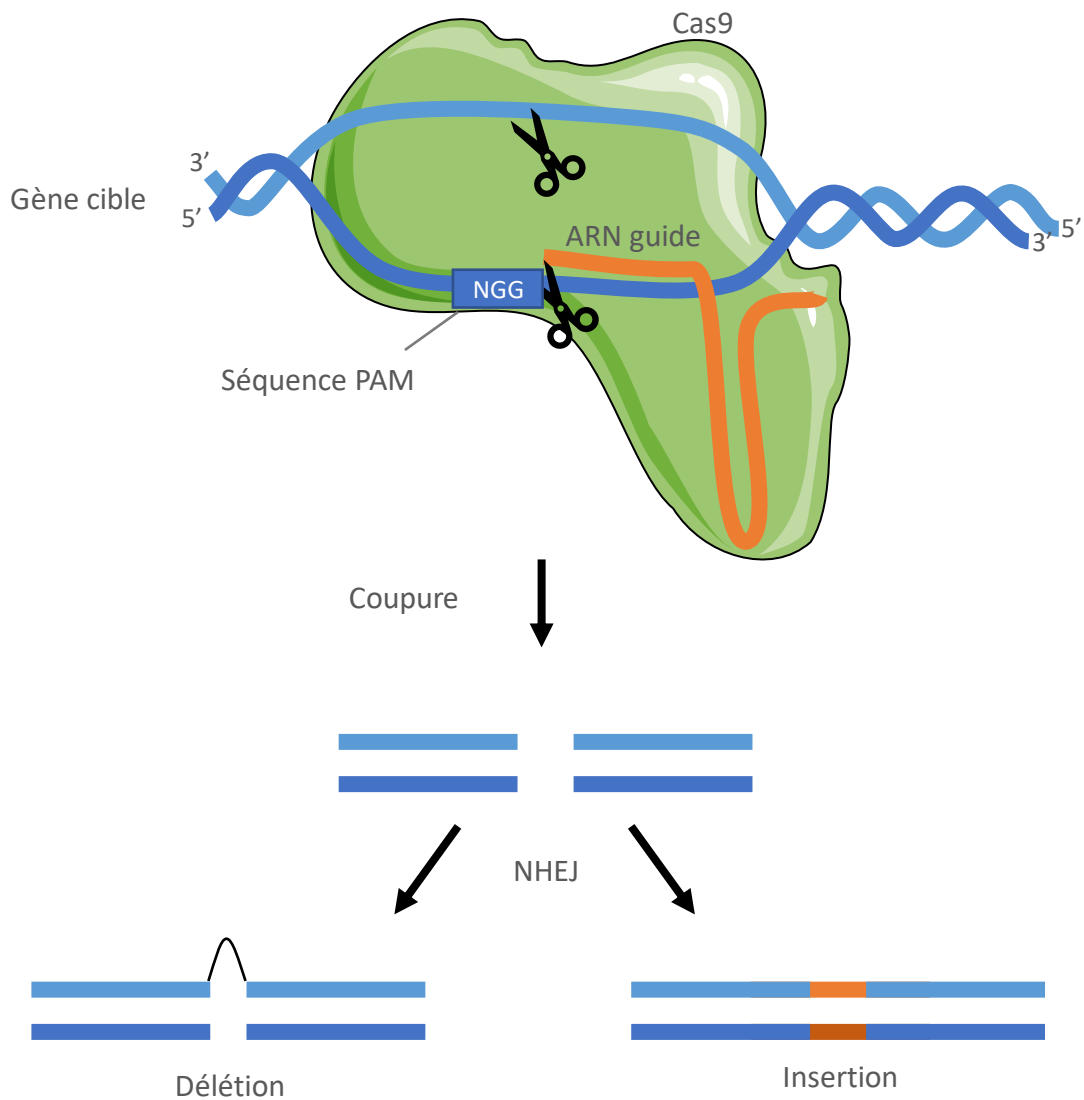


Figure MM2. Schéma représentatif du système CRISPR/Cas9.

La protéine Cas9, guidée par l'ARN guide, coupe le gène cible au niveau d'une séquence PAM (5'-NGG-3'). La coupure est alors normalement réparée par le mécanisme du "Non-Homologous End Joining" (NHEJ), ce qui peut provoquer des délétions ou des insertions au niveau de la séquence cible.

III.8 Croisements génétiques de deux plantes d'*Arabidopsis thaliana*

Afin d'obtenir plusieurs gènes mutés chez *Arabidopsis thaliana*, la méthode de croisement entre deux mutants est la plus simple et efficace. Pour cela, des plantes en cours de floraison des deux mutants sont nécessaires. *Arabidopsis* se reproduisant par autofécondation, chaque fleur contient à la fois les organes reproducteurs mâles et femelles. Sur l'une des plantes mutantes, les fleurs sont débarrassées de leurs sépales et pétales ainsi que de leurs étamines afin d'empêcher toute autofécondation. Toutes les fleurs qui ne seront pas utilisées pour le croisement sont également supprimées. Le lendemain, le pollen de la seconde plante à croiser est déposé sur le stigmate de la première plante. La plante pollinisée est remise en chambre de culture dans les conditions de luminosité et de température décrites dans le chapitre Matériel section III.1. Les siliques sont récoltées individuellement une fois arrivées à maturité, et mises à sécher dans un microtube Eppendorf ouvert pendant une semaine avant de récolter et semer les graines (génération F1).

III.9 Création d'un mutant par la technologie CRISPR/Cas9

La caractérisation du mutant d'un facteur est une étape essentielle vers la compréhension de son rôle dans la plante. Pour une large majorité des gènes codant une protéine, il est possible de trouver des mutants d'insertion T-DNA disponibles auprès de collections de graines. Dans le cas où aucun mutant d'insertion T-DNA n'est disponible, il est possible depuis quelques années de générer un mutant par édition ciblée du génome par la technologie CRISPR/Cas9. Cette technologie consiste en l'utilisation d'une endonucléase (Cas9) capable de cliver l'ADN au niveau d'une séquence PAM (5'-NGG-3') spécifique désignée par l'appariement d'un ARN guide CRISPR. Il est possible de modéliser l'ARN guide pour qu'il cible une séquence précise au cœur d'un gène d'intérêt. La protéine Cas9 provoque alors une cassure double brin qui peut conduire à une mutation du gène lors de la réparation de la lésion (Schiml and Puchta, 2016)(Figure MM2). En pratique, les séquences codant pour les ARN guides sont insérées dans le variant p5A-Cas9 du vecteur pKIR (Tsutsui and Higashiyama, 2017). Ce vecteur contient le gène Cas9 sous contrôle du promoteur constitutif RPS5A, l'ARN guide inséré est sous contrôle du promoteur U6-26 permettant la transcription par l'ARN polymérase III. Enfin il contient la construction OLE1-TagRFP permettant l'expression de la RFP ("Red Fluorescent Protein") dans la graine. Cette construction nous permet une sélection rapide des graines ayant intégré

l'insert (fluorescentes). Le plasmide est inséré dans *E. coli* (souche TOP10) afin d'être amplifié puis extrait à l'aide du kit NucleoSpin Plasmid EasyPure (Macherey-Nagel®) (V.10.). il est ensuite inséré par choc thermique dans *Agrobacterium tumefaciens* (I.3). Des plantes de l'écotype Col-0 sont transformées par "floral-dip" comme décrit en III.3. Les graines contenant la construction sont sélectionnées par observation à la loupe binoculaire à fluorescence, par excitation de la RFP à une longueur d'onde de 558 nm et observation de la fluorescence à 583 nm. Les plantes sont alors génotypées par PCR (V.3), pour être sûr de ne retenir que les plantes transformées, puis la région cible des ARN guides est séquencée à la recherche d'une insertion, d'une délétion ou d'une modification de base induisant une protéine non fonctionnelle. Afin d'éviter que la nucléase Cas9 ne continue de cliver l'ADN et ne produise des mutations « hors cible », il est important de sélectionner les graines de la génération T2 ne possédant plus la construction CRISPR-Cas9. Pour cela, une sélection des graines non fluorescentes est effectuée comme décrit précédemment. Afin de pouvoir s'assurer que le phénotype observé chez le mutant provient bien de la mutation du gène d'intérêt et non d'une mutation hors-cible, il est nécessaire de produire au moins deux lignées de mutants à partir d'ARN guides différents.

IV. Méthodes relatives aux acides nucléiques

IV.1 Électrophorèse sur gel d'agarose

L'électrophorèse sur gel d'agarose permet de visualiser des fragments d'ADN et de les séparer en fonction de leur taille. Elle permet par exemple de visualiser un résultat de génotypage, de contrôler la pureté d'ADN extraits (par l'absence d'ARN), ou de vérifier que les acides nucléiques ne sont pas dégradés. Pour cela, un maillage plus ou moins dense est créé à l'aide d'agarose (0,7 % à 2 % (p/v)) gélifié dans du tampon TAE 0,5X (0,5 mM EDTA; 20 mM Tris-acétate pH 8,0). Les échantillons sont préalablement mélangés à du tampon de charge 6X (0,03 % (p/v) bleu de bromophénol; 60 % (v/v) glycérol; 60 mM EDTA; 10 mM Tris-HCl pH 7,6) puis déposés dans le gel. Les acides nucléiques étant chargés négativement, la migration s'effectue par application d'un courant électrique (généralement 100 V) durant 15 à 20 min selon les besoins. L'addition d'un agent intercalant, le bromure d'éthidium (BET)

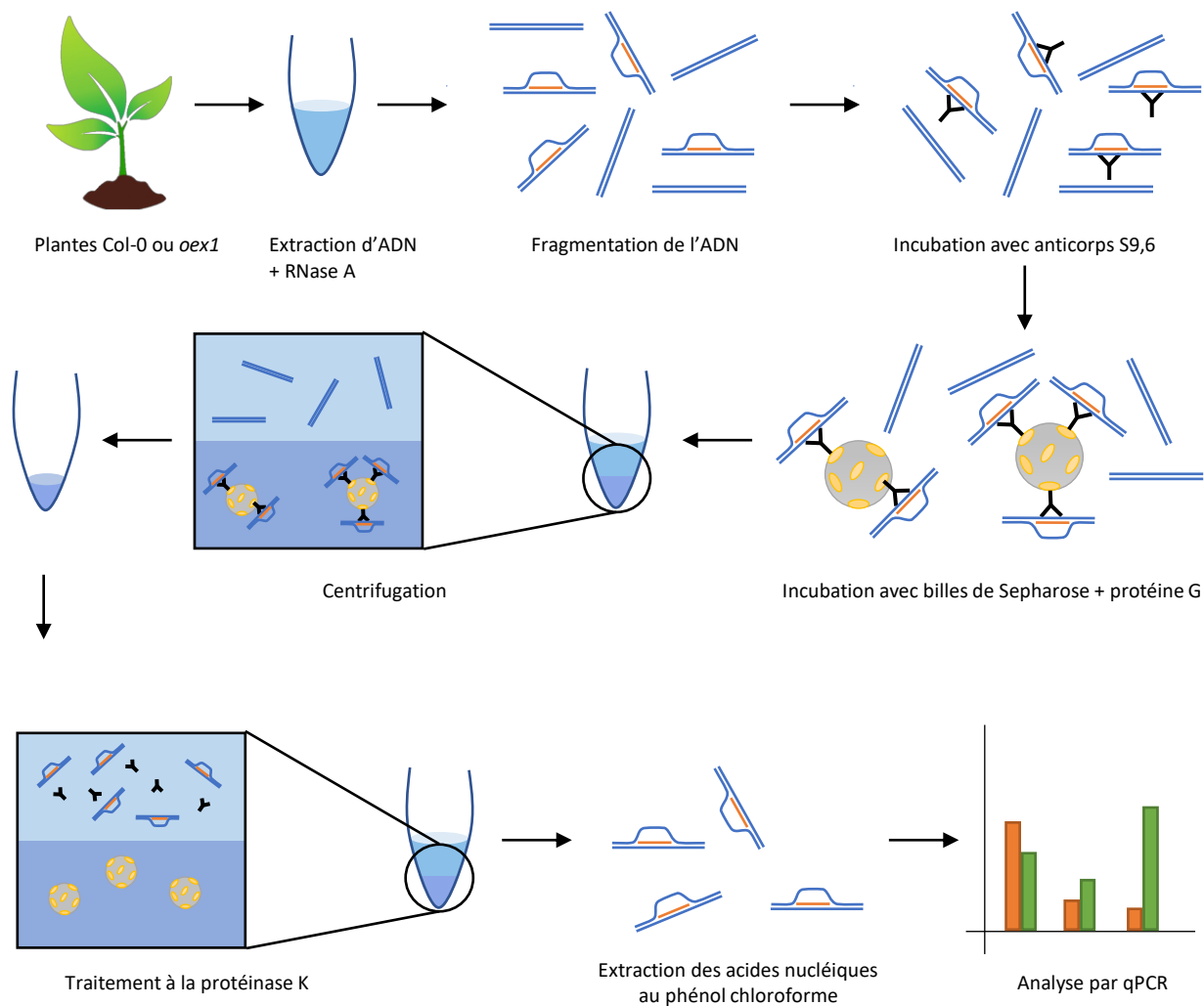


Figure MM3. Représentation simplifiée de l'immunoprécipitation de complexes ARN:ADN (DRIP)

L'ADN des plantes à tester (Col-0 et *oex1-1*) est extrait en présence de RNaseA puis fragmenté à l'aide d'un mélange d'enzymes de restriction. L'ADN est incubé avec les anticorps S9,6 spécifiques des hybrides ADN:ARN puis avec des billes de Sepharose couplées à des protéines G. Une centrifugation permet la sédimentation des complexes pendant que l'ADN double brin reste en suspension dans le surnageant. Un traitement à la protéinase K permet de dissocier les éléments du complexe. Les acides nucléiques sont purifiés à l'aide d'une extraction au phénol/chloroforme avant d'être analysés par qPCR.

à 0,5 µg/mL, permet de visualiser les acides nucléiques sous lumière UV. La taille des fragments est évaluée par comparaison avec le marqueur de taille moléculaire MassRuler™ DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific®) dont la taille des fragments est connue.

IV.2 Quantification par analyse spectrophotométrique

Les acides nucléiques sont quantifiés au spectrophotomètre NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific®, Waltham, Massachusetts, États-Unis) par mesure de l'absorbance à 260 nm (A260), longueur d'onde à laquelle on observe un pic d'absorption pour les bases azotées. Cette méthode permet également d'évaluer la qualité de l'échantillon d'acides nucléiques. Un rapport d'absorbance A260/A280 inférieur à 1,7 montrera une trop forte contamination en protéines et un rapport d'absorbance A260/A230 proche de 2 montrera que l'échantillon est exempt d'impuretés tels que des composés phénoliques.

IV.3 Précipitation à l'éthanol

Afin de concentrer ou purifier des acides nucléiques, il est possible de les précipiter en ajoutant 0,3 M d'acétate de sodium pH 4,8 puis 2 à 3 volumes d'éthanol (v/v) ou alternativement 0,7 à 0,8 volumes d'isopropanol. Le mélange est homogénéisé par retournement du tube 5 à 6 fois et incubé dans la glace durant 10 min. Il est ensuite centrifugé 2 à 20 min à 16 000 g à 4 °C (suivant la quantité en acides nucléiques) puis le culot d'acides nucléiques précipités est lavé avec 70 % (v/v) d'éthanol, séché à l'air libre et repris dans le volume souhaité d'eau ou de TE (généralement entre 25 µL et 200 µL). Un microlitre de glycogène (20 mg/mL) peut être ajouté comme entraîneur à l'étape de précipitation afin de mieux visualiser le culot si les concentrations en acides nucléiques sont très faibles.

IV.4 Immunoprécipitation des hybrides ARN:ADN (DRIP)

Afin de quantifier et identifier les hybrides ARN:ADN dans le génome, l'ADN génomique est extrait en présence de RNase A qui est une endoribonucléase dégradant l'ARN simple brin et laissant les hybrides ARN-ADN intacts. Après fragmentation de l'ADN, les hybrides ARN:ADN sont immunoprécipités à l'aide d'un anticorps spécifique, purifiés et analysés par qPCR ou séquençage (Figure MM3). Le génome total des plantes est extrait à l'aide du kit NucleoSpin Plant II Midi kit (Macherey-Nagel®). Deux grammes de plantes au stade rosette sont congelés

à l'azote liquide et broyés dans un mortier. Le broyat est maintenu congelé par ajout régulier d'azote liquide afin de préserver les ARN de la dégradation. Une fois le matériel végétal réduit en fine poudre, une solution de tampon d'extraction au CTAB ainsi que 25 µL de RNase A (DNase and protease-free) à 10 mg/mL (Thermo Fisher Scientific®) sont ajoutés, le tout est incubé 60 min à 65 °C. Le mélange est centrifugé puis le surnageant est passé sur une colonne filtrante afin d'éliminer les débris cellulaires. Un tampon contenant du chlorure de guanidinium, un agent chaotrope permettant la dénaturation des protéines, est ajouté au lysat avant de le déposer sur une colonne de silice sur laquelle les ADN peuvent se fixer. La colonne est ensuite lavée avec une solution contenant de l'éthanol puis les ADN sont élués en deux fois avec 200 µL de tampon à faible force ionique (0,1 mM EDTA ; 5 mM Tris-HCl pH 8,5). Les ADN extraits sont ensuite quantifiés par spectrophotométrie au NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific®) et leur qualité est contrôlée par électrophorèse sur gel d'agarose, comme décrit précédemment.

Pour chaque échantillon à tester, 10 µg d'acides nucléiques sont ensuite fragmentés avec un mélange d'enzymes de restrictions choisies pour couper le génome mitochondrial toutes les 200 à 5 000 paires de bases. La digestion enzymatique se fait par des enzymes de type "fast digest" comme décrit en V.7, avec une incubation prolongée jusqu'à 2 heures.

Afin de valider les résultats, un témoin négatif est nécessaire. Pour cela, la moitié de l'échantillon est incubé avec 2 µL de Ribonuclease H (RNase H 5 U/µL) (Thermo Fisher Scientific®) qui a pour propriété de dégrader les ARN dans les hybrides ARN:ADN. L'incubation a lieu à 37 °C pendant 4 heures.

Les échantillons à tester sont incubés pendant 14 heures à 4 °C avec 2 µL de l'anticorps S9.6 (Sigma-Aldrich®) sous rotation à 10 rpm. Par échantillon, un volume de 25 µL de billes de Protein G Sepharose, Fast Flow (Sigma-Aldrich®) est équilibré dans le tampon de fixation 1X (1 mM EDTA; 140 mM NaCl; 0,1 % (v/v) Triton X-100; 10 mM NaPO₄ pH 7,4) puis centrifugé 1 min à 1 100 g pour sédimenter les billes et éliminer le tampon de lavage. Un blocage des billes est alors effectué par incubation 10 min avec 1 mL de tampon de fixation supplémenté de 8 µg d'ADN de sperme de saumon soniqué et 0,5 % (p/v) de BSA. Le mélange est centrifugé et un nouveau lavage est opéré comme décrit précédemment. Le mélange préparé la veille contenant l'ADN fixé aux anticorps est mélangé avec les billes fraîchement lavées et le tout est incubé 2 heures à 4 °C, sous rotation à 10 rpm. Les échantillons sont ensuite lavés trois fois avec 1 mL de tampon de fixation comme décrit à l'étape précédente. Ces lavages permettent

l'élimination des ADN double brin non-fixés aux anticorps. Une dernière centrifugation de 1 min à 1 100 g est effectuée pour éliminer la totalité du surnageant.

Afin de séparer les acides nucléiques des billes de Protein G Sepharose, 100 µL de tampon d'élution 1X (10 mM EDTA ; 0,5 % (v/v) SDS ; 50 mM Tris-HCl pH 8,0) sont ajoutés au culot ainsi que 2 µL de protéinase K (Thermo Fisher Scientific®). Le mélange est incubé 45 min à 55 °C sous agitation forte pour éviter que les billes ne sédimentent. Les échantillons sont ensuite centrifugés une minute à 1 000 g. Le surnageant contenant les hybrides ADN:ARN est prélevé et purifié par une extraction au phénol/chloroforme (1:1 v/v) suivie d'une précipitation à l'éthanol (IV.3). Le culot est repris dans 50 µL d'eau et peut être utilisé pour des expériences de quantification relative par qPCR.

V. Méthodes spécifiques à l'ADN

V.1 Extraction d'ADN de plante par la méthode CTAB

La méthode utilisée est dérivée de celle présentée dans la publication de (Springer, 2010). Des morceaux de feuilles d'environ 5 mm de diamètre sont prélevés, congelés dans l'azote liquide puis broyés par des billes en acier de 3 mm dans le TissueLyser II (Qiagen®, Hilden, Allemagne). Un volume de 400 µL de tampon CTAB (2 % (p/v) CTAB; 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA; 100 mM Tris-HCl pH 8,0) complémenté avec 100 µg/mL de RNase A et 0,2 % (v/v) de β-mercaptoéthanol est ajouté au broyat avant d'incuber une heure à 65 °C. Après l'incubation, 400 µL de chloroforme sont ajoutés et le mélange est agité au vortex durant 15 secondes avant d'être centrifugé 10 min à 16 000 g afin de séparer les phases aqueuse et organique. La phase supérieure aqueuse (environ 350 µL) est prélevée puis 10 % (v/v) d'acétate de sodium 3 M pH 5,3 et 0,8 % (v/v) d'isopropanol sont ajoutés. Une centrifugation permet la précipitation de l'ADN en un culot qui est lavé à l'éthanol 70 % (v/v). Le culot est alors séché avant d'être repris dans un volume de 30 µL à 100 µL de tampon TE 0,5X (5 mM Tris-HCl, 0,5 mM EDTA pH 8,0). Une mesure spectrophotométrique au NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific®) (IV.2) nous renseigne sur la quantité et qualité d'acide nucléique extrait. Une analyse par électrophorèse sur gel d'agarose (IV.1) nous renseigne sur l'éventuelle contamination en ARN.

V.2 Elimination des ARN par un traitement à la RNase A

Une présence trop importante d'ARN dans les échantillons d'ADN peut inhiber certaines réactions comme la PCR. Pour cela, un traitement à la Ribonucléase A (RNase A) peut être appliqué en incubant l'ADN extrait à 37 °C durant une heure avec 50 µg/mL de RNase A.

V.3 Amplification d'une séquence d'ADN par PCR :

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) a pour but d'amplifier de façon exponentielle une séquence d'ADN comprise entre deux amorces spécifiquement dessinées s'hybridant chacune sur un brin de l'ADN. La méthode consiste en une répétition de cycles composés d'une étape de dénaturation de l'ADN à 94-98 °C (température dépendant de l'enzyme), d'une étape d'hybridation des amorces aux ADN simple brins et enfin d'une étape d'élongation à 72 °C durant laquelle une ADN polymérase thermostable synthétise le brin manquant à partir des amorces. Ce cycle est répété 30 à 35 fois afin d'obtenir suffisamment de copies du fragment d'ADN d'intérêt. La température à laquelle se déroule l'étape d'hybridation varie de 52 °C à 72 °C en fonction de la séquence des amorces utilisées. Cette température d'hybridation optimale (T_m) est calculée à l'aide du programme "Tm Calculator" de Thermo Fischer Scientific®. Différentes ADN polymérases thermostables sont utilisées en fonction des besoins. Pour des expériences de génotypage, l'enzyme Phire Hot Start II DNA polymérase (Thermo Fisher Scientific®) est privilégiée pour sa haute processivité et sa résistance aux éléments contaminants inhibiteurs. Pour des clonages, l'enzyme Phusion® High Fidelity DNA polymérase (Thermo Fisher Scientific®) est choisie car son activité correctrice 3'-5' exonucléase lui permet une haute-fidélité ce qui réduit grandement le risque de mutations introduites pendant les étapes d'amplification. Les réactions de PCR sont menées selon les indications du fournisseur.

V.4 Purification de produits PCR :

Lorsque le produit PCR généré est destiné à être inséré dans un vecteur de clonage, il est nécessaire de le purifier par élimination des amorces, du tampon de réaction et des petits produits non-spécifiques qui peuvent inhiber la réaction de ligation avec le vecteur. Dans le cas où l'on n'observe qu'une bande unique lors d'une électrophorèse sur gel d'agarose, le produit peut être directement purifié à l'aide du kit PCR and gel clean-up (Macherey-Nagel®),

Hœrdt, France). Les ADN sont fixés sur une colonne de silice en présence de guanidium thiocyanate, lavés de leurs contaminants avec une solution contenant de l'éthanol puis élués avec un tampon à faible force ionique (0,1 mM EDTA; 5 mM Tris-HCl 8,5). Dans le cas où plusieurs bandes sont observées sur gel d'agarose, le fragment correspondant à la taille attendue est découpé sous lumière UV. L'ADN est alors extrait du gel et purifié à l'aide du kit PCR and gel clean-up (Macherey-Nagel®). L'agarose est fondue à 50 °C dans le tampon contenant du guanidium thiocyanate, puis l'ADN est fixé sur une membrane de silice et purifiée dans les mêmes conditions que ci-dessus.

V.5 PCR quantitative avec SYBR Green

La PCR quantitative repose sur le même principe que la PCR classique mais permet la quantification de l'ADN synthétisé à chaque cycle, dans ce cas grâce au SYBR Green (Roche®). Ce composé se fixe au petit sillon de l'ADN double brin de l'ADN néo-synthétisé à chaque cycle. Lorsqu'il est excité à une longueur d'onde de 497 nm, il émet à une longueur d'onde de 520 nm. Cette fluorescence est captée et analysée par l'appareil LightCycler 480® Instrument II (Roche®, Bâle, Suisse). La quantification se fait par analyse des Cp ("Crossing point") correspondant au nombre de cycles nécessaires pour que la fluorescence dépasse le seuil du bruit de fond. Cette quantification relative est réalisée en comparant et normalisant les Cp d'un échantillon d'intérêt à ceux d'un échantillon contrôle. Pour effectuer la qPCR, un volume réactionnel de 6 µL composé de 3 µL LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche®), de 1,5 µM d'un couple d'amorces et d'environ 2 ng d'ADN total est déposé dans chaque puits d'une microplaque optique de 384 puits et chaque échantillon est testé en triplicata. Les conditions d'amplification sont les suivantes : une phase de préchauffage de 8 min à 95 °C, nécessaire pour activer l'enzyme, puis 40 cycles de : 15 secondes à 95 °C, 15 sec à 58 °C et 15 sec à 72 °C. L'analyse des courbes d'amplification est réalisée à l'aide du logiciel intégré.

V.6 Séquençage d'ADN

Les réactions de séquençage sont réalisées par A. Alioua et S. Koechler de la plateforme "analyse de l'expression génique" de l'IBMP, par une méthode dérivée de celle de Sanger (Sanger et al., 1977). Cette méthode est basée sur la terminaison du brin d'ADN à séquencer par incorporation de didésoxyribonucléotides (ddNTP) couplés à des fluorophores. Les

séquences générées sont séparées par électrophorèse capillaire sur l'appareil ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystem®, Foster City, Californie, États-Unis).

V.7 Digestion d'ADN par enzymes de restriction

Dans le cadre d'un clonage, il est nécessaire que le vecteur de destination et l'insert possèdent des extrémités compatibles. Pour cela, il est possible de digérer le vecteur et le fragment à insérer avec des enzymes de restriction. Ce sont des endonucléases d'origine bactérienne capables de reconnaître une séquence spécifique de quelques nucléotides et de les cliver, produisant des extrémités franches ou 5' sortantes ou 3' sortantes. Les digestions se font selon le protocole fourni par le fabricant. La digestion par enzyme de restriction permet également de vérifier l'identité d'un vecteur et la présence de l'insert par analyse de la taille des fragments obtenus après digestion.

V.8 Ligation de deux fragments d'ADN

V.8.a Ligation d'un fragment dans un vecteur linéarisé par une enzyme de restriction

La ligation est réalisée dans un volume de 10 µL contenant environ 100 ng de vecteur, 1 µL de tampon de ligation 10X Promega® (50 mM MgCl₂; 50 mM DTT; 5 mM ATP; 25 % (p/v) PEG-3000; 150 mM Tris-HCl pH 7,8), 1 µL de T4 DNA ligase à 3 u/µL (Promega®) ainsi que la quantité d'ADN à insérer nécessaire pour atteindre un rapport molaire de 1/1 - 3/1 avec le vecteur. Le mélange est incubé la nuit à 4 °C ou deux heures à température ambiante. Le produit de la réaction est utilisé pour transformer les bactéries comme décrit en I.1.

V.8.b Ligation d'un fragment dans le vecteur pGEM®-T Easy

Le vecteur pGEM®-T Easy (Promega®) est fourni linéarisé avec des extrémités 3' sortantes composées d'une thymidine, il est donc nécessaire que les fragments à insérer possèdent des extrémités compatibles, contenant une adénosine en 3'. Pour cela, la méthode du "A-tailing" peut être appliquée. Elle consiste en l'ajout d'une adénosine au produit PCR par l'activité de la *Taq* ADN polymérase qui ne possède pas d'activité de correction. Pour cela, dans un volume final de 10 µL, on ajoute 500 ng d'ADN purifié, 2 µL de tampon 10X (500 mM KCl; 15 mM MgCl₂; 100 mM Tris-HCl pH 8,3), 1 µL de *Taq* ADN polymérase ainsi que de 0,2 mM de dATP. Le milieu réactionnel est incubé 30 min à 72 °C. Une fois l'étape de "A-tailing" terminée, la

ligation au vecteur peut être réalisée. Pour cela, 50 ng de vecteur pGEM®-T Easy (Promega®), 3 µL de tampon de ligation 5X Promega® (50 mM MgCl₂; 50 mM DTT; 5 mM ATP; 25 % (p/v) PEG-3000; 150 mM Tris-HCl pH 7,8), environ 100 ng de la réaction de A-tailing et 1 µL de T4 DNA ligase (3 u/µL) (Promega®) sont ajoutés à un volume d'eau nécessaire pour atteindre 15 µL de volume de milieu réactionnel. Le mélange est incubé la nuit à 4 °C ou une heure à température ambiante. Le produit de la réaction est utilisé pour transformer les bactéries comme décrit en I.1.

V.9 Clonage *via* la technologie Gateway

La majorité des clonages ont été menés par la technologie Gateway® qui permet l'insertion de fragments dans un vecteur par recombinaison entre des sites att présents dans le vecteur de destination et ceux bordant l'insert (Reece-Hoyes and Walhout, 2018). L'insert de départ est obtenu par PCR en utilisant des amorces contenant les sites att adéquats. Les vecteurs utilisés possèdent le gène *ccdB* codant un inhibiteur de la gyrase bactérienne toxique pour la bactérie, mais son activité peut être contrée par son antidote CcdA. Lors de la réaction de recombinaison, le gène *ccdB* est éliminé du vecteur. Un plasmide recombinant n'est donc pas toxique pour une bactérie ne possédant pas le gène *ccdB*. Le clonage Gateway® se réalise en deux étapes majeures. La première étape, appelée réaction BP consiste en l'insertion de l'ADN d'intérêt dans un vecteur donneur par recombinaison entre les sites attB de l'insert et attP du vecteur. Pour cela, 50 fmol de la séquence d'intérêt, 50 fmol de vecteur donneur et 1 µL de l'enzyme BP clonase II dans le tampon de réaction (Invitrogen®/ Thermo Fisher Scientific®) sont mélangés et amenés à un volume final de 5 µL. Le milieu est incubé la nuit à 25 °C. Le lendemain matin, la réaction est stoppée par ajout de 2 µg de protéinase K (Thermo Fisher Scientific®) suivie d'une incubation de 10 min à 37 °C. Des bactéries *E. coli* TOP10 compétentes, qui ne possèdent pas le gène *ccdB*, sont alors transformées avec 2 µL du produit de la réaction BP. La sélection des bactéries transformées par le plasmide recombinant se fait par la résistance aux antibiotiques portée par le vecteur. Les bactéries transformées par un plasmide recombinant ne peuvent pas se diviser du fait de l'action de la protéine CcdB.

La seconde étape appelée réaction LR consiste dans la recombinaison entre les sites attL du vecteur donneur et les sites attR du vecteur de destination. Pour cela, 50 fmol du vecteur de destination, 50 fmol du vecteur donneur et 1 µL de l'enzyme LR clonase II dans le tampon de

réaction (Invitrogen®/ Thermo Fisher Scientific®) sont mélangés et amenés à un volume réactionnel final de 5 µL puis incubés la nuit à 25 °C. Le lendemain matin, la réaction est stoppée par ajout de 2 µg de protéinase K (Thermo Fisher Scientific®) suivie d'une incubation de 10 min à 37 °C. Des bactéries *E. coli* TOP10 compétentes sont alors transformées avec 2 µL du produit de la réaction LR. La sélection des bactéries transformées se fait grâce à la résistance à l'antibiotique portée par le vecteur de destination. L'avantage de cette technique réside dans le fait que le fragment d'intérêt inséré dans le vecteur donneur peut ensuite être envoyé vers tous les vecteurs disposant de sites AttR, sans manipulation supplémentaire. La très grande efficacité de la réaction facilite le clonage dans les très grands plasmides, comme c'est le cas de plasmides binaires utilisés pour la transformation de plantes à l'aide d'agrobactéries.

V.10 Préparation d'ADN plasmidique

Afin d'extraire l'ADN plasmidique contenu dans les bactéries *E. coli* transformées, le kit NucleoSpin Plasmid EasyPure (Macherey-Nagel®) est utilisé. Des précultures de 3 mL dans le milieu LB contenant l'antibiotique de sélection sont incubées la nuit à 37 °C sous agitation. Les cultures sont transférées dans un tube Eppendorf de 2 mL, centrifugées 5 min à 5 500 g et le surnageant est éliminé. Les culots de bactéries sont resuspendus dans 150 µL de tampon de resuspension A1 contenant de la RNase A, puis 250 µL de tampon de lyse A2 contenant du SDS et de l'hydroxyde de sodium sont ajoutés. Le mélange se fait par retournement des tubes 6 à 8 fois. La lyse se fait par une incubation à température ambiante pendant 2 min puis l'addition de 350 µL de tampon de neutralisation A3 permet la précipitation des protéines et de l'ADN génomique. Une centrifugation de 3 min à 16 000 g permet la sédimentation du précipité. L'ADN plasmidique resté en solution est alors fixé sur une membrane de silice. La membrane est lavée avec une solution contenant de l'éthanol puis l'ADN plasmidique est élué avec un tampon à faible force ionique (1 mM EDTA; 10 mM Tris-HCl pH 8,0). La quantité et la qualité de l'ADN extrait sont ensuite analysées par spectrophotométrie au NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific®). L'identité du plasmide est confirmée par analyse du profil de restriction et par séquençage.

VI. Méthodes spécifiques à l'ARN

VI.1 Extraction d'ARN à partir de matériel végétal

Des extraits de plantes sont prélevés et congelés dans l'azote liquide puis broyés par des billes en acier de 3 mm dans le Tissuelyser II (Qiagen®, Hilden, Allemagne) grâce à deux sessions de 30 secondes de broyage à une fréquence de 30 Hertz séparées par un refroidissement des échantillons à l'azote liquide. Un volume de 800 µL de Trizol (Life Technologies®, Carlsbad, Californie, États-Unis) est ajouté au broyat puis le tube est agité au vortex jusqu'à obtenir un mélange homogène avant d'ajouter 200 µL de chloroforme. Le mélange est agité au vortex puis centrifugé 10 min à 16 000 g à 4 °C. La phase aqueuse (supérieure) qui contient les ARN est prélevée (environ 500 µL) puis 400 µL d'isopropanol y est ajouté. Le mélange est agité par inversion du tube (6X) puis incubé 10 min à température ambiante. Une nouvelle centrifugation de 20 min à 16 000 g à 4 °C permet de sédimenter les ARN. Le liquide est alors retiré et le culot est lavé avec 70 % (v/v) d'éthanol avant d'être séché. Le culot d'ARN est finalement repris dans 50 µL d'eau stérile. La quantité et le pureté de l'ARN extrait peuvent être contrôlées par une analyse au NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific®), et son intégrité par électrophorèse sur gel d'agarose 1 % (p/v).

VI.2 Traitement des ARN à la DNase

Un traitement à la DNase peut être appliqué aux ARN extraits afin d'éliminer l'ADN contaminant. Le milieu réactionnel se compose de 10 µL de tampon DNase RQ1 10X (100 mM MgSO₄; 10 mM CaCl₂; 400 mM Tris-HCl pH 8,0) et de 5 µL d'enzyme DNase RQ1 sans RNase (Promega®) auquel on ajoute 5 µg d'ARN à traiter dans un volume final de 100 µL. Le mélange est incubé pendant 45 min à 37 °C. Après traitement, les enzymes, les ADN digérés et les composés du tampon sont éliminés par une extraction au phénol/chloroforme suivie d'une précipitation à l'éthanol. Pour cela, un volume d'un mélange (1:1 v/v) de phénol/chloroforme est ajouté aux ARN puis le mélange est agité au vortex durant 15 secondes et centrifugé 15 min à 16 000 g. La phase aqueuse (supérieure) est prélevée et extraite au chloroforme, suivie d'une précipitation à l'éthanol.

VI.3 Réaction de transcription inverse

La synthèse d'ADN complémentaire aux ARN (ADNc) est nécessaire lorsque l'on veut quantifier ces ARN par qPCR ou effectuer un clonage. Pour cela, une réaction de transcription reverse est réalisée à l'aide d'une ADN polymérase ARN-dépendante. Un mélange composé de : 1 µL d'oligo-dT 50 µM; 1 µL d'hexamère aléatoires à 200 ng/µL; 1 µL de dNTP 10 mM; 2 µg à 5 µg d'ARN traité à la DNase est incubé 5 min à 65 °C puis rapidement refroidi dans la glace. A ce mélange sont ajoutés 4 µL de tampon First-Strand 5X (Invitrogen), 1 µL de DTT 0,1 M, 1 µL de RNase OUT (Invitrogen) et 1 µL de transcriptase inverse SuperScript IV (Invitrogen). Le milieu réactionnel est alors incubé 5 min à 35 °C, puis une heure à 50 °C. L'inactivation de l'enzyme se fait par incubation à 70 °C pendant 15 min.

VII. Méthodes relatives aux protéines

VII.1 Extraction de protéines à partir de matériel végétal

Afin d'en extraire les protéines, des tissus de plantes ou de plantules entières sont prélevés dans des microtubes Eppendorf de 2 mL contenant une bille métallique (ø 3 mm). Les échantillons sont ensuite broyés durant deux fois 30 secondes à l'aide du TissueLyser II (Qiagen®). Les deux sessions de broyage sont séparées par un rapide passage des échantillons dans un bain d'azote liquide afin de maintenir l'état de congélation durant toute la durée du broyage. Le broyat est mélangé à 150 µL de tampon Laemmli (2 % (p/v) SDS; 1 % (v/v) β-mercaptoéthanol; 10 % (v/v) glycérol; 0,004 % (p/v) bleu de bromophénol; 60 mM Tris-HCl pH 6,8) puis le mélange est centrifugé 5 min à 16 000 g afin de séparer les protéines extraites contenues dans la phase liquide des débris cellulaires formant le culot. Les échantillons peuvent être conservés à -20 °C.

VII.2 Séparation des protéines par électrophorèse sur gel en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)

Le SDS-PAGE consiste en la séparation des protéines selon leurs poids moléculaires, par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (polyacrylamide/N,N'méthylène bisacrylamide ; rapport 37,5/1) en présence de SDS. La nature dénaturante du gel permet une migration des

protéines en fonction de leur taille sans tenir compte de la structure, le SDS donnant une charge négative à toutes les protéines. Le gel est divisé en deux parties, la partie supérieure appelée gel de concentration permet de concentrer les protéines en une fine bande avant la migration. Il est composé de : 5 % d'acrylamide (p/v); 0,1 % (v/v) SDS; 125 mM Tris-HCl pH 6,8. Le gel de la partie inférieure est appelé gel de séparation, c'est à travers celui-ci que les protéines vont migrer en fonction de leur taille. Il est composé de : acrylamide 8 % à 15 % (p/v) (la concentration étant choisie en fonction de la taille de la protéine d'intérêt); 375 mM Tris-HCl pH 8,8; 0,1 % (v/v) SDS. La polymérisation des gels se fait par ajout de 0,1 % de persulfate d'ammonium (APS) et de 0,05 % de TEMED. Les échantillons sont mélangés à un volume de tampon Laemmli 2X puis chauffés 5 min à 95 °C avant d'être déposés sur le gel. La migration s'effectue pendant 30 min à 25 mA puis 60 à 90 min à 30 mA en fonction du résultat attendu. Dans un puits, 5 µL de marqueur de poids moléculaire Thermo Scientific™ PageRuler™ sont déposés.

VII.3 Coloration d'un gel de protéines au bleu de Coomassie

Afin de visualiser les protéines séparées sur gel SDS-PAGE, celles-ci sont colorées au bleu de Coomassie, ce produit ayant la propriété de former une interaction avec les acides aminés aromatiques et à chaîne basique. Pour cela, le gel est incubé une heure dans une solution de coloration (10 % (v/v) acide acétique; 40 % (v/v) méthanol; 0,25 % (p/v) Coomassie brilliant blue R250) puis décoloré par une série de trois lavages dans une solution de 10 % acide acétique et 20 % éthanol.

VII.4 Immunodétection des protéines

Des protéines fractionnées sur gel SDS-PAGE peuvent être visualisées de façon spécifique par immunodétection, si des anticorps spécifique sont disponibles ou si les protéines sont fusionnées à une étiquette pour laquelle existent des anticorps commerciaux (hexa-histidine, GFP, ...). Pour cela, les protéines sont transférées du gel vers une membrane de polyfluorure de vinylidène (PVDF) Immobilon-P de 0,45 µm (Merck®) par la méthode dite de western-blot. La membrane qui est hydrophobe est d'abord mouillée dans du méthanol absolu, puis lavée à l'eau et équilibrée 3 min dans le tampon de transfert semi-sec (39 mM glycine; 48 mM Tris pH 8,0). Le gel contenant les protéines et la membrane sont intercalés entre plusieurs couches

de papier Whatman® 3M imbibées de tampon de transfert. L'électrotransfert est réalisé sous 1 mA/cm² de gel pendant 45 à 55 min dans une cuve de transfert semi-sec V10-SDB (BIOphORETICSTM).

Pour l'immunodétection, la membrane est préalablement saturée avec des protéines afin de réduire les interactions non-spécifiques et de diminuer le bruit de fond. Ce blocage se fait par incubation pendant une heure dans une solution de tampon TBS-T (20 mM Tris-HCl pH 7,4; 150 mM NaCl; 0,1 % (v/v) Tween®20) supplémenté de 5 % (p/v) de lait écrémé en poudre. La membrane est ensuite incubée la nuit à 4 °C dans une solution de TBS-T contenant 2,5 % (p/v) de lait et l'anticorps primaire à la dilution souhaitée (normalement 1/1000 à 1/10 000). Trois lavages de 15 min au TBS-T sont effectués avant d'incuber la membrane avec une solution de TBS-T contenant 1 % de lait écrémé et l'anticorps secondaire anti-IgG de lapin ou de souris couplé à la peroxydase (en fonction de l'anticorps primaire utilisé), à la dilution adéquate (normalement 1/10 000), durant une heure à température ambiante. Trois lavages au TBS-T sont effectués, puis la membrane est mise en présence d'une solution d'Enhanced Chemical Luminescence (ECL) (Roche®) permettant la libération de lumière par l'activité peroxydase. Cette activité est observée à l'aide de la caméra de l'appareil FUSION FX SPECTRA (Vilber Lourmat, Collégien, France).

VII.5 Quantification des protéines

Les protéines peuvent être quantifiées par deux techniques. La première est la mesure de l'absorbance à 280 nm (A_{280}) à l'aide du spectrophotomètre NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific®), car les acides aminés à cycle aromatique comme le tryptophane et la phénylalanine présentent un pic d'absorbance à 280 nm. Cette méthode est plutôt appliquée à des protéines purifiées, pour lesquelles le coefficient d'extension théorique peut être calculé. La seconde méthode consiste en une mesure indirecte grâce au réactif de Bradford (Protein Assay Dye Reagent Concentrate (BioRad®)). Au contact des protéines, le réactif de Bradford se colore en bleu et absorbe la lumière à 595 nm. L'absorbance est mesurée au spectrophotomètre et il est alors possible de quantifier les protéines présentes dans l'échantillon par comparaison avec une gamme étalon réalisée avec différentes concentrations de (BSA). Le réactif de Bradford concentré est dilué 6 fois avec de l'eau dans l'extrait à tester.

VII.6 Surproduction d'une protéine dans *Escherichia coli*

Afin de réaliser des tests d'activité *in vitro*, il est crucial de pouvoir exprimer, extraire et purifier en grande quantité la protéine d'intérêt. Pour cela, les ADNc codant les protéines OEX1 et OEX2 dépourvues de leur séquence d'adressage organellaire ont été amplifiés par PCR puis clonés dans le vecteur pET-28a permettant la fusion en N-terminal de la protéine avec une étiquette d'hexa-histidine. Cette construction a été exprimée dans la souche BL21(DE3) d'*E. coli*. Pour cela les bactéries sont mises en culture dans 500 mL de milieu LB liquide contenant 50 µg/mL de kanamycine jusqu'à atteindre une $DO_{600}=0,6$, indiquant que les bactéries se trouvent en phase exponentielle de croissance. La transcription du gène codant la protéine de fusion est activée par ajout de 1 mM d'IPTG et l'expression a lieu durant 2 heures à 37 °C sous agitation. Les conditions de culture et d'induction peuvent varier en fonction des expériences. La culture est centrifugée à 5 000 g durant 20 min afin de sédimenter les bactéries, le culot est lavé avec 50 mL d'eau et repris dans du tampon de lyse (150 mM Tris-HCl pH 8,0 ; 5 % (v/v) glycérol ; 150 mM NaCl) de sorte à obtenir une $DO_{600}=20$. Deux méthodes de lyse bactérienne peuvent alors être appliquées.

VII.7 Lyse des bactéries

VII.7.a Par sonication

La sonication permet la lyse des cellules bactériennes par l'application d'une énergie sonore supérieur à 20 kHz (ultrasons) de sorte à faire vibrer les molécules jusqu'à rupture des parois. Cette technique ayant pour défaut la chauffe très rapide de l'échantillon, il est crucial de doser la puissance et d'alterner les périodes de sonication avec des périodes de refroidissement. Dans cette étude, la sonication se déroule en 12 cycles (5 secondes ON, 5 secondes OFF) à une amplitude de 60 % dans un bain d'eau glacé. Une centrifugation de 30 min à 35 000 g à 4 °C permet de séparer les débris cellulaires des protéines en solution.

VII.7.b Au Microfluidizer

Les bactéries mises en suspension de sorte à obtenir une $DO_{600} = 20$ sont lysées par application puis relâchement d'une forte pression (1 300 bar) sur l'échantillon. Afin de nous assurer d'avoir fragmenté le maximum de bactéries, deux passages successifs dans le LM20 DIGITAL MICROFLUIDIZER® PROCESSOR (Microfluidics™ Westwood, Massachusetts, États-Unis) sont

effectués. L'ajout de 1 mM de fluorure de phénylméthylsulfonyl (PMSF) dans le lysat dès sa sortie de l'appareil permet l'inactivation des protéases à sérine libérées par la lyse cellulaire. Une centrifugation de 30 min à 17 000 g à 4 °C permet de séparer les débris cellulaires des protéines en solution.

VII.8 Purification de la protéine d'intérêt par chromatographie d'affinité

La purification de protéines possédant une étiquette de poly-histidine est basée sur l'interaction du groupement imidazole de l'histidine avec un ion bivalent métallique par liaison de coordination. Dans le cas d'une colonne de type Ni-NTA, ce sont des ions de Nickel (Ni^{2+}) qui vont permettre de retenir la protéine de fusion par liaison avec 2 histidines successives. L'utilisation d'une étiquette composée de six résidus histidine permet une interaction forte, contrastant avec les autres protéines qui ne seront pas retenues sur la colonne. L'interaction entre la protéine d'intérêt et les ions Ni^{2+} de la colonne est rompue par ajout d'imidazole.

VII.8.a Purification par chromatographie d'affinité sur ions métalliques immobilisés (IMAC) puis gel filtration (GF)

Cette purification a été réalisée à la plateforme "production et purification des protéines" de l'IBMP. Le lysat bactérien est chargé sur une colonne Ni-NTA pré-équilibrée avec 50 mL de tampon de lyse (150 mM Tris-HCl pH 8,0; 5 % (v/v) glycérol; 150 mM NaCl; 20 mM imidazole). Elle est ensuite lavée par ajout de 15 mL de tampon de lyse puis les protéines d'intérêt sont éluées par passage d'un tampon contenant une concentration croissante en imidazole (de 25 à 500 mM). L'éluat est alors injecté sur une colonne de gel filtration Superdex 200 10/300 GL (GE healthcare). Le logiciel UNICORN 7.0 permet le suivi des éluions en sortie de l'IMAC et de la GF. Les fractions contenant la protéine purifiée sont conservées à -80 °C.

VII.8.b Purification par "step-gradient" sur colonne de Ni-NTA

Pour réduire le temps de purification, des purifications ont été réalisées manuellement sur colonne de Ni-NTA. Pour cela, une colonne contenant 200 µL de résine de purification cOmplete™ His-Tag Purification Resin (Roche®, Bâle, Suisse) est équilibrée par un passage de 5 mL de tampon de lyse. Le lysat est supplémenté d'imidazole 30 mM avant d'être chargé sur la colonne. L'imidazole permet d'éviter les interactions peu spécifiques entre des protéines et la colonne. La colonne est ensuite lavée deux fois avec 5 mL de tampon d'éluion (150 mM

Tris-HCl pH 8,0; 5 % (v/v) glycérol; 300 mM NaCl) supplémenté d'imidazole 30 mM pour le premier lavage puis d'imidazole 50 mM pour le deuxième lavage. Cette étape permet de décrocher les protéines interagissant de manière aspécifique avec la résine. L'élution de la protéine d'intérêt se fait par paliers de concentration en imidazole mélangé au tampon d'élution. Pour cette étape, une gamme allant de 90 mM à 310 mM d'imidazole peut être testée, en augmentant la concentration de 20 mM à chaque étape. Les fractions contenant la protéine la plus pure et abondante se situent entre 110 mM et 270 mM d'imidazole. Afin de s'affranchir de la présence de l'imidazole pouvant interférer avec des réactions postérieures, une dialyse est effectuée à l'aide d'une membrane de cellulose tubulaire (Sigma Aldrich D9277) possédant un cut-off de 14 kDa, durant la nuit à 4 °C dans deux litres de tampon d'élution sans imidazole. Des aliquotes des protéines purifiées sont alors congelées dans l'azote liquide et conservées à -80 °C. Les protéines sont quantifiées et leur pureté analysée par spectrophotométrie au NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific®) et par SDS-PAGE suivie de coloration au bleu de Coomassie.

VII.9 Concentration des protéines

A la suite de la purification, il peut être nécessaire de concentrer les protéines par ultrafiltration, afin d'atteindre une concentration adéquate pour les tests d'activité. Cette étape permet également d'éliminer progressivement l'imidazole. Pour cela, 500 µL de solution de protéines sont centrifugés sur des colonnes Amicon™ Ultra 30 k, 10 min à 11 000 g. Le "flow-through" est éliminé et des cycles de concentration sont répétés jusqu'à obtention de la concentration souhaitée.

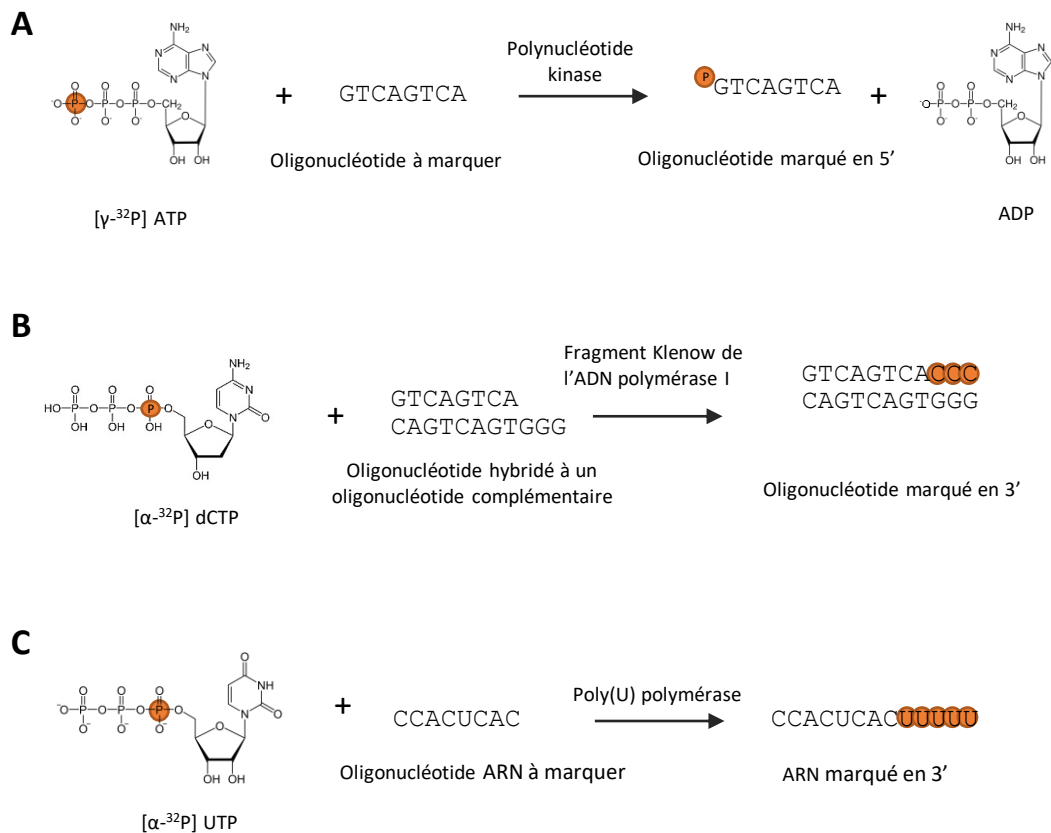


Figure MM4. Marquage d'oligonucléotide en 5' ou en 3'.

(A) Marquage d'un oligonucléotide en 5'. Le phosphate en position γ du $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}] \text{ ATP}$ est transféré par la polynucléotide kinase (PNK) sur l'extrémité 5' de l'oligonucléotide non-phosphorylé.

(B) Marquage d'un oligonucléotide en 3'. L'oligonucléotide à marquer est hybridé à un oligonucléotide complémentaire contenant 3 G supplémentaires en 5'. Le fragment Klenow de l'ADN polymérase I incorpore un ou plusieurs C à partir d' $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}] \text{ dCTP}$.

(C) Marquage d'un oligonucléotide ARN en 3' par ajout d'UMP radiomarké grâce à la Poly-U polymérase et d' $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}] \text{ UTP}$. La poly-U polymérase ajoute quelques nucléotides (environ 3-5) à l'extrémité 3'-OH d'un ARN simple-brin.

VIII. Méthodes relatives aux tests d'activité enzymatique

Les expériences permettant de tester l'activité de la protéine OEX1 sur différents types de substrats nécessitent une série d'étapes de préparation. Un soin tout particulier est apporté lors de la préparation et de la formation des structures de ces substrats. Les substrats sont radiomarqués afin de pouvoir visualiser les produits de digestion après électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Le terme de substrat froid sert à désigner les acides nucléiques non-radiomarqués.

VIII.1 Marquage d'un ADN simple brin à son extrémité 5'

Le marquage radioactif est effectué par transfert d'un phosphate radioactif (^{32}P) en position γ d'une molécule d'ATP vers l'extrémité 5' d'un ADN, réaction catalysée par l'enzyme T4 polynucléotide kinase (PNK). Pour cela, un milieu réactionnel d'un volume final de 20 μL composé de 20 pmol d'oligonucléotide, 5 μL de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP (3 000 Ci/mmol, 1 mmol/mL), 2 μL de tampon de réaction 10X (500 mM Tris-HCl pH 7,6; 100 mM MgCl_2 ; 50 mM DTT; 1 mM spermidine) ainsi que de 1 μL (10 U) de PNK (Thermo Fischer Scientific®) est incubé 30 min à 37 °C. La réaction est alors stoppée par ajout de 1 μL d'EDTA 0,5 M (Figure MM4A) puis chauffage 10 min à 75°C.

VIII.2 Marquage de l'ADN à l'extrémité 3'

Le marquage radioactif est effectué par incorporation de désoxycytidines monophosphate dont le phosphore radioactif (^{32}P) en utilisant le fragment Klenow (Thermo Fischer Scientific®) de l'ADN polymérase I bactérienne. Le marquage s'effectue par synthèse d'une séquence complémentaire, il est donc impératif d'effectuer le marquage de l'ADN double brin possédant une extrémité 5'-sortante composée de G. Cet ADN double brin est fabriqué en incubant 5 min à 98 °C, 20 μL d'un mélange contenant 20 pmol de l'oligonucléotide à marquer et 180 pmol de l'oligonucléotide complémentaire possédant 3 G supplémentaires en 5', dans le tampon TNE (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl) puis en le refroidissant lentement. Pour réaliser le marquage, un milieu réactionnel d'un volume final de 30 μL composé de 20 μL d'ADN double brin (20 pmol), 3 μL de tampon de réaction 10X (500 mM Tris-HCl pH 8,0; 50 mM MgCl_2 ; 10 mM DTT), 1 μL de dCTP froid 34 μM , 2,5 μL de $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTP

(3 000 Ci/mmol , 1 mmol/mL) et 1 μ L (10 U) de Fragment Klenow (Thermo Fischer Scientific®) est incubé 15 min à 30°C. La réaction est stoppée par l'ajout de 1 μ L 0,5 M EDTA . (Figure MM4B). Lorsqu'un oligonucléotide simple brin marqué en 3' est requis, l'oligonucléotide complémentaire est de taille différente de l'ADN à marquer, le double brin issu du marquage est dénaturé par chauffage 5 min à 95°C et refroidissement rapide dans la glace, puis analysé par électrophorèse sur gel de polyacrylamide non dénaturant (VIII.6). L'oligonucléotide marqué est repéré par autoradiographie puis élué du gel par diffusion à 4°C dans 400 mL de TNE.

VIII.3 Marquage des ARN en 3'

Le marquage radioactif est effectué par intégration d'une uridine monophosphate dont le phosphore est radioactif (32 P) en utilisant l'activité polymérase de la Poly(U) polymérase (New England Biolabs, Massachusetts, États-Unis) qui permet d'incorporer des nucléotides sans matrice complémentaire (Figure MM4C). Pour cela, 25 μ L d'un milieu réactionnel composé de 20 pmol de fragment d'ARN simple brin, 0,5 mM de [α - 32 P]UTP (3 000 Ci/mmol, 1 mmol/mL), 2,5 μ L de tampon de réaction NEBuffer 2 10X (10 mM Tris-HCl pH 7,9; 10 mM MgCl₂; 1 mM DTT; 50 mM NaCl) ainsi que de 1 μ L (2 U) de Poly(U) Polymerase (NEB) est incubé 10 min à 37 °C. La réaction est ensuite stoppée par ajout de 1 μ L d'EDTA 0,5 M.

VIII.4 Elimination des nucléotides non-incorporés par filtration sur gel

La totalité des nucléotides radiomarqués n'étant pas incorporée, il est nécessaire de purifier les acides nucléiques marqués avant utilisation. Ainsi, une chromatographie d'exclusion moléculaire (ou filtration sur gel) est appliquée. Pour cela, un volume de 1 mL de Sephadex G-25 (Sigma-Aldrich®, Saint-Louis, Missouri, États-Unis) est déposé dans une seringue de 1 mL puis centrifugé 2 min à 1 500 g afin d'extraire le surplus d'eau. L'échantillon à purifier est déposé sur la colonne et une nouvelle centrifugation est appliquée. L'éluat est conservé. Une étape supplémentaire peut être effectuée, elle consiste en l'ajout de 30 μ L d'eau sur la colonne avant une dernière étape de centrifugation. Les acides nucléiques radiomarqués peuvent être conservés à -20 °C.

VIII.5 Hybridation des acides nucléiques

Afin de former différentes structures servant de substrat, les acides nucléiques radiomarqués doivent être hybridés à des ADN "froids". Pour cela, un mélange contenant 2 ou 20 pmol d'oligonucléotide marqué et 10 fois plus d'oligonucléotide froid à hybrider est incubé dans le TNE (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl) durant 5 min à 98 °C puis refroidi lentement. Pour éliminer l'excédent d'ADN froid, une électrophorèse sur gel de polyacrylamide non dénaturant est réalisée, l'hybride marqué est repéré par autoradiographie puis élué du gel par diffusion à 4°C dans 400 µL de TNE.

VIII.6 Purification des substrats radiomarqués ou analyse des tests d'activité par électrophorèse sur gel de polyacrylamide non-dénaturant

Une migration sur gel de polyacrylamide non-dénaturant permet de séparer les substrats marqués des acides nucléiques froids ou des produits intermédiaires et aussi d'analyser certains tests d'activité. Les structures finales ainsi que tous les intermédiaires sont déposés sur le gel, afin de vérifier le bon assemblage des substrats. Le gel se compose de 10 % de polyacrylamide/N,N'méthylène bisacrylamide (rapport 29/1) ainsi que de tampon de migration TBE 0,5X (89 mM acide borique; 2 mM EDTA; 89 mM Tris pH 8,0). La polymérisation des gels se fait par ajout de 0,1 % de persulfate d'ammonium (APS) et de 0,05 % de TEMED. La migration se déroule dans du tampon de migration TBE 0,5X, sous un courant électrique de 120 V durant 45 min. Le gel est alors mis à exposer contre un film autoradiographique (Fujifilm, Minato, Tokyo, Japon) durant 5 min avant de révéler ce dernier. Les bandes correspondant à la taille attendue sont découpées du gel et mises à incuber durant la nuit à 4 °C dans 400 µL de tampon TNE (0,1 M Tris pH 7,4 ; 100 mM NaCl ; 10 mM EDTA). Environ 50 % du substrat radioactif est récupéré ainsi. La quantification de l'activité radioactive se fait au compteur à scintillation (Beckman scintillation counter LS6500). Cet appareil mesure la lumière émise par le liquide scintillateur organique lorsqu'il reçoit de l'énergie par rayonnement. Il permet ainsi de quantifier l'activité radioactive d'un échantillon.

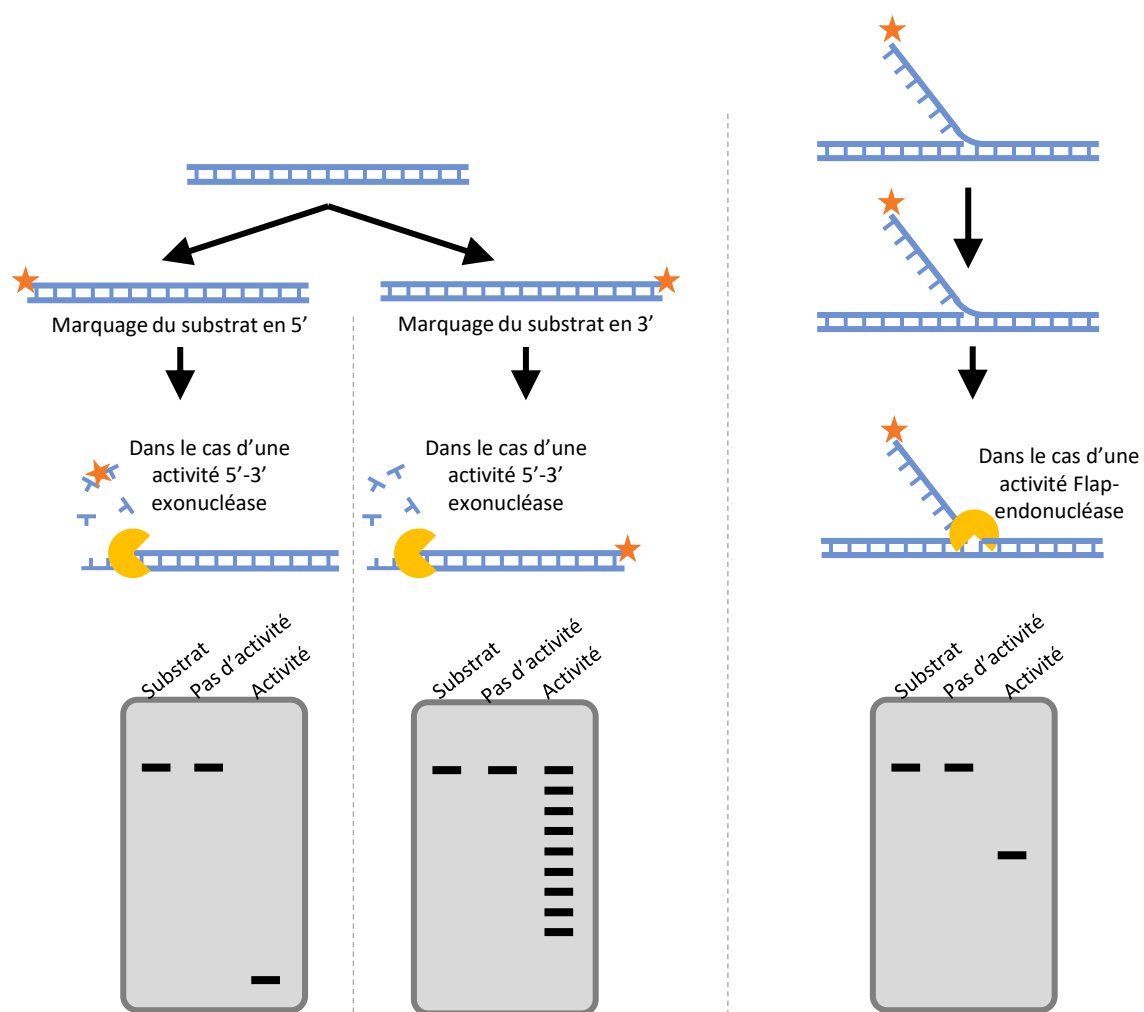


Figure MM5. Schéma résumant le principe des tests d'activité et les résultats possibles.

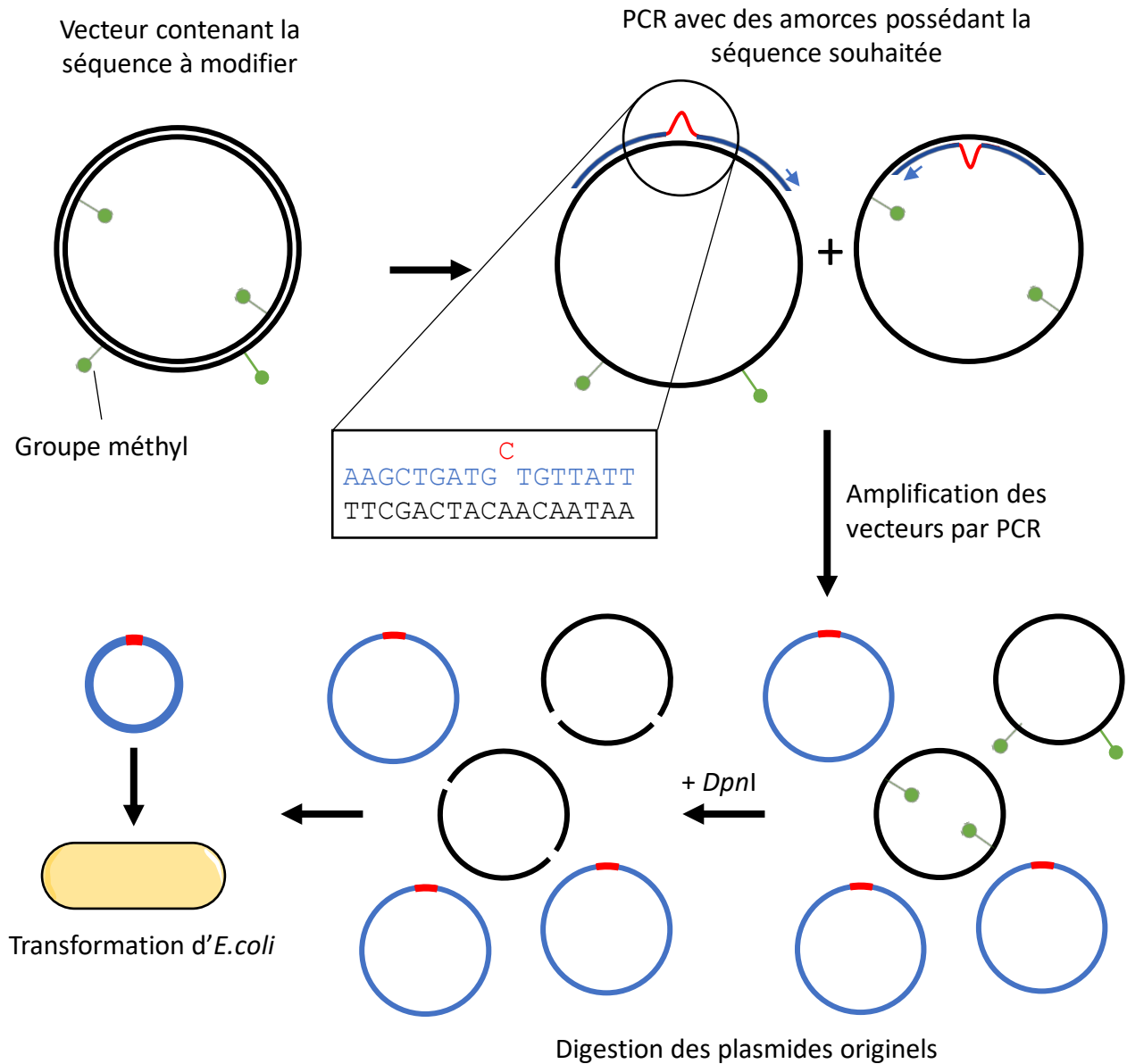
Les substrats à tester sont radiomarqués soit en 5' soit en 3' puis mis en présence de l'enzyme. Il est possible de caractériser l'activité de la protéine testée en fonction du profil obtenu après migration en gel de polyacrylamide dénaturant.

VIII.7 Tests d'activité

Les tests d'activité consistent en la mise en présence de la protéine d'intérêt avec différents substrats et l'observation du produit formé après migration sur gel de polyacrylamide. Durant ces expériences, différentes conditions, substrats et concentrations ont été testés. Je vais décrire ici les conditions les plus communes utilisées pour les tests. Afin d'obtenir des résultats homogènes pour différents temps, un milieu réactionnel est préparé pour des quantités équivalentes à $n + 1$ réactions. Pour chaque réaction, il est composé de 2 μL de substrat radiomarqué ; 2 μL de tampon de réaction 5X sans ion bivalent (250 mM Tris-HCl pH 8,0; 5 mM DTT; 0,5 mg/ml BSA; 20 % (v/v) glycérol) ; 2 μL d'ion bivalent 10 mM et 4 μL d'eau. Enfin, 1 μL d'enzyme à 15 μM par réaction sont ajoutés au temps $t=0$. Le milieu réactionnel est alors incubé à la température désirée (généralement 37 °C) durant le temps de la cinétique. A chaque point de cinétique, 10 μL du milieu réactionnel sont prélevés.

Pour les cinétiques analysées en condition non-dénaturante, les réactions ont été stoppées par ajout de 2 μL d'EDTA 50 mM et d'un tampon de charge non-dénaturant 6X (0,03 % (p/v) bleu de bromophénol; 60 % (v/v) glycérol; 60 mM EDTA; 10 mM Tris-HCl pH 7,6). Les produits du test d'activité sont analysés comme en VIII.6.

Pour les cinétiques analysées en conditions dénaturantes, les réactions ont été stoppées par ajout de 10 μL de solution STOP (95 % (v/v) formamide; 20 mM EDTA; 0,05 % (p/v) bleu de bromophénol; 0,05 % (p/v) xylène cyanol). Les produits du test d'activité sont déposés sur gel de polyacrylamide 17 % (rapport polyacrylamide/N,N'méthylène bisacrylamide 19/1), urée 7 M, ainsi que de tampon de migration TBE 1X (89 mM Tris pH 8,0; 89 mM acide borique; 2 mM EDTA). La polymérisation du gel se fait par ajout de 0,1 % persulfate d'ammonium (APS) et de 0,05 % TEMED. Le gel est préchauffé par migration à vide durant 30 min à 30 watts (pour un gel de 15 cm de haut sur 31 de large et épais d'un mm). Les échantillons sont préalablement chauffés 30 secondes à 95 °C avant dépôt et la migration se fait à 33 watts pendant une heure dans du tampon TBE 1X. Après migration, le gel encore collé sur une des plaques de verre, est enrobé de film plastique Saran Wrap est exposé contre une plaque de Phosphorimager (écran radio luminescent à mémoire, Fujifilm, Minato, Tokyo, Japon), dans une cassette d'autoradiographie, pendant une nuit à -80 °C. La révélation se fait au Phosphorimager (Amersham Typhoon biomolecular imager, GE Healthcare Life Sciences®). Les profils de gels attendus en fonction de l'activité de l'enzyme sont montrés en (Figure MM5).

A**B**

Mutation1 sens : AAGCTGATG^CTGTTATTGGAACACTG
 Mutation1 anti-sens : CAATAACAG^CCATCAGCTTCTACACCTG
 Mutation2 sens : CTCTCCAG^CCAAAGACTTCTTTCAG
 Mutation2 anti-sens : GTCTTTG^GCTGGAGAGACAACCTCG

Figure MM6. Schéma résumant les étapes de la mutagenèse dirigée.

(A) La séquence à modifier est clonée et insérée dans un vecteur. Les amorces sens et antisens utilisées pour la PCR sont complémentaires au gène à modifier mais possèdent le nucléotide à modifier. Les plasmides matrices méthylés sont digérés par *DpnI*. Le vecteur comprenant la mutation est ensuite cloné dans *E. coli*. (B) Séquences des oligonucléotides utilisés pour générer des mutants catalytiques de OEX1.

VIII.8 Génération de mutants catalytiques par mutagenèse dirigée

Dans le cadre de l'étude de l'activité d'une protéine, il est nécessaire de pouvoir générer des mutants catalytiques de ces protéines en tant que témoins négatifs. Les mutants catalytiques sont générés par modification d'un acide aspartique (D) en alanine (A) au niveau du site catalytique. L'acide aspartique étant codé par les codons GAT et GAC, une mutation ponctuelle du nucléotide A en C permet d'obtenir un codon codant pour une alanine (GCT ou GCC). La mutation ponctuelle se fait par amplification grâce à la PCR d'un plasmide contenant la séquence d'intérêt à l'aide d'amorces sens et anti-sens s'hybridant sur la séquence à muter. Elles sont complémentaires à la séquence du gène mais comportent le(s) nucléotide(s) à modifier (Figure MM6A). La PCR permet l'amplification de la totalité du plasmide matrice, elle est réalisée avec l'enzyme Phusion® High Fidelity DNA polymérase (Thermo Fisher Scientific®), une ADN polymérase hautement fidèle. Trente cycles de PCR sont réalisés, les 10 premiers synthétisent les brins avec la mutation et les 20 suivants servent à l'amplification spécifique des fragments mutés. Une digestion par l'enzyme de restriction DpnI permet ensuite d'éliminer le plasmide qui a servi de matrice, qui est méthylé. Deux mutations ponctuelles ont été réalisées sur chaque isoforme de OEX1 déplétée des 85 codons en 5' et insérée dans le vecteur pET28a. Elles permettent une mutation en positions 232 et 250 de la protéine. Les oligonucléotides permettant ces mutagenèses sont donnés dans la Figure MM6B. Les conditions de PCR sont les suivantes : 30 sec à 94°C (1 X) ; 15 sec à 98°C puis 20 sec à 47°C et 6 min à 72°C (10 X) ; 15 sec à 98°C puis 20 sec à 60°C et 6 min à 72°C (20 X) ; 8 min à 72°C. Le milieu de PCR est digéré par 1 µL de DpnI (Thermo Scientific, Fast Digest) durant 15 min à 37°C, puis 4 µL sont utilisés pour transformer des bactéries *E. coli* TOP10 compétentes (I.1). Les clones contenant la version mutée sont sélectionnés et vérifiés par séquençage. Les plasmides contenant la mutation sont utilisés pour transformer des bactéries *E. coli* BL21(DE3) permettant l'expression des protéines mutées.

PM1 Fw: AAGCTGATGCTGTTATTGGAACACTG

PM1 Rv: CAATAACAGCATCAGCTTCTACACCTG

PM2 Fw : CTCTCCAGCAAAGACTTCTTTCAG

PM2 Rv : GTCTTTGGCTGGAGAGACAACCTCG

IX. Méthode relative aux organelles : purification de mitochondries de plantes d'*Arabidopsis thaliana*

Cette méthode se base sur la différence de densité des mitochondries en comparaison des autres compartiments cellulaires, par séparation sur gradient de Percoll™ (Merck®). Afin de garantir l'intégrité des mitochondries, l'ensemble des étapes de purification se déroule en chambre froide à 4 °C. L'enrichissement en mitochondries est réalisé à partir de 50 g de plantules ou de rosettes d'*Arabidopsis thaliana*. Le broyage s'effectue par lot de 10 g de plantes auquel on ajoute 30 mL de tampon de broyage fraîchement préparé (300 mM saccharose; 25 mM tetrasodiumpyrophosphate; 2 mM EDTA; 10 mM KH₂PO₄; 1 % (p/v) PVP-40; 1 % (p/v) BSA; 20 mM ascorbate; 5 mM cystéine; 1 mM DTT; pH 7,5). Le broyage s'effectue dans le mixeur Waring Blender, en plusieurs sessions de 5 secondes entrecoupées de pauses permettant au broyat de refroidir. Le broyat est alors filtré sur deux couches de gaze et une couche de Miracloth (Merck®). Le filtrat est centrifugé 10 min à 1 500 g, le surnageant est repris et centrifugé 5 min à 3 200 g puis 5 min à 6 000 g. Ces centrifugations permettent l'élimination des débris cellulaires. Les mitochondries sont sédimentées par une centrifugation à 17 400 g pendant 20 min. Le culot est resuspendu dans 200 µL de tampon de lavage (0,3 M sucrose; 10 mM MOPS; 0,1 % BSA; pH 7,5) puis déposé sur un gradient de Percoll™ (5 mL à 45 %; 10 mL à 29 %; 10 mL à 18 % (v/v) dans le tampon de lavage) puis centrifugé 40 min à 40 000 g, dans un rotor Beckman JA25.5. Le frein de la centrifugeuse est désactivé. La bande du gradient contenant les mitochondries est prélevée à l'interface 29 %-45 % et les mitochondries sont lavées deux fois avec 20 mL de tampon de lavage sans BSA puis sédimentées 15 min à 31 000 g afin d'éliminer tout le Percoll™. Le culot est resuspendu dans du tampon de lavage sans BSA. Les mitochondries sont congelées dans de l'azote liquide et conservées à -80 °C.

Bibliographie

- Abdelnoor, R. v., Yule, R., Elo, A., Christensen, A.C., Meyer-Gauen, G., and Mackenzie, S.A.** (2003). Substoichiometric shifting in the plant mitochondrial genome is influenced by a gene homologous to MutS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 5968–5973.
- Adams, K.L., and Palmer, J.D.** (2003). Evolution of mitochondrial gene content: Gene loss and transfer to the nucleus. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 29, 380–395.
- Adé, J., Belzile, F., Philippe, H., and Doutriaux, M.-P.** (1999). Four mismatch repair paralogues coexist in *Arabidopsis thaliana*: AtMSH2, AtMSH3, AtMSH6-1 and AtMSH6-2. *Molecular and General Genetics MGG* 262, 239–249.
- Aguilera, A., and García-Muse, T.** (2012). R Loops: From Transcription Byproducts to Threats to Genome Stability. *Molecular Cell* 46, 115–124.
- Ahmad, A., Robinson, A.R., Duensing, A., van Drunen, E., Beverloo, H.B., Weisberg, D.B., Hasty, P., Hoeijmakers, J.H.J., and Niedernhofer, L.J.** (2008). ERCC1-XPF Endonuclease Facilitates DNA Double-Strand Break Repair. *Molecular and Cellular Biology* 28, 5082–5092.
- Akil, C., and Robinson, R.C.** (2018). Genomes of Asgard archaea encode profilins that regulate actin. *Nature* 562, 439–443.
- Alekseev, S., Luijsterburg, M.S., Pines, A., Geverts, B., Mari, P.-O., Giglia-Mari, G., Lans, H., Houtsmuller, A.B., Mullenders, L.H.F., Hoeijmakers, J.H.J., et al.** (2008). Cellular Concentrations of DDB2 Regulate Dynamic Binding of DDB1 at UV-Induced DNA Damage. *Molecular and Cellular Biology* 28, 7402–7413.
- Alexander, J.L., and Orr-Weaver, T.L.** (2016). Replication fork instability and the consequences of fork collisions from rereplication. *Genes and Development* 30, 2241–2252.
- Allers, T., and Lichten, M.** (2001). Differential timing and control of noncrossover and crossover recombination during meiosis. *Cell* 106, 47–57.
- Alonso, J.M., and Stepanova, A.N.** (2003). T-DNA mutagenesis in *Arabidopsis*. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.) 236, 177–188.
- Amoroso, A., Concia, L., Maggio, C., Raynaud, C., Bergounioux, C., Crespan, E., Cella, R., and Maga, G.** (2011). Oxidative DNA damage bypass in *Arabidopsis thaliana* requires DNA polymerase λ and proliferating cell nuclear antigen 2. *Plant Cell* 23, 806–822.
- Anand, R.P., Lovett, S.T., and Haber, J.E.** (2013). Break-induced DNA replication. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5.
- Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., de Bruijn, M.H.L., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F., et al.** (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290, 457–465.
- Anstey-Gilbert, C.S., Hemsworth, G.R., Flemming, C.S., Hodkinson, M.R.G., Zhang, J., Sedelnikova, S.E., Stillman, T.J., Sayers, J.R., and Artymiuk, P.J.** (2013). The structure of *Escherichia coli* ExoIX - Implications for DNA binding and catalysis in flap endonucleases. *Nucleic Acids Research* 41, 8357–8367.

- Aravind, L., and Koonin, E. v.** (2001). Prokaryotic homologs of the eukaryotic DNA-end-binding protein Ku, novel domains in the Ku protein and prediction of a prokaryotic double-strand break repair system. *Genome Research* *11*, 1365–1374.
- Aravind, L., Makarova, K.S., and Koonin, E. v.** (2000). Holliday junction resolvases and related nucleases: Identification of new families, phyletic distribution and evolutionary trajectories. *Nucleic Acids Research* *28*, 3417–3432.
- Arimura, S.I., and Tsutsumi, N.** (2002). A dynamin-like protein (ADL2b), rather than FtsZ, is involved in Arabidopsis mitochondrial division. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *99*, 5727–5731.
- Arimura, S. ichi, Ayabe, H., Sugaya, H., Okuno, M., Tamura, Y., Tsuruta, Y., Watari, Y., Yanase, S., Yamauchi, T., Itoh, T., et al.** (2020). Targeted gene disruption of ATP synthases 6-1 and 6-2 in the mitochondrial genome of Arabidopsis thaliana by mitoTALENs. *Plant Journal* *104*, 1459–1471.
- Arimura, S.I., Yamamoto, J., Aida, G.P., Nakazono, M., and Tsutsumi, N.** (2004). Frequent fusion and fission of plant mitochondria with unequal nucleoid distribution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *101*, 7805–7808.
- Arrieta-Montiel, M.P., Shedge, V., Davila, J., Christensen, A.C., and Mackenzie, S.A.** (2009). Diversity of the arabidopsis mitochondrial genome occurs via nuclear-controlled recombination activity. *Genetics* *183*, 1261–1268.
- Asada, K., Allen, J., Foyer, C.H., and Matthijs, H.C.P.** (2000). The water-water cycle as alternative photon and electron sinks. In *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, (Royal Society), pp. 1419–1431.
- Ayala-García, V.M., Baruch-Torres, N., García-Medel, P.L., and Briebe, L.G.** (2018). Plant organellar DNA polymerases paralogs exhibit dissimilar nucleotide incorporation fidelity. *The FEBS Journal* *285*, 4005–4018.
- Backert, S.** (2002). R-loop-dependent rolling-circle replication and a new model for DNA concatemer resolution by mitochondrial plasmid mp1. *EMBO Journal* *21*, 3128–3136.
- Backert, S., Lurz, R., and Börner, T.** (1996a). Electron microscopic investigation of mitochondrial DNA from *Chenopodium album* (L.). *Current Genetics* *29*, 427–436.
- Backert, S., Dörfel, P., Lurz, R., and Börner, T.** (1996b). Rolling-circle replication of mitochondrial DNA in the higher plant *Chenopodium album* (L.). *Molecular and Cellular Biology* *16*, 6285–6294.
- Backert, S., Nielsen, B.L., and Börner, T.** (1997). The mystery of the rings: Structure and replication of mitochondrial genomes from higher plants. *Trends in Plant Science* *2*, 477–483.
- Bae, S.H., Bae, K.H., Kim, J.A., and Seo, Y.S.** (2001). RPA governs endonuclease switching during processing of Okazaki fragments in eukaryotes. *Nature* *412*, 456–461.
- Balakrishnan, L., and Bambara, R.A.** (2013a). Okazaki fragment metabolism. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* *5*.
- Balakrishnan, L., and Bambara, R.A.** (2013b). Flap endonuclease 1. *Annual Review of Biochemistry* *82*, 119–138.
- Barr, C.M., Neiman, M., and Taylor, D.R.** (2005). Inheritance and recombination of mitochondrial genomes in plants, fungi and animals. *New Phytologist* *168*, 39–50.

- Barros, M.H., and McStay, G.P.** (2020). Modular biogenesis of mitochondrial respiratory complexes. *Mitochondrion* 50, 94–114.
- Bartsch, H.** (1996). DNA adducts in human carcinogenesis: Etiological relevance and structure-activity relationship. *Mutation Research - Reviews in Genetic Toxicology* 340, 67–79.
- Baruch-Torres, N., and Briebe, L.G.** (2017). Plant organellar DNA polymerases are replicative and translesion DNA synthesis polymerases. *Nucleic Acids Research* 45, 10751–10763.
- Batista, L.F.Z., Kaina, B., Meneghini, R., and Menck, C.F.M.** (2009). How DNA lesions are turned into powerful killing structures: Insights from UV-induced apoptosis. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research* 681, 197–208.
- Battle, M.W., and Jones, M.A.** (2020). Cryptochromes integrate green light signals into the circadian system. *Plant Cell and Environment* 43, 16–27.
- Bauwe, H., Hagemann, M., and Fernie, A.R.** (2010). Photorespiration: players, partners and origin. *Trends in Plant Science* 15, 330–336.
- Beam, C.E., Saveson, C.J., and Lovett, S.T.** (2002). Role for radA/sms in recombination intermediate processing in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 184, 6836–6844.
- Bębenek, A., and Ziuzia-Graczyk, I.** (2018). Fidelity of DNA replication—a matter of proofreading. *Current Genetics* 64, 985–996.
- Becherel, O.J., and Fuchs, R.P.P.** (2001). Mechanism of DNA polymerase II-mediated frameshift mutagenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 8566–8571.
- Becker, M.M., and Wang, Z.** (1989). Origin of ultraviolet damage in DNA. *Journal of Molecular Biology* 210, 429–438.
- Beckman, K.B., and Ames, B.N.** (1996). Detection and quantification of oxidative adducts of mitochondrial DNA. *Methods in Enzymology* 264, 442–453.
- Beerens, N., Hoeijmakers, J.H.J., Kanaar, R., Vermeulen, W., and Wyman, C.** (2005). The CSB protein actively wraps DNA. *Journal of Biological Chemistry* 280, 4722–4729.
- Begyn, K., Kim, T.D., Heyndrickx, M., Michiels, C., Aertsen, A., Rajkovic, A., and Devlieghere, F.** (2020). Directed evolution by UV-C treatment of *Bacillus cereus* spores. *International Journal of Food Microbiology* 317.
- Beland, F.A., and Poirier, M.C.** (1993). Significance of DNA adduct studies in animal models for cancer molecular dosimetry and risk assessment. In *Environmental Health Perspectives, (Environ Health Perspect)*, pp. 5–10.
- Belotserkovskii, B.P., Neil, A.J., Saleh, S.S., Shin, J.H.S., Mirkin, S.M., and Hanawalt, P.C.** (2013). Transcription blockage by homopurine DNA sequences: Role of sequence composition and single-strand breaks. *Nucleic Acids Research* 41, 1817–1828.
- Bennardo, N., Cheng, A., Huang, N., and Stark, J.M.** (2008). Alternative-NHEJ is a mechanistically distinct pathway of mammalian chromosome break repair. *PLoS Genetics* 4.
- Bernard, P., and Couturier, M.** (1992). Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes. *Journal of Molecular Biology* 226, 735–745.

- Bhardwaj, A., Ghose, D., Gopal Thakur, K., and Dutta, D.** (2018). Escherichia coli β -clamp slows down DNA polymerase I dependent nick translation while accelerating ligation. *PLoS ONE* *13*.
- Bhatia, V., Barroso, S.I., García-Rubio, M.L., Tumini, E., Herrera-Moyano, E., and Aguilera, A.** (2014). BRCA2 prevents R-loop accumulation and associates with TREX-2 mRNA export factor PCID2.
- Bierne, H., and Michel, B.** (1994). When replication forks stop. *Molecular Microbiology* *13*, 17–23.
- Blanchard, J.L., and Lynch, M.** (2000). Organellar genes. Why do they end up in the nucleus? *Trends in Genetics* *16*, 315–320.
- Boesch, P., Ibrahim, N., Paulus, F., Cosset, A., Tarasenko, V., and Dietrich, A.** (2009). Plant mitochondria possess a short-patch base excision DNA repair pathway. *Nucleic Acids Research* *37*, 5690–5700.
- Boguslawski, S.J., Smith, D.E., Michalak, M.A., Mickelson, K.E., Yehle, C.O., Patterson, W.L., and Carrico, R.J.** (1986). Characterization of monoclonal antibody to DNA:RNA and its application to immunodetection of hybrids.
- Bogutzki, A., Naue, N., Litz, L., Pich, A., and Curth, U.** (2019). E. coli primase and DNA polymerase III holoenzyme are able to bind concurrently to a primed template during DNA replication. *Scientific Reports* *9*.
- Bohne, A.V.** (2014). The nucleoid as a site of rRNA processing and ribosome assembly. *Frontiers in Plant Science* *5*.
- Boque-Sastre, R., Soler, M., Oliveira-Mateos, C., Portela, A., Moutinho, C., Sayols, S., Villanueva, A., Esteller, M., and Guil, S.** (2015). Head-to-head antisense transcription and R-loop formation promotes transcriptional activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *112*, 5785–5790.
- Botté, C.Y., and Maréchal, E.** (2014). Plastids with or without galactoglycerolipids. *Trends in Plant Science* *19*, 71–78.
- Brennicke, A., Grohmann, L., Hiesel, R., Knoop, V., and Schuster, W.** (1993). The mitochondrial genome on its way to the nucleus: different stages of gene transfer in higher plants. *FEBS Letters* *325*, 140–145.
- Brettel, K., and Byrdin, M.** (2010). Reaction mechanisms of DNA photolyase. *Current Opinion in Structural Biology* *20*, 693–701.
- Brown, W.C., and Romano, L.J.** (1989). Benzo[a]pyrene-DNA adducts inhibit translocation by the gene 4 protein of bacteriophage T7. *Journal of Biological Chemistry* *264*, 6748–6754.
- Bullock, C.R., Xing, X., and Shcherbakova, P. V.** (2020). Mismatch repair and DNA polymerase δ proofreading prevent catastrophic accumulation of leading strand errors in cells expressing a cancer-associated DNA polymerase ϵ variant. *Nucleic Acids Research* *48*, 9124–9134.
- Burns, J.A., Pittis, A.A., and Kim, E.** (2018). Gene-based predictive models of trophic modes suggest Asgard archaea are not phagocytotic. *Nature Ecology and Evolution* *2*, 697–704.
- Cadet, J., Berger, M., Douki, T., and Ravanat, J.L.** (1997). Oxidative damage to DNA: formation, measurement, and biological significance. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology* *131*, 1–87.

- Canturk, F., Karaman, M., Selby, C.P., Kemp, M.G., Kulaksiz-Erkmen, G., Hu, J., Li, W., Lindsey-Boltz, L.A., and Sancar, A.** (2016). Nucleotide excision repair by dual incisions in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *113*, 4706–4710.
- Cappadocia, L., Parent, J.S., Zampini, É., Lepage, É., Sygusch, J., and Brisson, N.** (2012). A conserved lysine residue of plant Whirly proteins is necessary for higher order protein assembly and protection against DNA damage. *Nucleic Acids Research* *40*, 258–269.
- Carlsson, J., Leino, M., Sohlberg, J., Sundström, J.F., and Glimelius, K.** (2008). Mitochondrial regulation of flower development. *Mitochondrion* *8*, 74–86.
- Caron, P.R., Kushner, S.R., and Grossman, L.** (1985). Involvement of helicase II (uvrD gene product) and DNA polymerase I in excision mediated by the uvrABC protein complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *82*, 4925–4929.
- Cecchini, G.** (2003). Function and structure of complex II of the respiratory chain. *Annual Review of Biochemistry* *72*, 77–109.
- Cerritelli, S.M., and Crouch, R.J.** (2009). Ribonuclease H: The enzymes in eukaryotes. *FEBS Journal* *276*, 1494–1505.
- Chen, L.-J., and Li, H.** (2017). Stable megadalton TOC-TIC supercomplexes as major mediators of protein import into chloroplasts. *The Plant Journal* *92*, 178–188.
- Chen, J.J., Jiang, C.Z., and Britt, A.B.** (1996a). Little or no repair of cyclobutyl pyrimidine dimers is observed in the organellar genomes of the young arabidopsis seedling. *Plant Physiology* *111*, 19–25.
- Chen, Q., Vazquez, E.J., Moghaddas, S., Hoppel, C.L., and Lesnefsky, E.J.** (2003). Production of reactive oxygen species by mitochondria: Central role of complex III. *Journal of Biological Chemistry* *278*, 36027–36031.
- Chen, X., Gresham, A., Morrison, A., and Pentland, A.P.** (1996b). Oxidative stress mediates synthesis of cytosolic phospholipase a 2 after UVB injury. *Biochimica et Biophysica Acta - Lipids and Lipid Metabolism* *1299*, 23–33.
- Cheon, N.Y., Kim, H.S., Yeo, J.E., Schärer, O.D., and Lee, J.Y.** (2019). Single-molecule visualization reveals the damage search mechanism for the human NER protein XPC-RAD23B. *Nucleic Acids Research* *47*, 8337–8347.
- Chevigny, N.** (2019). Caractérisation des fonctions de TRCF et de RADA dans l'expression et la maintenance des génomes des organelles chez *Arabidopsis thaliana*.
- Chevigny, N., Nadiras, C., Raynaud, C., le Ret, M., Bichara, M., Erhardt, M., Dietrich, A., and Gualberto, J.M.** (2019). RADA is the main branch migration factor in plant mitochondrial recombination and its defect leads to mtDNA instability and cell cycle arrest. *BioRxiv* 856716.
- Chevigny, N., Schatz-Daas, D., Lotfi, F., and Gualberto, J.M.** (2020). DNA repair and the stability of the plant mitochondrial genome. *International Journal of Molecular Sciences* *21*.
- Chiu, W.L., and Sears, B.B.** (1992). Electron microscopic localization of replication origins in *Oenothera* chloroplast DNA. *MGG Molecular & General Genetics* *232*, 33–39.
- Christensen, A.C.** (2013). Plant mitochondrial genome evolution can be explained by DNA repair mechanisms. *Genome Biology and Evolution* *5*, 1079–1086.

- Christensen, A.C.** (2018). Mitochondrial DNA Repair and Genome Evolution. In *Annual Plant Reviews Online*, (John Wiley & Sons, Ltd), pp. 11–32.
- Christensen, L.A., Wang, H., Houten, B. van, and Vasquez, K.M.** (2008). Efficient processing of TFO-directed psoralen DNA interstrand crosslinks by the UvrABC nuclease. *Nucleic Acids Research* 36, 7136–7145.
- Ciesielski, G.L., Oliveira, M.T., and Kaguni, L.S.** (2016). Animal Mitochondrial DNA Replication. In *Enzymes*, (Academic Press), pp. 255–292.
- Clough, S.J., and Bent, A.F.** (1998). Floral dip: A simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 16, 735–743.
- Colombini, M.** (2016). The VDAC channel: Molecular basis for selectivity. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1863, 2498–2502.
- Cordeiro-Stone, M., Zaritskaya, L.S., Price, L.K., and Kaufmann, W.K.** (1997). Replication fork bypass of a pyrimidine dimer blocking leading strand DNA synthesis. *Journal of Biological Chemistry* 272, 13945–13954.
- Córdoba-Cañero, D., Morales-Ruiz, T., Roldán-Arjona, T., and Ariza, R.R.** (2009). Single-nucleotide and long-patch base excision repair of DNA damage in plants. *Plant Journal* 60, 716–728.
- Córdoba-Cañero, D., Roldán-Arjona, T., and Ariza, R.R.** (2014). *Arabidopsis* ZDP DNA 3'-phosphatase and ARP endonuclease function in 8-oxoG repair initiated by FPG and OGG1 DNA glycosylases. *The Plant Journal* 79, 824–834.
- Cromie, G.A., and Leach, D.R.F.** (2000). Control of crossing over. *Molecular Cell* 6, 815–826.
- Cupp, J.D., and Nielsen, B.L.** (2013). *Arabidopsis thaliana* organellar DNA polymerase IB mutants exhibit reduced mtDNA levels with a decrease in mitochondrial area density. *Physiologia Plantarum* 149, 91–103.
- Curtis, M.D., and Grossniklaus, U.** (2003). A Gateway Cloning Vector Set for High-Throughput Functional Analysis of Genes in *Planta*. *Plant Physiology* 133, 462–469.
- Dai, C., Cao, Z., Wu, Y., Yi, H., Jiang, D., and Li, W.** (2007). Improved fusion protein expression of EGFP via the mutation of both Kozak and the initial ATG codon. *Cellular and Molecular Biology Letters* 12, 362–369.
- Dai, H., Lo, Y.S., Litvinchuk, A., Wang, Y.T., Jane, W.N., Hsiao, L.J., and Chiang, K.S.** (2005). Structural and functional characterizations of mung bean mitochondrial nucleoids. *Nucleic Acids Research* 33, 4725–4739.
- Davey, M.J., Fang, L., McInerney, P., Geörgescu, R.E., and O'Donnell, M.** (2002). The DnaC helicase loader is a dual ATP/ADP switch protein. *EMBO Journal* 21, 3148–3159.
- Davila, J.I., Arrieta-Montiel, M.P., Wamboldt, Y., Cao, J., Hagmann, J., Shedge, V., Xu, Y.Z., Weigel, D., and Mackenzie, S.A.** (2011). Double-strand break repair processes drive evolution of the mitochondrial genome in *Arabidopsis*. *BMC Biology* 9.
- Daxinger, L., Hunter, B., Sheikh, M., Jauvion, V., Gascioli, V., Vaucheret, H., Matzke, M., and Furrer, I.** (2008). Unexpected silencing effects from T-DNA tags in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Science* 13, 4–6.

- Deem, A., Keszthelyi, A., Blackgrove, T., Vayl, A., Coffey, B., Mathur, R., Chabes, A., and Malkova, A.** (2011). Break-induced replication is highly inaccurate. *PLoS Biology* 9.
- Demple, B., and Harrison, L.** (1994). Repair of oxidative damage to DNA: Enzymology and biology. *Annual Review of Biochemistry* 63, 915–948.
- D’Erchia, A.M., Atlante, A., Gadaleta, G., Pavesi, G., Chiara, M., de Virgilio, C., Manzari, C., Mastropasqua, F., Prazzoli, G.M., Picardi, E.,** (2015). Tissue-specific mtDNA abundance from exome data and its correlation with mitochondrial transcription, mass and respiratory activity. *Mitochondrion* 20, 13–21.
- Dereeper, A., Guignon, V., Blanc, G., Audic, S., Buffet, S., Chevenet, F., Dufayard, J.F., Guindon, S., Lefort, V., Lescot, M.,** (2008). Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Research* 36.
- Desfeux, C., Clough, S.J., and Bent, A.F.** (2000). Female reproductive tissues are the primary target of *Agrobacterium*-mediated transformation by the *Arabidopsis* floral-dip method. *Plant Physiology* 123, 895–904.
- Dillon, S.C., and Dorman, C.J.** (2010). Bacterial nucleoid-associated proteins, nucleoid structure and gene expression. *Nature Reviews Microbiology* 8, 185–195.
- Diray-Arce, J., Liu, B., Cupp, J.D., Hunt, T., and Nielsen, B.L.** (2013). The *Arabidopsis* At1g30680 gene encodes a homologue to the phage T7 gp4 protein that has both DNA primase and DNA helicase activities. *BMC Plant Biology* 13.
- Dismukes, G.C., Klimov, V. v., Baranov, S. v., Kozlov, Y.N., DasGupta, J., and Tyrishkin, A.** (2001). The origin of atmospheric oxygen on Earth: The innovation of oxygenic photosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 2170–2175.
- Donahue, B.A., Fuchs, R.P.P., Reines, D., and Hanawalt, P.C.** (1996). Effects of aminofluorene and acetylaminofluorene DNA adducts on transcriptional elongation by RNA polymerase II. *Journal of Biological Chemistry* 271, 10588–10594.
- Doniwa, Y., Arimura, S., and Tsutsumi, N.** (2007). Mitochondria use actin filaments as rails for fast translocation in *Arabidopsis* and tobacco cells. *Plant Biotechnology* 24, 441–447.
- Douglas, S.E., and Penny, S.L.** (1999). The plastid genome of the cryptophyte alga, *Guillardia theta*: Complete sequence and conserved synteny groups confirm its common ancestry with red algae. *Journal of Molecular Evolution* 48, 236–244.
- Drolet, M., and Brochu, J.** (2019). R-loop-dependent replication and genomic instability in bacteria. *DNA Repair* 84.
- Drolet, M., Phoenix, P., Menzel, R., Massé, E., Liu, L.F., and Crouch, R.J.** (1995). Overexpression of RNase H partially complements the growth defect of an *Escherichia coli* Δ topA mutant: R-loop formation is a major problem in the absence of DNA topoisomerase I. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 3526–3530.
- Dronkert, M.L.G., and Kanaar, R.** (2001). Repair of DNA interstrand cross-links. *Mutation Research - DNA Repair* 486, 217–247.

- Du, K., Xiao, Y., Liu, Q., Wu, X., Jiang, J., Wu, J., Fang, Y., Xiang, Y., and Wang, Y.** (2019). Abnormal tapetum development and energy metabolism associated with sterility in SaNa-1A CMS of *Brassica napus* L. *Plant Cell Reports* 38, 545–558.
- Duan, S., Hu, L., Dong, B., Jin, H.L., and Wang, H. bin** (2020). Signaling from Plastid Genome Stability Modulates Endoreplication and Cell Cycle during Plant Development. *Cell Reports* 32.
- Dupaigne, P., le Breton, C., Fabre, F., Gangloff, S., le Cam, E., and Veaute, X.** (2008). The Srs2 Helicase Activity Is Stimulated by Rad51 Filaments on dsDNA: Implications for Crossover Incidence during Mitotic Recombination. *Molecular Cell* 29, 243–254.
- Dupureur, C.M.** (2008). Roles of metal ions in nucleases. *Current Opinion in Chemical Biology* 12, 250–255.
- De Duve, C., and Baudhuin, P.** (1966). Peroxisomes (microbodies and related particles). *Physiological Reviews* 46, 323–357.
- Edelmann, W., Yang, K., Umar, A., Heyer, J., Lau, K., Fan, K., Liedtke, W., Cohen, P.E., Kane, M.F., Lipford, J.R., et al.** (1997). Mutation in the mismatch repair gene Msh6 causes cancer susceptibility. *Cell* 91, 467–477.
- Edmondson, A.C., Song, D., Alvarez, L.A., Wall, M.K., Almond, D., McClellan, D.A., Maxwell, A., and Nielsen, B.L.** (2005). Characterization of a mitochondrially targeted single-stranded DNA-binding protein in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Genetics and Genomics* 273, 115–122.
- Ehara, H., Yokoyama, T., Shigematsu, H., Yokoyama, S., Shirouzu, M., and Sekine, S.I.** (2017). Structure of the complete elongation complex of RNA polymerase II with basal factors. *Science* 357, 921–924.
- Evans-Roberts, K.M., Mitchenall, L.A., Wall, M.K., Leroux, J., Mylne, J.S., and Maxwell, A.** (2016). DNA gyrase is the target for the quinolone drug ciprofloxacin in *arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* 291, 3136–3144.
- Falkenberg, M.** (2018). Mitochondrial DNA replication in mammalian cells: Overview of the pathway. *Essays in Biochemistry* 62, 287–296.
- Ferrando, B., Furlanetto, A.L.D.M., Gredilla, R., Havelund, J.F., Hebelstrup, K.H., Møller, I.M., and Stevensner, T.** (2019). DNA repair in plant mitochondria – a complete base excision repair pathway in potato tuber mitochondria. *Physiologia Plantarum* 166, 494–512.
- Ferreira, M.G., and Cooper, J.P.** (2004). Two modes of DNA double-strand break repair are reciprocally regulated through the fission yeast cell cycle. *Genes and Development* 18, 2249–2254.
- Foley, M.C., Couto, L., Rauf, S., and Boyke, A.** (2019). Insights into DNA polymerase δ 's mechanism for accurate DNA replication. *Journal of Molecular Modeling* 25.
- Fontanesi, F.** (2015). Mitochondria: Structure and Role in Respiration. In *ELS*, (Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd), pp. 1–13.
- Frederico, L.A., Shaw, B.R., and Kunkel, T.A.** (1990). A Sensitive Genetic Assay for the Detection of Cytosine Deamination: Determination of Rate Constants and the Activation Energy. *Biochemistry* 29, 2532–2537.
- Frederico, L.A., Shaw, B.R., and Kunkel, T.A.** (1993). Cytosine Deamination in Mismatched Base Pairs. *Biochemistry* 32, 6523–6530.

- Fujii, S., and Fuchs, R.P.** (2009). Biochemical basis for the essential genetic requirements of RecA and the β -clamp in Pol V activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 14825–14830.
- Fujii, S., and Fuchs, R.P.** (2020). A Comprehensive View of Translesion Synthesis in *Escherichia coli*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 84.
- Fukui, K., Harada, A., Wakamatsu, T., Minobe, A., Ohshita, K., Ashiuchi, M., and Yano, T.** (2018). The GIY-YIG endonuclease domain of Arabidopsis MutS homolog 1 specifically binds to branched DNA structures. *FEBS Letters* 592, 4066–4077.
- Gabaldón, T., and Pittis, A.A.** (2015). Origin and evolution of metabolic sub-cellular compartmentalization in eukaryotes. *Biochimie* 119, 262–268.
- Gan, W., Guan, Z., Liu, J., Gui, T., Shen, K., Manley, J.L., and Li, X.** (2011). R-loop-mediated genomic instability is caused by impairment of replication fork progression. *Genes and Development* 25, 2041–2056.
- García-Medel, P.L., Baruch-Torres, N., Peralta-Castro, A., Trasviña-Arenas, C.H., Torres-Larios, A., and Brieba, L.G.** (2019). Plant organellar DNA polymerases repair double-stranded breaks by microhomology-mediated end-joining. *Nucleic Acids Research* 47, 3028–3044.
- Georgescu, R.E., Yao, N.Y., and O'Donnell, M.** (2010). Single-molecule analysis of the *Escherichia coli* replisome and use of clamps to bypass replication barriers. *FEBS Letters* 584, 2596–2605.
- Ghodke, H., Ho, H.N., and van Oijen, A.M.** (2019). Single-molecule live-cell imaging visualizes parallel pathways of prokaryotic nucleotide excision repair. *BioRxiv* 515502.
- Gietz, R.D., and Schiestl, R.H.** (2007). High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nature Protocols* 2, 31–34.
- Ginno, P.A., Lott, P.L., Christensen, H.C., Korf, I., and Chédin, F.** (2012). R-Loop Formation Is a Distinctive Characteristic of Unmethylated Human CpG Island Promoters. *Molecular Cell* 45, 814–825.
- Glas, A.F., Kaya, E., Schneider, S., Heil, K., Fazio, D., Maul, M.J., and Carell, T.** (2010). DNA (6-4) photolyases reduce dewar isomers for isomerization into (6-4) lesions. *Journal of the American Chemical Society* 132, 3254–3255.
- Goldberg, A. v., Molik, S., Tsaousis, A.D., Neumann, K., Kuhnke, G., Delbac, F., Vivares, C.P., Hirt, R.P., Lill, R., and Embley, T.M.** (2008). Localization and functionality of microsporidian iron-sulphur cluster assembly proteins. *Nature* 452, 624–628.
- Gonz, A., Jimi~nez, A., Davies, J.E., and Schindler, D.** (1978). Bba 99325 studies on the mode of action of hygromycin b, an inhibitor of translocation in eukaryotes.
- Gray, M.W.** (1999). Evolution of organellar genomes. *Current Opinion in Genetics and Development* 9, 678–687.
- Grefen, C., Donald, N., Hashimoto, K., Kudla, J., Schumacher, K., and Blatt, M.R.** (2010). A ubiquitin-10 promoter-based vector set for fluorescent protein tagging facilitates temporal stability and native protein distribution in transient and stable expression studies. *Plant Journal* 64, 355–365.

- Greiner, S., Golczyk, H., Malinova, I., Pellizzer, T., Bock, R., Börner, T., and Herrmann, R.G.** (2020). Chloroplast nucleoids are highly dynamic in ploidy, number, and structure during angiosperm leaf development. *Plant Journal* *102*, 730–746.
- De Groot, M.J. a., Offringa, R., Does, M.P., Hooykaas, P.J.J., and van den Elzen, P.J. m.** (1992). Mechanisms of intermolecular homologous recombination in plants as studied with single- and double-stranded DNA molecules. *Nucleic Acids Research* *20*, 2785–2794.
- Grübler, B., Cozzi, C., and Pfannschmidt, T.** (2021). A core module of nuclear genes regulated by biogenic retrograde signals from plastids. *Plants* *10*, 1–20.
- Gualberto, J.M., and Kühn, K.** (2014). DNA-binding proteins in plant mitochondria: Implications for transcription. *Mitochondrion* *19*, 323–328.
- Gualberto, J.M., and Newton, K.J.** (2017). Plant Mitochondrial Genomes: Dynamics and Mechanisms of Mutation. *Annual Review of Plant Biology* *68*, 225–252.
- Gualberto, J.M., Mileshina, D., Wallet, C., Niazi, A.K., Weber-Lotfi, F., and Dietrich, A.** (2014). The plant mitochondrial genome: Dynamics and maintenance. *Biochimie* *100*, 107–120.
- Gualberto, J.M., le Ret, M., Beator, B., and Uhn, K.K.”** (2015). The RAD52-like protein ODB1 is required for the efficient excision of two mitochondrial introns spliced via first-step hydrolysis. *Nucleic Acids Research* *43*, 6500–6510.
- Guilley, H., Dudley, R.K., Jonard, G., Balàzs, E., and Richards, K.E.** (1982). Transcription of cauliflower mosaic virus DNA: detection of promoter sequences, and characterization of transcripts. *Cell* *30*, 763–773.
- Guo, J.-X., and Liu, Y.-G.** (2012). Molecular Control of Male Reproductive Development and Pollen Fertility in Rice ^F. *Journal of Integrative Plant Biology* *54*, 967–978.
- Hada, M., Hino, K., Buchholz, G., Goss, J., Wellmann, E., and Shin, M.** (2000). Assay of DNA photolyase activity in spinach leaves in relation to cell compartmentation-evidence for lack of DNA photolyase in chloroplasts. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* *64*, 1288–1291.
- el Hage, A., French, S.L., Beyer, A.L., and Tollervey, D.** (2010). Loss of Topoisomerase I leads to R-loop-mediated transcriptional blocks during ribosomal RNA synthesis. *Genes and Development* *24*, 1546–1558.
- Hamperl, S., and Cimprich, K.A.** (2014). The contribution of co-transcriptional RNA: DNA hybrid structures to DNA damage and genome instability. *DNA Repair* *19*, 84–94.
- Han, E.S., Cooper, D.L., Persky, N.S., Suttera, V.A., Whitaker, R.D., Montello, M.L., and Lovett, S.T.** (2006). RecJ exonuclease: Substrates, products and interaction with SSB. *Nucleic Acids Research* *34*, 1084–1091.
- Hedglin, M., Kumar, R., and Benkovic, S.J.** (2013). Replication clamps and clamp loaders. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* *5*, 1–19.
- Hedtke, B., Börner, T., and Weihe, A.** (1997). Mitochondrial and chloroplast phage-type RNA polymerases in Arabidopsis. *Science* *277*, 809–811.
- Hegazy, Y.A., Fernando, C.M., and Tran, E.J.** (2020). The balancing act of R-loop biology: The good, the bad, and the ugly. *Journal of Biological Chemistry* *295*, 905–913.

- Hoerlein, G.** (1994). Glufosinate (phosphinothricin), a natural amino acid with unexpected herbicidal properties. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 138, 73–145.
- Hoitzing, H., Johnston, I.G., and Jones, N.S.** (2015). What is the function of mitochondrial networks? A theoretical assessment of hypotheses and proposal for future research. *BioEssays* 37, 687–700.
- Hong, X., Cadwell, G.W., and Kogomal, T.** (1995). *Escherichia coli* RecG and RecA proteins in R-loop formation.
- van der Horst, G.T.J., Muijtjens, M., Kobayashi, K., Takano, R., Kanno, S.I., Takao, M., de Wit, J., Verkerk, A., Eker, A.P.M., van Leenen, D., et al.** (1999). Mammalian Cry1 and Cry2 are essential for maintenance of circadian rhythms. *Nature* 398, 627–630.
- Houten, S.M., and Wanders, R.J.A.** (2010). A general introduction to the biochemistry of mitochondrial fatty acid β -oxidation. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 33, 469–477.
- van Houten, B., Croteau, D.L., DellaVecchia, M.J., Wang, H., and Kisker, C.** (2005). “Close-fitting sleeves”: DNA damage recognition by the UvrABC nuclease system. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 577, 92–117.
- Howland, G.P.** (1975). Dark-repair of ultraviolet-induced pyrimidine dimers in the DNA of wild carrot protoplasts. *Nature* 254, 160–161.
- Huang, C.Y., Ayliffe, M.A., and Timmis, J.N.** (2003). Direct measurement of the transfer rate of chloroplast DNA into the nucleus. *Nature* 422, 72–76.
- Hyjek, M., Figiel, M., and Nowotny, M.** (2019). RNases H: Structure and mechanism. *DNA Repair* 84, 102672.
- Imachi, H., Nobu, M.K., Nakahara, N., Morono, Y., Ogawara, M., Takaki, Y., Takano, Y., Uematsu, K., Ikuta, T., Ito, M., et al.** (2020). Isolation of an archaeon at the prokaryote–eukaryote interface. *Nature* 577, 519–525.
- Imlay, J.A.** (2003). Pathways of Oxidative Damage. *Annual Review of Microbiology* 57, 395–418.
- Ithurbide, S., Bentchikou, E., Coste, G., Bost, B., Servant, P., and Sommer, S.** (2015). Single Strand Annealing Plays a Major Role in RecA-Independent Recombination between Repeated Sequences in the Radioresistant *Deinococcus radiodurans* Bacterium. *PLoS Genetics* 11.
- Ivanov, E.L., Sugawara, N., Fishman-Lobell, J., and Haber, J.E.** (1996). Genetic requirements for the single-strand annealing pathway of double-strand break repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 142, 693–704.
- Jae, Y.L., Chang, J., Joseph, N., Ghirlando, R., Rao, D.N., and Yang, W.** (2005). MutH complexed with hemi- and unmethylated DNAs: Coupling base recognition and DNA cleavage. *Molecular Cell* 20, 155–166.
- Jager, M., Blokzijl, F., Kuijk, E., Bertl, J., Vougioukalaki, M., Janssen, R., Besselink, N., Boymans, S., de Ligt, J., Pedersen, J.S., et al.** (2019). Deficiency of nucleotide excision repair is associated with mutational signature observed in cancer. *Genome Research* 29, 1067–1077.
- Janicka, S., Kühn, K., le Ret, M., Bonnard, G., Imbault, P., Augustyniak, H., and Gualberto, J.M.** (2012). A RAD52-like single-stranded DNA binding protein affects mitochondrial DNA repair by recombination. *Plant Journal* 72, 423–435.

- Janska, H., Sarria, R., Woloszynska, M., Arrieta-Montiel, M., and Mackenzie, S.A.** (1998). Stoichiometric shifts in the common bean mitochondrial genome leading to male sterility and spontaneous reversion to fertility. *Plant Cell* 10, 1163–1180.
- Jarvis, P., and Soll, J.** (2001). Toc, Tic, and chloroplast protein import. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1541, 64–79.
- Jean, M., Pelletier, J., Hilpert, M., Belzile, F., and Kunze, R.** (1999). Isolation and characterization of AtMLH1, a MutL homologue from *Arabidopsis thaliana*. *Molecular and General Genetics* 262, 633–642.
- Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A., and Bevan, M.W.** (1987). GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO Journal* 6, 3901–3907.
- Jeong, S.Y., and Seol, D.W.** (2008). The role of mitochondria in apoptosis. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 41, 11–22.
- Ju, Y.S. eok, Alexandrov, L.B., Gerstung, M., Martincorena, I., Nik-Zainal, S., Ramakrishna, M., Davies, H.R., Papaemmanuil, E., Gundem, G., Shlien, A., et al.** (2014). Origins and functional consequences of somatic mitochondrial DNA mutations in human cancer. *ELife* 3.
- Kaina, B.** (2003). DNA damage-triggered apoptosis: Critical role of DNA repair, double-strand breaks, cell proliferation and signaling. In *Biochemical Pharmacology, (Biochem Pharmacol)*, pp. 1547–1554.
- Kaplan, D.L., and O'Donnell, M.** (2002). DnaB drives DNA branch migration and dislodges proteins while encircling two DNA strands. *Molecular Cell* 10, 647–657.
- Karabulut, A.C., Cirz, R.T., Taylor, A.F., and Smith, G.R.** (2020). Small-molecule sensitization of RecBCD helicase-nuclease to a Chi hotspot-activated state. *Nucleic Acids Research* 48, 7973–7980.
- Karnkowska, A., Vacek, V., Zubáčová, Z., Treitli, S.C., Petrželková, R., Eme, L., Novák, L., Žárský, V., Barlow, L.D., Herman, E.K., et al.** (2016). A eukaryote without a mitochondrial organelle. *Current Biology* 26, 1274–1284.
- Katahira, J.** (2012). mRNA export and the TREX complex. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms* 1819, 507–513.
- Katarzyna Banaś, A., Hermanowicz, P., Sztatelman, O., Łabuz, J., Aggarwal, C., Zgłobicki, P., Jagiełło-Flasińska, D., and Strzałka, W.** (2018). 6,4-PP Photolyase Encoded by AtUVR3 is Localized in Nuclei, Chloroplasts and Mitochondria and its Expression is Down-Regulated by Light in a Photosynthesis-Dependent Manner. *Plant and Cell Physiology* 59, 44–57.
- Kellner, V., and Luke, B.** (2020). Molecular and physiological consequences of faulty eukaryotic ribonucleotide excision repair. *The EMBO Journal* 39.
- Kennedy, S.R., Schmitt, M.W., Fox, E.J., Kohn, B.F., Salk, J.J., Ahn, E.H., Prindle, M.J., Kuong, K.J., Shen, J.C., Risques, R.A., et al.** (2014). Detecting ultralow-frequency mutations by Duplex Sequencing. *Nature Protocols* 9, 2586–2606.
- Kerfeld, C.A., Sawaya, M.R., Tanaka, S., Nguyen, C. v., Phillips, M., Beeby, M., and Yeates, T.O.** (2005). Microbiology: Protein structures forming the shell of primitive bacterial organelles. *Science* 309, 936–938.
- Khalid IQBAL,** (2017). Approches biotechnologiques de l'expression et de la diversité du génome mitochondrial des plantes.

- Khorobrykh, S., Havurinne, V., Mattila, H., and Tyystjärvi, E.** (2020). Oxygen and ROS in photosynthesis. *Plants* 9.
- Kim, N., Huang, S.Y.N., Williams, J.S., Li, Y.C., Clark, A.B., Cho, J.E., Kunkel, T.A., Pommier, Y., and Jinks-Robertson, S.** (2011). Mutagenic processing of ribonucleotides in DNA by yeast topoisomerase I. *Science* 332, 1561–1564.
- Kim, Y., Eom, S.H., Wang, J., Lee, D.S., Suh, S.W., and Steitz, T.A.** (1995). Crystal structure of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Nature* 376, 612–616.
- Kimura, S., and Sakaguchi, K.** (2006). DNA repair in plants. *Chemical Reviews* 106, 753–766.
- Kimura, S., Uchiyama, Y., Kasai, N., Namekawa, S., Saotome, A., Ueda, T., Ando, T., Ishibashi, T., Oshige, M., Furukawa, T., et al.** (2002). A novel DNA polymerase homologous to *Escherichia coli* DNA polymerase I from a higher plant, rice (*Oryza sativa* L.). *Nucleic Acids Research* 30, 1585–1592.
- Klein, M., Eckert-Ossenkopp, U., Schmiedeberg, I., Brandt, P., Unseld, M., Brennicke, A., and Schuster, W.** (1994). Physical mapping of the mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana* by cosmid and YAC clones. *The Plant Journal* 6, 447–455.
- Kleinboelting, N., Huep, G., Klotgen, A., Viehoveer, P., and Weisshaar, B.** (2012). GABI-Kat SimpleSearch: New features of the *Arabidopsis thaliana* T-DNA mutant database. *Nucleic Acids Research* 40.
- Kleine, T., and Leister, D.** (2016). Retrograde signaling: Organelles go networking. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1857, 1313–1325.
- Kleine, T., Lockhart, P., and Batschauer, A.** (2003). An *Arabidopsis* protein closely related to *Synechocystis* cryptochrome is targeted to organelles. *Plant Journal* 35, 93–103.
- Klepikova, A. v., Kasianov, A.S., Gerasimov, E.S., Logacheva, M.D., and Penin, A.A.** (2016). A high resolution map of the *Arabidopsis thaliana* developmental transcriptome based on RNA-seq profiling. *Plant Journal* 88, 1058–1070.
- Kobayashi, Y., Misumi, O., Odahara, M., Ishibashi, K., Hirono, M., Hidaka, K., Endo, M., Sugiyama, H., Iwasaki, H., Kuroiwa, T., et al.** (2017). Holliday junction resolvases mediate chloroplast nucleoid segregation. *Science* 356, 631–634.
- Kochiwa, H., Tomita, M., and Kanai, A.** (2007). Evolution of ribonuclease H genes in prokaryotes to avoid inheritance of redundant genes. *BMC Evolutionary Biology* 7, 128.
- Kockler, Z.W., Osia, B., Lee, R., Musmaker, K., and Malkova, A.** (2021). Repair of DNA Breaks by Break-Induced Replication. *Annual Review of Biochemistry* 90.
- Kogoma, T., Hong, X., Cadwell, G.W., Barnard, K.G., and Asai, T.** (1993). Requirement of homologous recombination functions for viability of the *Escherichia coli* cell that lacks RNase HI and exonuclease V activities. *Biochimie* 75, 89–99.
- Kolodner, R., and Tewari, K.K.** (1975). Presence of Displacement Loops in the Covalently Closed Circular Chloroplast Deoxyribonucleic Acid from Higher Plants*.
- Kolodner, R.** (1996). Biochemistry and genetics of eukaryotic mismatch repair. *Genes and Development* 10, 1433–1442.

- Kramara J, Osia B, and Malkova A** (2018). Break Induced Replication: the where, the why, and the how. *HHS Public Access. Trends Genet* 34, 518–531.
- Krokan, H.E., and Bjørås, M.** (2013). Base excision repair. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5, 1–22.
- Kubo, T., and Newton, K.J.** (2008). Angiosperm mitochondrial genomes and mutations. *Mitochondrion* 8, 5–14.
- Kucej, M., and Butow, R.A.** (2007). Evolutionary tinkering with mitochondrial nucleoids. *Trends in Cell Biology* 17, 586–592.
- Kuciński, J., Chamera, S., Kmera, A., Rowley, M.J., Fujii, S., Khurana, P., Nowotny, M., and Wierzbicki, A.T.** (2020). Evolutionary History and Activity of RNase H1-Like Proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* 61, 1107–1119.
- Kühn, K., and Gualberto, J.M.** (2012). Recombination in the Stability, Repair and Evolution of the Mitochondrial Genome. In *Advances in Botanical Research*, (Academic Press Inc.), pp. 215–252.
- Kulczyk, A.W., and Richardson, C.C.** (2016). The Replication System of Bacteriophage T7. In *Enzymes*, (Academic Press), pp. 89–136.
- Kunnimalaiyaan, M., and Nielsen, B.L.** (1997). Fine mapping of replication origins (oriA and oriB) in *Nicotiana tabacum* chloroplast DNA. *Nucleic Acids Research* 25, 3681–3686.
- Kunz, B.A., Straffon, A.F.L., and Vonarx, E.J.** (2000). DNA damage-induced mutation: Tolerance via translesion synthesis. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 451, 169–185.
- Kunz, B.A., Anderson, H.J., Osmond, M.J., and Vonarx, E.J.** (2005). Components of nucleotide excision repair and DNA damage tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 45, 115–127.
- Kuzminov, A., and Stahl, F.W.** (1999). Double-strand end repair via the RecBC pathway in *Escherichia coli* primes DNA replication. *Genes and Development* 13, 345–356.
- Landry, L.G., Stapleton, A.E., Lim, J., Hoffman, P., Hays, J.B., Walbot, V., and Last, R.L.** (1997). An *Arabidopsis* photolyase mutant is hypersensitive to ultraviolet-B radiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 328–332.
- Langle-Rouault, F., Maenhaut-Michel, G., and Radman', M.** (1987). GATC sequences, DNA nicks and the MutII function in *Escherichia coli* mismatch repair.
- Larochelle, M., Lemay, J.F., and Bachand, F.** (2012). The THO complex cooperates with the nuclear RNA surveillance machinery to control small nucleolar RNA expression. *Nucleic Acids Research* 40, 10240–10253.
- Laureti, L., Lee, L., Philippin, G., and Pages, V.** (2017). A non-catalytic role of RecBCD in homology directed gap repair and translesion synthesis. *Nucleic Acids Research* 45, 5877–5886.
- Leach, J.K., van Tuyle, G., Lin, P.S., Schmidt-Ullrich, R., and Mikkelsen, R.B.** (2001). Ionizing radiation-induced, mitochondria-dependent generation of reactive oxygen/nitrogen. *Cancer Research* 61, 3894–3901.

- LeBel, M.** (1988). Ciprofloxacin: Chemistry, Mechanism of Action, Resistance, Antimicrobial Spectrum, Pharmacokinetics, Clinical Trials, and Adverse Reactions. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy* 8, 3–30.
- Lee, H., Popodi, E., Tang, H., and Foster, P.L.** (2012). Rate and molecular spectrum of spontaneous mutations in the bacterium *Escherichia coli* as determined by whole-genome sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109.
- Lee, J., Chastain, P.D., Kusakabe, T., Griffith, J.D., and Richardson, C.C.** (1998). Coordinated leading and lagging strand DNA synthesis on a minicircular template. *Molecular Cell* 1, 1001–1010.
- Lee, J., Boo, J.H., and Ryu, H.** (2009). The failure of mitochondria leads to neurodegeneration: Do mitochondria need a jump start? *Advanced Drug Delivery Reviews* 61, 1316–1323.
- Léon-Avila, G., and Tovar, J.** (2004). Mitosomes of *Entamoeba histolytica* are abundant mitochondrion-related remnant organelles that lack a detectable organellar genome. *Microbiology* 150, 1245–1250.
- Li, C.L., Golebiowski, F.M., Onishi, Y., Samara, N.L., Sugasawa, K., and Yang, W.** (2015). Tripartite DNA Lesion Recognition and Verification by XPC, TFIIH, and XPA in Nucleotide Excision Repair. *Molecular Cell* 59, 1025–1034.
- Li, Z., Wakao, S., Fischer, B.B., and Niyogi, K.K.** (2009). Sensing and responding to excess light. *Annual Review of Plant Biology* 60, 239–260.
- Lin, J.S., and Lai, E.M.** (2017). Protein–Protein Interactions: Yeast Two-Hybrid System. In *Methods in Molecular Biology*, (Humana Press Inc.), pp. 177–187.
- Lindwiark, D.G., and Muller, Z.** (1973). Hydrogenosome, a Cytoplasmic Organelle of the Anaerobic Flagellate *Trichomonas foetus*, and Its Role in Pyruvate Metabolism* J.
- Lippert, M.J., Kimb, N., Cho, J.E., Larson, R.P., Schoenly, N.E., O’Shea, S.H., and Jinks-Robertson, S.** (2011). Role for topoisomerase 1 in transcription-associated mutagenesis in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 698–703.
- Little, M.P., de Vathaire, F., Shamsaldin, A., Oberlin, O., Campbell, S., Grimaud, E., Chavaudra, J., Haylock, R.G.E., and Muirhead, C.R.** (1998). Risks of brain tumour following treatment for cancer in childhood: Modification by genetic factors, radiotherapy and chemotherapy. *International Journal of Cancer* 78, 269–275.
- Lohman, T.M., and Fazio, N.T.** (2018). How Does a Helicase Unwind DNA? Insights from RecBCD Helicase. *BioEssays* 40, e1800009.
- Lovett, S.T.** (2011). The DNA Exonucleases of *Escherichia coli*. *EcoSal Plus* 4.
- Lyamichev, V., Brow, M.A.D., and Dahlberg, J.E.** (1993). Structure-specific endonucleolytic cleavage of nucleic acids by eubacterial DNA polymerases. *Science* 260, 778–783.
- Ma, J.-L., Kim, E.M., Haber, J.E., and Lee, S.E.** (2003). Yeast Mre11 and Rad1 Proteins Define a Ku-Independent Mechanism To Repair Double-Strand Breaks Lacking Overlapping End Sequences. *Molecular and Cellular Biology* 23, 8820–8828.
- Mackenzie, S., and McIntosh, L.** (1999). Higher plant mitochondria. *Plant Cell* 11, 571–585.

- Maduike, N.Z., Tehranchi, A.K., Wang, J.D., and Kreuzer, K.N.** (2014). Replication of the *Escherichia coli* chromosome in RNase HI-deficient cells: Multiple initiation regions and fork dynamics. *Molecular Microbiology* *91*, 39–56.
- Magnani, E., Bartling, L., and Hake, S.** (2006). From Gateway to MultiSite Gateway in one recombination event. *BMC Molecular Biology* *7*, 46.
- Majeran, W., Friso, G., Asakura, Y., Qu, X., Huang, M., Ponnala, L., Watkins, K.P., Barkan, A., and van Wijk, K.J.** (2012). Nucleoid-enriched proteomes in developing plastids and chloroplasts from maize leaves: A new conceptual framework for nucleoid functions. *Plant Physiology* *158*, 156–189.
- Makiuchi, T., and Nozaki, T.** (2014). Highly divergent mitochondrion-related organelles in anaerobic parasitic protozoa. *Biochimie* *100*, 3–17.
- Mansilla, N., Racca, S., Gras, D.E., Gonzalez, D.H., and Welchen, E.** (2018). The complexity of mitochondrial complex iv: An update of cytochrome c oxidase biogenesis in plants. *International Journal of Molecular Sciences* *19*.
- Manzo, S.G., Hartono, S.R., Sanz, L.A., Marinello, J., de Biasi, S., Cossarizza, A., Capranico, G., and Chedin, F.** (2018). DNA Topoisomerase I differentially modulates R-loops across the human genome. *Genome Biology* *19*, 1–18.
- Mao, K., Breen, P., and Ruvkun, G.** (2020). Mitochondrial dysfunction induces RNA interference in *C. elegans* through a pathway homologous to the mammalian RIG-I antiviral response. *PLoS Biology* *18*.
- Maréchal, A., and Brisson, N.** (2010). Recombination and the maintenance of plant organelle genome stability. *New Phytologist* *186*, 299–317.
- Maréchal, A., Parent, J.S., Véronneau-Lafortune, F., Joyeux, A., Lang, B.F., and Brisson, N.** (2009). Whirly proteins maintain plastid genome stability in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *106*, 14693–14698.
- Marienfeld, J.R., and Newton, K.J.** (1994). The maize NCS2 abnormal growth mutant has a chimeric nad4-nad7 mitochondrial gene and is associated with reduced complex I function. *Genetics* *138*, 855–863.
- Marienfeld, J., Unseld, M., and Brennicke, A.** (1999). The mitochondrial genome of *Arabidopsis* is composed of both native and immigrant information. *Trends in Plant Science* *4*, 495–502.
- Marizcurrena, J.J., Acosta, S., Canclini, L., Hernández, P., Vallés, D., Lamparter, T., and Castro-Sowinski, S.** (2020). A natural occurring bifunctional CPD/(6-4)-photolyase from the Antarctic bacterium *Sphingomonas* sp. UV9. *Applied Microbiology and Biotechnology* *104*, 7037–7050.
- Marsischky, G.T., Filosi, N., Kane, M.F., and Kolodner, R.** (1996). Redundancy of *Saccharomyces cerevisiae* MSH3 and MSH6 in MSH2-dependent mismatch repair. *Genes and Development* *10*, 407–420.
- Mawer, J.S.P., and Leach, D.R.F.** (2014). Branch Migration Prevents DNA Loss during Double-Strand Break Repair. *PLoS Genetics* *10*.
- McFadden, G.I.** (2001). Primary and secondary endosymbiosis and the origin of plastids. *Journal of Phycology* *37*, 951–959.
- McVey, M., and Lee, S.E.** (2008). MMEJ repair of double-strand breaks (director's cut): deleted sequences and alternative endings. *Trends in Genetics* *24*, 529–538.

- Mei Kwei, J.S., Kuraoka, I., Horibata, K., Ubukata, M., Kobatake, E., Iwai, S., Handa, H., and Tanaka, K.** (2004). Blockage of RNA polymerase II at a cyclobutane pyrimidine dimer and 6-4 photoproduct. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 320, 1133–1138.
- Melonek, J., Matros, A., Trösch, M., Mock, H.P., and Krupinska, K.** (2012). The core of chloroplast nucleoids contains architectural SWIB domain proteins. *Plant Cell* 24, 3060–3073.
- Melonek, J., Oetke, S., and Krupinska, K.** (2016). Multifunctionality of plastid nucleoids as revealed by proteome analyses. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* 1864, 1016–1038.
- Mendelman, L. v., Beauchamp, B.B., and Richardson, C.C.** (1994). Requirement for a zinc motif for template recognition by the bacteriophage T7 primase. *EMBO Journal* 13, 3909–3916.
- Meselson, M., and Stahl, F.W.** (1958). The replication of DNA in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 44, 671–682.
- Messer, W.** (2002). The bacterial replication initiator DnaA. DnaA and oriC , the bacterial mode to initiate DNA replication . *FEMS Microbiology Reviews* 26, 355–374.
- Miller, C.N., Jossé, L., and Tsaousis, A.D.** (2018). Localization of Fe-S Biosynthesis Machinery in *Cryptosporidium parvum* Mitosome. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 65, 913–922.
- Miller-Messmer, M., Kuhn, K., Bichara, M., le Ret, M., Imbault, P., and Gualberto, J.M.** (2012). RecA-dependent DNA repair results in increased heteroplasmy of the arabidopsis mitochondrial genome. *Plant Physiology* 159, 211–226.
- Mischo, H.E., Gómez-González, B., Grzechnik, P., Rondón, A.G., Wei, W., Steinmetz, L., Aguilera, A., and Proudfoot, N.J.** (2011). Yeast Sen1 helicase protects the genome from transcription-associated instability. *Molecular Cell* 41, 21–32.
- Mitchell, P.** (1975). The protonmotive Q cycle: A general formulation. *FEBS Letters* 59, 137–139.
- Mitsunobu, H., Zhu, B., Lee, S.J., Tabor, S., and Richardson, C.C.** (2014a). Flap endonuclease activity of gene 6 exonuclease of bacteriophage T7. *Journal of Biological Chemistry* 289, 5860–5875.
- Mitsunobu, H., Zhu, B., Lee, S.-J., Tabor, S., and Richardson, C.C.** (2014b). Flap endonuclease of bacteriophage T7. *Bacteriophage* 4, e28507.
- Møller, I.M., Jensen, P.E., and Hansson, A.** (2007). Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annual Review of Plant Biology* 58, 459–481.
- Moolenaar, G.F., Franken, K.L.M.C., van de Putte, P., and Goosen, N.** (1997). Function of the homologous regions of the *Escherichia coli* DNA excision repair proteins UvrB and UvrC in stabilization of the UvrBC-DNA complex and in 3 X-incision.
- Moolenaar, G.F., Uiterkamp, R.S., Zwijnenburg, D.A., and Goosen, N.** (1998). The C-terminal region of the *Escherichia coli* UvrC protein, which is homologous to the C-terminal region of the human ERCC1 protein, is involved in DNA binding and 5'-incision. *Nucleic Acids Research* 26, 462–468.
- Mori, Y., Kimura, S., Saotome, A., Kasai, N., Sakaguchi, N., Uchiyama, Y., Ishibashi, T., Yamamoto, T., Chiku, H., and Sakaguchi, K.** (2005). Plastid DNA polymerases from higher plants, *Arabidopsis thaliana*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 334, 43–50.

- Morimatsu, K., and Kowalczykowski, S.C.** (2014). RecQ helicase and RecJ nuclease provide complementary functions to resect DNA for homologous recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *111*, E5133–E5142.
- Morley, S.A., and Nielsen, B.L.** (2017). Plant mitochondrial DNA. *Frontiers in Bioscience - Landmark* *22*, 1023–1132.
- Morley, S.A., Peralta-Castro, A., Briebe, L.G., Miller, J., Ong, K.L., Ridge, P.G., Oliphant, A., Aldous, S., and Nielsen, B.L.** (2019). Arabidopsis thaliana organelles mimic the T7 phage DNA replisome with specific interactions between Twinkle protein and DNA polymerases Pol1A and Pol1B. *BMC Plant Biology* *19*.
- Muller, M.** (1993). The hydrogenosome. *Journal of General Microbiology* *139*, 2879–2889.
- Müller, M., and Carell, T.** (2009). Structural biology of DNA photolyases and cryptochromes. *Current Opinion in Structural Biology* *19*, 277–285.
- Mullins, E.A., Rodriguez, A.A., Bradley, N.P., and Eichman, B.F.** (2019). Emerging Roles of DNA Glycosylases and the Base Excision Repair Pathway. *Trends in Biochemical Sciences* *44*, 765–781.
- Murphy, M.P.** (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J* *417*, 1–13.
- Nagata, Y., Mashimo, K., Kawata, M., and Yamamoto, K.** (2002). The roles of klenow processing and flap processing activities of DNA polymerase I in chromosome instability in Escherichia coli k12 strains. *Genetics* *160*, 13–23.
- Nakagawa, M., Takahashi, S., Narumi, I., and Sakamoto, A.N.** (2011a). Role of AtPoZ AtRev1 and AtPolH in γ ray-induced mutagenesis. *Plant Signaling and Behavior* *6*, 728–731.
- Nakagawa, M., Takahashi, S., Tanaka, A., Narumi, I., and Sakamoto, A.N.** (2011b). Role of AtPol ζ , AtRev1, and AtPol η in UV light-induced mutagenesis in Arabidopsis. *Plant Physiology* *155*, 414–420.
- Nassif, N., Penney, J., Pal, S., Engels, W.R., and Gloor, G.B.** (1994). Efficient copying of nonhomologous sequences from ectopic sites via P-element-induced gap repair. *Molecular and Cellular Biology* *14*, 1613–1625.
- Ne Gaillard, H., Herrera-Moyano, E., and Aguilera, A.A.** (2013). Transcription-Associated Genome Instability.
- Nick McElhinny, S.A., Watts, B.E., Kumar, D., Watt, D.L., Lundström, E.B., Burgers, P.M.J., Johansson, E., Chabes, A., and Kunkel, T.A.** (2010). Abundant ribonucleotide incorporation into DNA by yeast replicative polymerases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *107*, 4949–4954.
- Nishizawa-Yokoi, A., Nonaka, S., Saika, H., Kwon, Y.I., Osakabe, K., and Toki, S.** (2012). Suppression of Ku70/80 or Lig4 leads to decreased stable transformation and enhanced homologous recombination in rice. *New Phytologist* *196*, 1048–1059.
- Noll, D.M., McGregor Mason, T., and Miller, P.S.** (2006). Formation and repair of interstrand cross-links in DNA. *Chemical Reviews* *106*, 277–301.
- Odell, J.T., Nagy, F., and Chua, N.H.** (1985). Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* *313*, 810–812.

- Ohnishi, G., Daigaku, Y., Nagata, Y., Ihara, M., and Yamamoto, K.** (2004). *Saccharomyces cerevisiae* RAD27 complements its *Escherichia coli* homolog in damage repair but not mutation avoidance. *Genes and Genetic Systems* 79, 183–187.
- Okazaki, R., Arisawa, M., and Sugino, A.** (1971). Slow joining of newly replicated DNA chains in DNA polymerase I-deficient *Escherichia coli* mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 68, 2954–2957.
- Ono, Y., Sakai, A., Takechi, K., Takio, S., Takusagawa, M., and Takano, H.** (2007). NtPoll-like1 and NtPoll-like2, bacterial DNA polymerase I homologs isolated from BY-2 cultured tobacco cells, encode DNA polymerases engaged in DNA replication in both plastids and mitochondria. *Plant and Cell Physiology* 48, 1679–1692.
- O'Rourke, B.** (2007). Mitochondrial ion channels. *Annual Review of Physiology* 69, 19–49.
- Orren, D.K., Selby, C.P., Hearst, J.E., and Sancar, A.** (1992). Post-incision steps of nucleotide excision repair in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* 267, 780–788.
- Owusu-Ansah, E., Yavari, A., Mandal, S., and Banerjee, U.** (2008). Distinct mitochondrial retrograde signals control the G1-S cell cycle checkpoint. *Nature Genetics* 40, 356–361.
- Pagès, V., and Fuchs, R.P.P.** (2002). How DNA lesions are turned into mutations within cells? *Oncogene* 21, 8957–8966.
- Palmer, J.D.** (1983). Chloroplast DNA exists in two orientations. *Nature* 301, 92–93.
- Panja, S., Saha, S., Jana, B., and Basu, T.** (2006). Role of membrane potential on artificial transformation of *E. coli* with plasmid DNA. *Journal of Biotechnology* 127, 14–20.
- Parent, J.S., Lepage, E., and Brisson, N.** (2011). Divergent roles for the two polI-like organelle DNA polymerases of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 156, 254–262.
- Pascucci, B., Versteegh, A., van Hoffen, A., van Zeeland, A.A., Mullenders, L.H.F., and Dogliotti, E.** (1997). DNA repair of UV photoproducts and mutagenesis in human mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Biology* 273, 417–427.
- Pavri, R.** (2017). R loops in the regulation of antibody gene diversification. *Genes* 8, 2–9.
- Paz-Elizur, T., Takeshita, M., Goodman, M., O'Donnell, M., and Livneh, Z.** (1996). Mechanism of translesion DNA synthesis by DNA polymerase II. Comparison to DNA polymerases I and III core. *Journal of Biological Chemistry* 271, 24662–24669.
- Peralta-Castro, A., Baruch-Torres, N., and Briebe, L.G.** (2017). Plant organellar DNA primase-helicase synthesizes RNA primers for organellar DNA polymerases using a unique recognition sequence. *Nucleic Acids Research* 45, 10764–10774.
- Pesaresi, P., Schneider, A., Kleine, T., and Leister, D.** (2007). Interorganellar communication. *Current Opinion in Plant Biology* 10, 600–606.
- Petersen, J.L., and Small, G.D.** (2001). A gene required for the novel activation of a class II DNA photolyase in *Chlamydomonas*. *Nucleic Acids Research* 29, 4472–4481.
- Pfalz, J., and Pfannschmidt, T.** (2013). Essential nucleoid proteins in early chloroplast development. *Trends in Plant Science* 18, 186–194.

- Pfanner, N., and Meijer, M.** (1997). Mitochondrial biogenesis: The Tom and Tim machine. *Current Biology* 7.
- Pogson, B.J., Ganguly, D., and Albrecht-Borth, V.** (2015). Insights into chloroplast biogenesis and development. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1847, 1017–1024.
- Poole, A.M., and Gribaldo, S.** (2014). Eukaryotic origins: How and when was the mitochondrion acquired? *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 6.
- Pospíšil, P.** (2016). Production of reactive oxygen species by photosystem II as a response to light and temperature stress. *Frontiers in Plant Science* 7.
- Posse, V., Al-Behadili, A., Uhler, J.P., Clausen, A.R., Reyes, A., Zeviani, M., Falkenberg, M., and Gustafsson, C.M.** (2019). RNase H1 directs origin-specific initiation of DNA replication in human mitochondria. *PLoS Genetics* 15.
- Prakash, A., and Doublé, S.** (2015). Base Excision Repair in the Mitochondria. *Journal of Cellular Biochemistry* 116, 1490–1499.
- Preuten, T., Cincu, E., Fuchs, J., Zoschke, R., Liere, K., and Börner, T.** (2010). Fewer genes than organelles: Extremely low and variable gene copy numbers in mitochondria of somatic plant cells. *Plant Journal* 64, 948–959.
- Pring, D.R., Tang, H. v., Howad, W., and Kempken, F.** (1999). A unique two-gene gametophytic male sterility system in sorghum involving a possible role of RNA editing in fertility restoration. In *Journal of Heredity*, (J Hered), pp. 386–393.
- Quinlan, C.L., Orr, A.L., Perevoshchikova, I. v., Treberg, J.R., Ackrell, B.A., and Brand, M.D.** (2012). Mitochondrial complex II can generate reactive oxygen species at high rates in both the forward and reverse reactions. *Journal of Biological Chemistry* 287, 27255–27264.
- Quirós, P.M., Mottis, A., and Auwerx, J.** (2016). Mitonuclear communication in homeostasis and stress. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 17, 213–226.
- Ramírez-Santos, J., García-Mata, V., Poggio, S., Camarena, L., and Gómez-Eichelmann, M.C.** (2009). Role of single-strand DNA 3-5 exonuclease ExoI and nuclease SbcCD in stationary-phase mutation in *Escherichia coli* K-12. *Archives of Microbiology* 191, 185–190.
- Randall, J.R., Nye, T.M., Wozniak, K.J., and Simmons, L.A.** (2019). RNase HIII is important for Okazaki fragment processing in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 201.
- Rasmusson, A.G., Fernie, A.R., and van Dongen, J.T.** (2009). Alternative oxidase: A defence against metabolic fluctuations? *Physiologia Plantarum* 137, 371–382.
- Rébeillé, F., Alban, C., Bourguignon, J., Ravanel, S., and Douce, R.** (2007). The role of plant mitochondria in the biosynthesis of coenzymes. *Photosynthesis Research* 92, 149–162.
- Recht, M.I., Douthwaite, S., and Puglisi, J.D.** (1999). Basis for prokaryotic specificity of action of aminoglycoside antibiotics. *EMBO Journal* 18, 3133–3138.
- Reece-Hoyes, J.S., and Walhout, A.J.M.** (2018). Gateway recombinational cloning. *Cold Spring Harbor Protocols* 2018, 1–6.

- Reenan, R.A.G., and Kolodner, R.D.** (1992). Characterization of insertion mutations in the *Saccharomyces cerevisiae* MSH1 and MSH2 genes: Evidence for separate mitochondrial and nuclear functions. *Genetics* 132, 975–985.
- Ret, M. le, Belcher, S., Graindorge, S., Wallet, C., Koechler, S., Erhardt, M., Williams-Carrier, R., Barkan, A., and Gualberto, J.M.** (2018). Efficient replication of the plastid genome requires an organellar thymidine kinase. *Plant Physiology* 178, 1643–1656.
- Rether, B., Pfohl-Leszkowicz, A., Guillemaut, P., and Keith, G.** (1990). Benzo(a)pyrene induces nuclear-DNA adducts in plant cell suspension culture. Detection by [32P] postlabelling. *FEBS Letters* 263, 172–174.
- Richard, P., and Manley, J.L.** (2017). R Loops and Links to Human Disease. *Journal of Molecular Biology* 429, 3168–3180.
- Rill, N., Mukhortava, A., Lorenz, S., and Tessmer, I.** (2020). Alkyltransferase-like protein clusters scan DNA rapidly over long distances and recruit NER to alkyl-DNA lesions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 117, 9318–9328.
- del Río, L.A., and López-Huertas, E.** (2016). ROS generation in peroxisomes and its role in cell signaling. *Plant and Cell Physiology* 57, 1364–1376.
- Robins, P., Pappin, D.J.C., Wood, R.D., and Lindahl, T.** (1994). Structural and functional homology between mammalian DNase IV and the 5'-nuclease domain of *Escherichia coli* DNA polymerase I. *Journal of Biological Chemistry* 269, 28535–28538.
- Roger, A.J., Muñoz-Gómez, S.A., and Kamikawa, R.** (2017). The Origin and Diversification of Mitochondria. *Current Biology* 27, R1177–R1192.
- Ross-Macdonald, P., and Roeder, G.S.** (1994). Mutation of a meiosis-specific MutS homolog decreases crossing over but not mismatch correction. *Cell* 79, 1069–1080.
- Roy, D., and Lieber, M.R.** (2009). G Clustering Is Important for the Initiation of Transcription-Induced R-Loops In Vitro, whereas High G Density without Clustering Is Sufficient Thereafter. *Molecular and Cellular Biology* 29, 3124–3133.
- Roy, D., Zhang, Z., Lu, Z., Hsieh, C.-L., and Lieber, M.R.** (2010). Competition between the RNA Transcript and the Nontemplate DNA Strand during R-Loop Formation In Vitro: a Nick Can Serve as a Strong R-Loop Initiation Site. *Molecular and Cellular Biology* 30, 146–159.
- Roy, R., Kozlov, A.G., Lohman, T.M., and Ha, T.** (2009). SSB protein diffusion on single-stranded DNA stimulates RecA filament formation. *Nature* 461, 1092–1097.
- Sadali, N.M., Sowden, R.G., Ling, Q., and Jarvis, R.P.** (2019). Differentiation of chromoplasts and other plastids in plants. *Plant Cell Reports* 38, 803–818.
- Sagan, L.** (1967). On the Origin of Mitosing Cdl's.
- Saito, H., Tabor, S., Tamanoi, F., and Richardson, C.C.** (1980). Nucleotide sequence of the primary origin of bacteriophage T7 DNA replication: Relationship to adjacent genes and regulatory elements. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77, 3917–3921.
- Salinas, T., Duchêne, A.M., Delage, L., Nilsson, S., Glaser, E., Zaepfel, M., and Maréchal-Drouard, L.** (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*, 18362–18367.

Salmon, T.B., Evert, B.A., Song, B., and Doetsch, P.W. (2004). Biological consequences of oxidative stress-induced DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research* *32*, 3712–3723.

Samach, A., Melamed-Bessudo, C., Avivi-Ragolski, N., Pietrokovski, S., and Levy, A.A. (2011). Identification of plant RAD52 homologs and characterization of the *Arabidopsis thaliana* RAD52-like genes. *Plant Cell* *23*, 4266–4279.

Sancar, A., and Rupert, C.S. (1978). Cloning of the *phr* gene and amplification of photolyase in *Escherichia coli*. *Gene* *4*, 295–308.

Sandalio, L.M., and Romero-Puertas, M.C. (2015). Peroxisomes sense and respond to environmental cues by regulating ROS and RNS signalling networks. *Annals of Botany* *116*, 475–485.

Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *74*, 5463–5467.

Sanz, L.A., and Chédin, F. (2019). High-resolution, strand-specific R-loop mapping via S9.6-based DNA–RNA immunoprecipitation and high-throughput sequencing. *Nature Protocols* *14*, 1734–1755.

Sanz, L.A., Hartono, S.R., Lim, Y.W., Steyaert, S., Rajpurkar, A., Ginno, P.A., Xu, X., and Chédin, F. (2016). Prevalent, Dynamic, and Conserved R-Loop Structures Associate with Specific Epigenomic Signatures in Mammals. *Molecular Cell* *63*, 167–178.

Sato, S., Nakamura, Y., Kaneko, T., Asamizu, E., and Tabata, S. (1999). Complete structure of the chloroplast genome of *Arabidopsis thaliana*. *DNA Research* *6*, 283–290.

Satoh, M., and Kuroiwa, T. (1991). Organization of multiple nucleoids and DNA molecules in mitochondria of a human cell. *Experimental Cell Research* *196*, 137–140.

Sattler, U., Frit, P., Salles, B., and Calsou, P. (2003). Long-patch DNA repair synthesis during base excision repair in mammalian cells. *EMBO Reports* *4*, 363–367.

Saxton, W.M., and Hollenbeck, P.J. (2012). The axonal transport of mitochondria. *Journal of Cell Science* *125*, 2095–2104.

Scheuermann, R., Tam, S., and Burgers, P.M.J. (1983). Identification of the ϵ -subunit of *Escherichia coli* DNA polymerase III holoenzyme as the *dnaQ* gene product: A fidelity subunit for DNA replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *80*, 7085–7089.

Schimi, S., and Puchta, H. (2016). Revolutionizing plant biology: Multiple ways of genome engineering by CRISPR/Cas. *Plant Methods* *12*.

Schlame, M. (2008). Cardiolipin synthesis for the assembly of bacterial and mitochondrial membranes. *Journal of Lipid Research* *49*, 1607–1620.

Schofield, M.J., and Hsieh, P. (2003). Dna Mismatch Repair: Molecular Mechanisms and Biological Function. *Annual Review of Microbiology* *57*, 579–608.

Schon, E.A., and Gilkerson, R.W. (2010). Functional complementation of mitochondrial DNAs: Mobilizing mitochondrial genetics against dysfunction. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* *1800*, 245–249.

- Schroeder, J.W., Randall, J.R., Hirst, W.G., O'Donnell, M.E., and Simmons, L.A.** (2017). Mutagenic cost of ribonucleotides in bacterial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *114*, 11733–11738.
- Scully, R., Panday, A., Elango, R., and Willis, N.A.** (2019). DNA double-strand break repair-pathway choice in somatic mammalian cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *20*, 698–714.
- Sekimizu, K., Bramhill, D., and Kornberg, A.** (1987). ATP activates dnaA protein in initiating replication of plasmids bearing the origin of the *E. coli* chromosome. *Cell* *50*, 259–265.
- Selby, C.P., and Sancar, A.** (1993). Molecular mechanism of transcription-repair coupling. *Science* *260*, 53–58.
- Senissar, M., Manav, M.C., and Brodersen, D.E.** (2017). Structural conservation of the PIN domain active site across all domains of life.
- Senkler, J., Senkler, M., Eubel, H., Hildebrandt, T., Lengwenus, C., Schertl, P., Schwarzländer, M., Wagner, S., Wittig, I., and Braun, H.P.** (2017). The mitochondrial complexome of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* *89*, 1079–1092.
- Serwer, P., Watson, R.H., and Son, M.** (1990). Role of gene 6 exonuclease in the replication and packaging of bacteriophage T7 DNA. *Journal of Molecular Biology* *215*, 287–299.
- Shadel, G.S., and Horvath, T.L.** (2015). Mitochondrial ROS Signaling in Organismal Homeostasis. *Cell* *163*, 560–569.
- Shamsuddin, A.M., Harris, C.C., and Hinzman, M.J.** (1987). Localization of aflatoxin B1-nucleic acid adducts in mitochondria and nuclei. *Carcinogenesis* *8*, 109–114.
- She, R.C., Chen, D., Pak, P., Armani, D.K., Schubert, A., and Armani, A.M.** (2020). Lightweight UV-C disinfection system. *Biomedical Optics Express* *11*, 4326.
- Shedge, V., Arrieta-Montiel, M., Christensen, A.C., and Mackenzie, S.A.** (2007). Plant mitochondrial recombination surveillance requires unusual RecA and MutS homologs. *Plant Cell* *19*, 1251–1264.
- Shen, J., Zeng, Y., Zhuang, X., Sun, L., Yao, X., Pimpl, P., and Jiang, L.** (2013). Organelle pH in the *Arabidopsis* endomembrane system. *Molecular Plant* *6*, 1419–1437.
- Shi, Q., Thresher, R., Sancar, A., and Griffith, J.** (1992). Electron microscopic study of (A)BC excinuclease. DNA is sharply bent in the UvrB-DNA complex. *Journal of Molecular Biology* *226*, 425–432.
- Skourti-Stathaki, K., Proudfoot, N.J., and Gromak, N.** (2011). Human Senataxin Resolves RNA/DNA Hybrids Formed at Transcriptional Pause Sites to Promote Xrn2-Dependent Termination. *Molecular Cell* *42*, 794–805.
- Sloan, D.B., Müller, K., McCauley, D.E., Taylor, D.R., and Štorchová, H.** (2012). Intraspecific variation in mitochondrial genome sequence, structure, and gene content in *Silene vulgaris*, an angiosperm with pervasive cytoplasmic male sterility. *New Phytologist* *196*, 1228–1239.
- Small, I., Suffolk, R., and Leaver, C.J.** (1989). Evolution of plant mitochondrial genomes via substoichiometric intermediates. *Cell* *58*, 69–76.

- Sommer, M.S., Daum, B., Gross, L.E., Weis, B.L.M., Mirus, O., Abram, L., Maier, U.G., Kühlbrandt, W., and Schleiff, E.** (2011). Chloroplast Omp85 proteins change orientation during evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 13841–13846.
- Sparks, J.L., and Burgers, P.M.** (2015). Error-free and mutagenic processing of topoisomerase 1-provoked damage at genomic ribonucleotides. *The EMBO Journal* 34, 1259–1269.
- Sparks, J.L., Chon, H., Cerritelli, S.M., Kunkel, T.A., Johansson, E., Crouch, R.J., and Burgers, P.M.** (2012). RNase H2-Initiated Ribonucleotide Excision Repair. *Molecular Cell* 47, 980–986.
- Speck, C., and Messer, W.** (2001). Mechanism of origin unwinding: Sequential binding of DnaA to double- and single-stranded DNA. *EMBO Journal* 20, 1469–1476.
- Spivak, G.** (2015). Nucleotide excision repair in humans. *DNA Repair* 36, 13–18.
- Springer, N.M.** (2010). Isolation of plant DNA for PCR and genotyping using organic extraction and CTAB. *Cold Spring Harbor Protocols* 5.
- Stamper, S.E., Dewey, R.E., Bland, M.M., and Levings, C.S.** (1987). Characterization of the gene *urf13-T* and an unidentified reading frame, ORF 25, in maize and tobacco mitochondria. *Current Genetics* 12, 457–463.
- Steiner, P., Buchner, O., Andosch, A., Wanner, G., Neuner, G., and Lütz-Meindl, U.** (2020). Fusion of mitochondria to 3-d networks, autophagy and increased organelle contacts are important subcellular hallmarks during cold stress in plants. *International Journal of Molecular Sciences* 21, 1–19.
- Stoppel, R., Manavski, N., Schein, A., Schuster, G., Teubner, M., Schmitz-Linneweber, C., and Meurer, J.** (2012). RHON1 is a novel ribonucleic acid-binding protein that supports RNase e function in the Arabidopsis chloroplast. *Nucleic Acids Research* 40, 8593–8606.
- Stupar, R.M., Lilly, J.W., Town, C.D., Cheng, Z., Kaul, S., Buell, C.R., and Jiang, J.** (2001). Complex mtDNA constitutes an approximate 620-kb insertion on Arabidopsis thaliana chromosome 2: Implication of potential sequencing errors caused by large-unit repeats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 5099–5103.
- Sugawara, N., Ira, G., and Haber, J.E.** (2000). DNA Length Dependence of the Single-Strand Annealing Pathway and the Role of *Saccharomyces cerevisiae* RAD59 in Double-Strand Break Repair. *Molecular and Cellular Biology* 20, 5300–5309.
- Sun, F., Huo, X., Zhai, Y., Wang, A., Xu, J., Su, D., Bartlam, M., and Rao, Z.** (2005). Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein Complex II. *Cell* 121, 1043–1057.
- SUZUKI, N., KOUSSEVITZKY, S., MITTLER, R., and MILLER, G.** (2012). ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress. *Plant, Cell & Environment* 35, 259–270.
- Takahashi, M., Teranishi, M., Ishida, H., Kawasaki, J., Takeuchi, A., Yamaya, T., Watanabe, M., Makino, A., and Hidema, J.** (2011). Cyclobutane pyrimidine dimer (CPD) photolyase repairs ultraviolet-B-induced CPDs in rice chloroplast and mitochondrial DNA. *The Plant Journal* 66, 433–442.
- Takeuchi, R., Kimura, S., Saotome, A., and Sakaguchi, K.** (2007). Biochemical properties of a plastidial DNA polymerase of rice. *Plant Molecular Biology* 64, 601–611.
- Tamanoi, F., Saito, H., and Richardson, C.C.** (1980). Physical mapping of primary and secondary origins of bacteriophage T7 DNA replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77, 2656–2660.

- Taylor, J. -S, Garrett, D.S., and Wang, M.J.** (1988). Models for the solution state structure of the (6–4) photoproduct of thymidyl-(3' → 5')-thymidine derived via a distance- and angle-constrained conformation search procedure. *Biopolymers* 27, 1571–1593.
- Tegel, H., Tourle, S., Ottosson, J., and Persson, A.** (2010). Increased levels of recombinant human proteins with the Escherichia coli strain Rosetta(DE3). *Protein Expression and Purification* 69, 159–167.
- Thomas, M., White, R.L., and Davis, R.W.** (1976). Hybridization of RNA to double stranded DNA: Formation of R loops. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 73, 2294–2298.
- Todo, T., Takemori, H., Ryo, H., Lhara, M., Matsunaga, T., Nikaido, O., Sato, K., and Nomura, T.** (1993). A new photoreactivating enzyme that specifically repairs ultraviolet light-induced (6-4) photoproducts. *Nature* 361, 371–374.
- Tovar, J., Fischer, A., and Clark, C.G.** (1999). The mitosome, a novel organelle related to mitochondria in the amitochondrial parasite *Entamoeba histolytica*. *Molecular Microbiology* 32, 1013–1021.
- Trasviña-Arenas, C.H., Baruch-Torres, N., Cordoba-Andrade, F.J., Ayala-García, V.M., García-Medel, P.L., Díaz-Quezada, C., Peralta-Castro, A., Ordaz-Ortiz, J.J., and Briebe, L.G.** (2018). Identification of a unique insertion in plant organellar DNA polymerases responsible for 5'-dRP lyase and strand-displacement activities: Implications for Base Excision Repair. *DNA Repair* 65, 1–10.
- Tsutsui, H., and Higashiyama, T.** (2017). PKAMA-ITACHI vectors for highly efficient CRISPR/Cas9-mediated gene knockout in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* 58, 46–56.
- Twig, G., Elorza, A., Molina, A.J.A., Mohamed, H., Wikstrom, J.D., Walzer, G., Stiles, L., Haigh, S.E., Katz, S., Las, G., et al.** (2008). Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO Journal* 27, 433–446.
- Umez, K., and Kolodner, R.D.** (1994). Protein interactions in genetic recombination in *Escherichia coli*. Interactions involving RecO and RecR overcome the inhibition of RecA by single-stranded DNA-binding protein. *Journal of Biological Chemistry* 269, 30005–30013.
- Unsold, M., Marienfeld, J.R., Brandt, P., and Brennicke, A.** (1997). The mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana* contains 57 genes in 366,924 nucleotides. *Nature Genetics* 15, 57–61.
- Vaisman, A., McDonald, J.P., Noll, S., Huston, D., Loeb, G., Goodman, M.F., and Woodgate, R.** (2014). Investigating the mechanisms of ribonucleotide excision repair in *Escherichia coli*. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 761, 21–33.
- Vandelle, E., and Delledonne, M.** (2011). Peroxynitrite formation and function in plants. *Plant Science* 181, 534–539.
- Vincent, S.D., Mahdi, A.A., and Lloyd, R.G.** (1996). The RecG branch migration protein of *Escherichia coli* dissociates R-loops. *Journal of Molecular Biology* 264, 713–721.
- Virdi, K.S., Laurie, J.D., Xu, Y.Z., Yu, J., Shao, M.R., Sanchez, R., Kundariya, H., Wang, D., Riethoven, J.J.M., Wamboldt, Y., et al.** (2015). *Arabidopsis* MSH1 mutation alters the epigenome and produces heritable changes in plant growth. *Nature Communications* 6.

- Vitha, S., McAndrew, R.S., and Osteryoung, K.W.** (2001). FtsZ ring formation at the chloroplast division site in plants. *Journal of Cell Biology* 153, 111–119.
- Walhout, A.J.M., Temple, G.F., Brasch, M.A., Hartley, J.L., Lorson, M.A., van den Heuvel, S., and Vidal, M.** (2000). GATEWAY recombinational cloning: Application to the cloning of large numbers of open reading frames or ORFeomes. *Methods in Enzymology* 328, 575–592.
- Walker, C.L., Pomatto, L.C.D., Tripathi, D.N., and Davies, K.J.A.** (2018). Redox regulation of homeostasis and proteostasis in peroxisomes. *Physiological Reviews* 98, 89–115.
- Wall, M.K., Mitchena, L.A., and Maxwell, A.** (2004). Arabidopsis thaliana DNA gyrase is targeted to chloroplasts and mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 7821–7826.
- Wallet, C.** (2016). L'hélicase RECG1, un facteur-clé dans le maintien et la ségrégation de l'ADN mitochondrial d'Arabidopsis thaliana.
- Wallet, C., Ret, M. le, Bergdoll, M., Bichara, M., Dietrich, A., and Gualberto, J.M.** (2015). The RECG1 DNA translocase is a key factor in recombination surveillance, repair, and segregation of the mitochondrial DNA in arabidopsisopen. *Plant Cell* 27, 2907–2925.
- Wang, Z., and Wu, M.** (2015). An integrated phylogenomic approach toward pinpointing the origin of mitochondria. *Scientific Reports* 5.
- Waszczak, C., Carmody, M., and Kangasjärvi, J.** (2018). Reactive Oxygen Species in Plant Signaling. *Annual Review of Plant Biology* 69, 209–236.
- Weber-Lotfi F., Guillemaut P., Rether B. and Dietrich A.** (2010) in DNA Adducts: Formation, Detection and Mutagenesis (Alvarez E. and Cunha R., eds), pp. 61-81, Nova Science Publishers, New York, USA.
- Weber-Lotfi, F., Obrecht-Pflumio, S., Guillemaut, P., Kleinpeter, J., and Dietrich, A.** (2005). Specific plant DNA adducts as molecular biomarkers of genotoxic atmospheric environments. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 581, 55–67.
- West, S.C.** (1997). Processing of recombination intermediates by the RuvABC proteins. *Annual Review of Genetics* 31, 213–244.
- West, C.E., Waterworth, W.M., Jiang, Q., and Bray, C.M.** (2000). Arabidopsis DNA ligase IV is induced by γ -irradiation and interacts with an Arabidopsis homologue of the double strand break repair protein XRCC4. *Plant Journal* 24, 67–78.
- Whitby, M.C., Vincent, S.D., and Lloyd, R.G.** (1994). Branch migration of Holliday junctions: Identification of RecG protein as a junction specific DNA helicase. *EMBO Journal* 13, 5220–5228.
- Whitley, K.D., Jukes, C., Tregidgo, N., Karinou, E., Almada, P., Cesbron, Y., Henriques, R., Dekker, C., and Holden, S.** (2021). FtsZ treadmilling is essential for Z-ring condensation and septal constriction initiation in Bacillus subtilis cell division. *Nature Communications* 12, 2448.
- Williams, J.S., Smith, D.J., Marjavaara, L., Lujan, S.A., Chabes, A., and Kunkel, T.A.** (2013). Topoisomerase 1-Mediated Removal of Ribonucleotides from Nascent Leading-Strand DNA. *Molecular Cell* 49, 1010–1015.
- Wilson, R.J., and Williamson, D.H.** (1997). Extrachromosomal DNA in the Apicomplexa. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* : MMBR 61, 1–16.

- Wimberly, H., Shee, C., Thornton, P.C., Sivaramakrishnan, P., Rosenberg, S.M., and Hastings, P.J.** (2013). R-loops and nicks initiate DNA breakage and genome instability in non-growing *Escherichia coli*. *Nature Communications* 4.
- Winterbourn, C.C.** (1995). Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. *Toxicology Letters* 82–83, 969–974.
- Wolanski, M., Donczew, R., Zawilak-Pawlik, A., and Zakrzewska-Czerwinska, J.** (2015). *oriC*-encoded instructions for the initiation of bacterial chromosome replication. *Frontiers in Microbiology* 6, 735.
- Wu, Z., Cuthbert, J.M., Taylor, D.R., and Sloan, D.B.** (2015). The massive mitochondrial genome of the angiosperm *Silene noctiflora* is evolving by gain or loss of entire chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112, 10185–10191.
- Wu, Z., Waneka, G., Broz, A.K., King, C.R., and Sloan, D.B.** (2020). MSH1 is required for maintenance of the low mutation rates in plant mitochondrial and plastid genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 117, 16448–16455.
- Xie, P.** (2007). Model for RuvAB-mediated branch migration of Holliday junctions. *Journal of Theoretical Biology* 249, 566–573.
- Xu, Y.Z., Arrieta-Montiel, M.P., Viridi, K.S., de Paula, W.B.M., Widhalm, J.R., Basset, G.J., Davila, J.I., Elthon, T.E., Elowsky, C.G., Sato, S.J., et al.** (2011). Muts homolog1 is a nucleoid protein that alters mitochondrial and plastid properties and plant response to high light. *Plant Cell* 23, 3428–3441.
- Yang, X., Sanchez, R., Kundariya, H., Maher, T., Dopp, I., Schwegel, R., Viridi, K., Axtell, M.J., and Mackenzie, S.A.** (2020a). Segregation of an MSH1 RNAi transgene produces heritable non-genetic memory in association with methylome reprogramming. *Nature Communications* 11.
- Yang, Z., Hou, Q., Cheng, L., Xu, W., Hong, Y., Li, S., and Sun, Q.** (2017). RNase H1 cooperates with DNA gyrase to restrict R-loops and maintain genome integrity in arabidopsis chloroplasts. *Plant Cell* 29, 2478–2497.
- Yang, Z., Li, M., and Sun, Q.** (2020b). RHON1 Co-transcriptionally Resolves R-Loops for Arabidopsis Chloroplast Genome Maintenance. *Cell Reports* 30, 243-256.e5.
- Yin, Y.W., and Steitz, T.A.** (2004). The structural mechanism of translocation and helicase activity in T7 RNA polymerase. *Cell* 116, 393–404.
- Yokoyama, H., and Mizutani, R.** (2014). Structural biology of DNA (6-4) photoproducts formed by ultraviolet radiation and interactions with their binding proteins. *International Journal of Molecular Sciences* 15, 20321–20338.
- Zaegel, V., Guermann, B., le Ret, M., Andrés, C., Meyer, D., Erhardt, M., Canaday, J., Gualberto, J.M., and Imbault, P.** (2006). The plant-specific ssDNA binding protein OSB1 is involved in the stoichiometric transmission of mitochondrial DNA in Arabidopsis. *Plant Cell* 18, 3548–3563.
- Zhang, J., Xie, S., Zhu, J.K., and Gong, Z.** (2016). Requirement for flap endonuclease 1 (FEN1) to maintain genomic stability and transcriptional gene silencing in Arabidopsis. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology* 87, 629–640.
- Zheng, M., Beck, M., Müller, J., Chen, T., Wang, X., Wang, F., Wang, Q., Wang, Y., Baluška, F., Logan, D.C., et al.** (2009). Actin turnover is required for myosin-dependent mitochondrial movements in Arabidopsis root hairs. *PLoS ONE* 4.

Zhou, Z., Austin, G., Young, L., Johnson, L., and Sun, R. (2018). Mitochondrial Metabolism in Major Neurological Diseases. *Cells* 7, 229.

Zhu, B., Lee, S.J., and Richardson, C.C. (2010). Direct role for the RNA polymerase domain of T7 primase in primer delivery. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 9099–9104.

Zickermann, V., Dröse, S., Tocilescu, M.A., Zwicker, K., Kerscher, S., and Brandt, U. (2008). Challenges in elucidating structure and mechanism of proton pumping NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 40, 475–483.

Zou, Y., Walker, R., Bassett, H., Geacintov, N.E., and van Houten, B. (1997). Formation of DNA repair intermediates and incision by the ATP-dependent UvrB-UvrC endonuclease. *Journal of Biological Chemistry* 272, 4820–4827.

Coordinates on Col-0 mtDNA	Forward	Reverse
4234 4329	TCCTCCGGTCGAGTCATCTTTTC	CGGTTTCGGACAGCTCATGATG
7816 7912	CACCTTTCTTTGTTTCAGGCTC	AGGAATCGCAAGAATTGAGAAAG
12410 12515	GACCTTGAATGCGCTCTTGAGAG	AGAGGACGAAGGCTACTTTTCG
17273 17382	AACTTTATGCAATCCGCCATAC	GGGCTTGGAGTTAATCATCTTG
22005 22096	AACTAGACCCGGAAGGAGAAG	CTTCTGTATCGTCGCTTGAATG
26152 26244	TGCTCGCAGTCGTCATAGAG	GACCTTAGCAACCCGAAACGTG
29683 29774	TACTATCCAGAGGCGAAGAAC	AGGACCCCTAAAGAAAGGATCGTC
32274 32383	AGTCAGTGGGAAATCGGTAGC	AATGGGCCAGCTGCATAATCAC
34904 35000	CATTGAGGAGAGAGGAGAGAG	CGCCCATACTCTTAACTTTTCG
39428 39536	TAAGCCTGCCTGACTGTGAGAC	GGCTACCTTTGATCCGTTGAGC
43283 43378	CITGAATGGGAGTTTCTTGCTC	TAGCTTTCGCTTCTTCAGATCC
48567 48661	ATTACGTCTGCCCTCCAGGATG	AGGTGATGCGGGAACCTAAGTCC
54799 54917	CCTTGGCGGATAACTAGAAGTG	CCCGAATGTCTTTAATCGAGAG
59534 59642	GGCTCTTCCCCTTGGGTCATAGG	ACCCAGCTCAGGAACCTAAACC
63647 63760	ATTCTTGGTGGAATCATCAAC	AACAAACCAATTACCAATCCAC
68782 68892	TCACTTCGACGACGGAAGACTC	ATGACCCGGATCGAGTACACTG
73964 74053	AAGATGACAAGCGGAGTAAAGC	GGACGATAGTAGTTTGGCCCTTG
79716 79828	AGACCTCCTGAGCTGTGCAAG	TTCCGAGACTATGATGCCTGG
84857 84974	TATTCTGACTGGTTTCTCATGTG	TTGCCGTAAGTCTGAAACTATG
90211 90297	GAGCTTGACCTGCACACACTTG	TCACAGCAGCCAGACAGAAGAC
94846 94954	TTTAAGGAGTTAGCTGCATTTC	TCCAATCTTGTTGCTAATGTGC
99214 99312	CGACCTGCCCCTTCTTACTCAG	AGGTAGCTAAGCCTGCCGAATC
104322 104436	GAGATGGGGTGACTAAACCTTG	AGTTTGTACTTGCTTTGGCTTC
107511 107614	CCAAGAATAAGGATTCTAAAGG	GCTTTGAGTGCTCCTTAATAG
112496 112595	AGGCTGACAGAAGTACCGAAAC	TTCGATCACAGAATCCATTGAC
113547 113645	GTCTTTCTCGTCAGGCTCATG	TAAGCTAGAGGAGACTTGTTTG
114471 114564	AGCATAGCATAGTAGTGCAAG	CGCTACTTTGTTTATCTAAGGTC
119849 119943	GGAGTTTGCTTTACCCAACAAC	GGGCACTCTTCATTCTTCATTC
123165 123271	TGCCCTCTTAGCTGGCTTGATC	CGGAGACATCAGAGGAAGGAGC
128104 128210	CATCGTCTGATGTAGCCTTTTG	TGGAATTGATTGTGCGTGAAC
132432 132549	CGCAGGCATGTGATTGTAAGG	ACTTACTTGACCGCTAGCCAGG
137615 137698	ACAGGATTGCAACCTATGGC	GCAATTACAGTGAGACGCGAGG
142333 142437	AAGGCTCGGCGAAGTCTTGAGG	CATCTTAGCAGCAGGGCTTTCG
149136 149238	CCCTTATGAATGGATCTTGCTC	AGTTCCACCCCGCTGTTAGATAG
154724 154823	GAAAGGCTGGTAGGACGGAAG	AGGCCCTTCTGTTCCAGTGACAG
159570 159689	AACCGCTAAGAATGTGGAGAAG	CTTGATAGAGAAGCAACTG
164577 164690	TCTCGCTACCATACCAACAAG	TTGATCTTGTTACCCACGGAGC
169363 169479	ATTGGTGACCTGTTCTGATTACC	TAAACCCCTGGTGAATCTTTTGG
175463 175551	AGGATTTCTGTGCTCCTGCAGG	GAGTGGTTCTAGTCTCCCTGG
181437 181541	TACTGTAGCTCCCAAAAGCTC	TTTGTGTTGTTGCTTTGGAGTTG
186252 186347	TCCGTTTGGAGGGACAGATGAG	AGGACTTCGCCTTGACCTTCTG
190999 191099	AGGACTCTCTTCTGTCCGTTTG	CTTTCTAGATGTGCTGCGGAAG
197765 197855	ATGGCTACAAGTGGGCTACGAG	TGCGAATGAAGTCTTCCGTTG
201598 201690	AAGCCTGACACGAAGAATAAGC	CTTCTCTGACCTCTCTCCTTG
208193 208300	TCCTCTCGTGCTCTGCCATAAG	AGCCAATAACTCGAACGCGTTC
213948 214056	CGGTTCTTCTTAGTTGAGATTGG	CGTCCGTCTGCTGTAAGTAGTC
218611 218726	AGGCAGGGTAAGAAAGGGTGAC	AAGTTCTGAATCCGTTCCGTTG
223926 224015	AAATTCCACATCCTGACATTCC	TATGTTTCTTACCCACCCGAAC
231026 231115	CTGGCCCTGAACCTTTGGGTAG	TTCCCGAATGACCGTACCAAGG
237257 237348	GTTTCCGTCGCCAGTACCTGTAG	TGCTACTAAGTTGCCAATCGAC
242471 242579	AGGCGCTGTCACTCTATCTGAC	ACCCCTTCTCCTCTGCTTTGAG
245308 245427	GACATGTTCTGCCGCATACCAC	CATAGCCTTCAACCCGCAAGG
246842 246960	AAGACAGAGAGCTTGGCAGAG	GGGCTGTTTCCCTCTCTTAGAG
251558 251649	ACTTCGATTCCAAAGAAAGCAG	GATTACCATTAGGCGAAGCAG
255737 255846	GACGGTTGGCTAAAGACATGG	TGGCAATGTGCGAGATCCTAC
262023 262125	ATGGAAGACCCCTCTCCTTATC	GAATCTCGGAAACGACAAATC
265093 265190	TGATTGATCCAACACGCCAAGC	TCCTGACTAAAGCACCTCTCC
267468 267574	AGCAGCACCAACCTAGCTTAC	GCTTATTTGATACCCGCTCTG
270478 270578	CGAGAGCACCAAGATACACCATG	ACTAGCTCGCCTTCTTTCTCG
274140 274247	ATCCAATCTTCTTGAGAGCTG	TGATTTCTTGATGGTTGACTGC
277941 278045	CGACAAGTCGTGCTGAAGTTG	GAATTCAGTGAAGGTGGCGAG
282177 282273	TTTGAAACATTTGTGAGATGCC	TTCTTACCAATTCCATTTTCGAG
286792 286911	TGGAAGGACCTCCAAGAAACC	AAAGGCTTGCAGACCTTATGC
292828 292948	CTTCCCAACCTCAGATAGAAG	GAGTTGACATGAAATGGATCAC
299589 299691	GTTCAGTTGTTGCCCTCCGGTTG	AGCAGAGAACCACAGGGAAGAC
306260 306369	TGGCAACTGATTTGGTTTATG	GGGTAGAACTGAGAAATGGCAC
310532 310649	TTAGCTCGTCAGGATCGCAAG	TGCCCTTGTTCTTAGACCTCG
314566 314674	ATCTCCAAGCCCTTTACTAGG	ACAAGGACCAGCTTACTTTTCG
319855 319968	TCCGGATCCTTCAGACTTTCCG	GTAGGCTCATGCATTGCTGAC
324834 324942	TCCCTTTACTGTTGACATGGTG	CTTGACACAGGTTGTTCTTTTCG
328085 328165	GTAGATGGCGCTCAACTTCTG	GAGGTCATGTGCGAGTCAAGTG
332522 332640	GTCTGAGCAGCAACGTACAAC	GATGTTGAGGAGAAAGCAGGAG
337297 337401	TCGTGCGAAAGGTTCAAGCAAG	ATCGGACGCTAACCTGGAACCTG
341942 342038	GTGGACTTCCCAAGACTTTTCAG	TCTGGAACATGGAATTTGATTG
346953 347035	TAGTCCAACGCTCTCGCTATGG	TAAGCACACAAGCAGGGATGC
352185 352280	GACATAAGCCGTTTCTTGTTC	AAGCAGCAATACACTCAAGCAC
356004 356123	GATGTTGTTCTCGACTCCGTTG	CGGATTGGAGGCTTTGGGAATG
360635 360742	GGGGAATCCTCCTTAATAGACG	CATCCGAAGAAACGGAAAAATAC
363962 364069	GCGACAAGAAATCCTGCATCG	TATCGGGAGGGTCTGCAGATTTG
366597 366694	GTTGATCCATTGTGATGTTTGG	AAGTCCCATCTTGCTATGTTG

Annexe 1 : Liste des oligonucléotides utilisés pour les expériences de qPCR le long du génome mitochondrial d'*A. thaliana*.

Génotypage		
P2701	génotypage OEX1 (WT) S	CAGACATTCATGAAGACAG
P2702	génotypage OEX1 (WT) AS	GTAGCCTTGACACAACCTGAG
P787	génotypage OEX1 (mutant)	CGCCTATAAATACGACGGATCGTA
P3473	génotypage OEX2-g1 S	ACTAGCTCAATTCTGTAGCGTG
P3583	génotypage OEX2-g1 AS	CATTTTCTGAGATCAACTGC
P3584	génotypage OEX2-g2 S	CATACGCAGAGGTTGACGACG
P3585	génotypage OEX2-g2 AS	CCTCGTCCTCTCCTTTTCT
Tests d'activité		
P3203	Double brin marquage 3' S	P-TCTTTGCCACCTGCAGGTTCA
P3204	Double brin marquage 5' et 3' AS	GGGTGAACCTGCAGGTGGGCAAAGA
P3207	Double brin marquage 5' S + simple brin	TCTTTGCCACCTGCAGGTTACCC
P3252	Double brin marquage 3' S + simple brin	GTCACTCAGTCAGTCAGTCAGT
P3253	Double brin marquage 3' AS	GGGACTGACTGACTGACTGACTGAC
P3524	Double brin test 1G S	/5Phos/CACCAACCACTCACCAACCACTCAC
P3525	Double brin test 1G AS	GGGGTGAGTGGTGGTGAGTGGTGGTG
P3526	Double brin test 2G S	/5Phos/TCTTTGCCACCTGCAGGTTCA
P3527	Double brin test 2G AS	GGGTGAACCTGCAGGTGGCCAAAGA
P3528	Double brin test 3G S	/5Phos/TCTTTGGGCACCTGCAGGTTCA
P3529	Double brin test 3G AS	GGGTGAACCTGCAGGTGCCAAAGA
P3262	Flap S	ACTGACTGACTGACTGAC
P3261	Flap AS	GGGTAGCACTGAATCAGTCACGACGTCACTCAGTCAGT
P3226	Flap 5' S	TTTTTTTTTTTTTTTTGTCGTGACTGATTCAGTGCTAGCCC
P3263	Flap 3' S	P-TTTTTTTTTTTTTTTTTGTCGTGACTGATTCAGTGCTAG
P3224	Extrémité 5' sortante (6T) S	TTTTTTGTCGTGACTGATTCAGTGCTAGCCC
P3225	Extrémité 5' sortante (12T) S	TTTTTTTTTTTTGTCGTGACTGATTCAGTGCTAGCCC
P3226	Extrémité 5' sortante (18T) S	TTTTTTTTTTTTTTTTGTCGTGACTGATTCAGTGCTAGCCC
P3227	Extrémité 5' sortante (24T) S	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGTCGTGACTGATTCAGTGCTAGCCC
P3223	Extrémité 5' sortante AS	GGGCTAGCACTGAATCAGTCACGAC
P3381	Gap 1 nu S	GGGTGACTGACTGACTGACTG
P3365	Gap 1 nu S	P-GTCGTGACTGATTCAGTGCTAGCCC
P3267	Gap 1 nu AS	GGGTAGCACTGAATCAGTCACGACAGTCAGTCAGTCAGTCA
P3275	Gap 1 nu S	TGACTGACTGACTGACTG
P3382	Gap 1, 3 et 10 nu S	P-GTCGTGACTGATTCAGTGCTAG
P3451	Gap 3 et 10 nu AS	ACTGACTGACTGACTGACAGTCAGTCCAGCACTGACTAAGTCACGATCGGG
P3449	Gap 10 nu S	TGACTGACTGACTGAC
R27	ARN S	CACCAACCACUCACCAACCACUCACUUUU
P3491	hybride ARN:ADN AS	GTGAGTGGTTGGTGAGTGGTTGGT
P3366	Strcture type Okazaki AS	GTGAGTGGTTGGTGAGTGGTTGGTGCTGACTGAACCTGCAGGTGGGCAAAGA
P3521	R-loop S	/5BiosG/GACGCGACCCGAATTCTAGTGTAAGTCAAGTGCTGTAGGTAGACGATTCTCGTCTGAGAGAACCATCTATC GGATTGGCC
P3522	R-loop AS	/5BiosG/GGCGAATCCGATAGATGGGTAAAAAGTGAGTGGTTGGTGAGTGGTTGGTGGTGGTAGAATTCGGCTGCCT C
Mutagenèse dirigée de OEX1		
PM1 F	Amorce pour D232A S	AAGCTGATGCTGTATTGGAACACTG
PM1 R	Amorce pour D232A AS	CAATAACAACATCAGCTTCTACACCTG
PM2 F	Amorce pour D250A S	CTCTCCAGCCAAAGACTTCTTTTCA
PM2 R	Amorce pour D250A AS	GTCTTTGCTGGAGAGACAACCTCG
Amplification pour double hybride		
p3354	Pol1A + AttB S	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGGTCTCTCTGTTGTGTTAACGGA
p3355	Pol1A + AttB AS	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTATTTGGCAGCATACCACTTTTGGAG
p3356	Pol1B + attB1 S	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGGTCATCTCTGTTGAGTTTAGTG
p3357	Pol1B + attB1 AS	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTGATAAGATTACTCTGTTTCTC
p3359	OEX1 + attB S	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCACAGTCGATAAAATATCCTTTCAAG
p3360	OEX1 + attB AS	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTATGGCACTGCTTCCAGTTTTC
p3361	OEX2 + attB S	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGAACAGGTAATGTCAAGTCTTCAG
p3362	OEX2 + attB AS	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTATCCATGCAATGTTGAGAAGAAG

Annexe 2 : Liste des oligonucléotides utilisés pour les différentes expériences lors de cette thèse. S : sens ; AS : anti-sens

OEX1, une exonucléase/flap-endonucléase nécessaire à la stabilité du génome mitochondrial d'*Arabidopsis thaliana*

Résumé

Les organites des plantes sont en permanence exposées à divers stress pouvant altérer leurs génomes. Des mécanismes spécifiques sont dédiés à leur maintenance et leur réparation. Si l'on connaît les mécanismes en jeu, certains facteurs indispensables ne sont pas encore identifiés, entre autres des nucléases nécessaires pour la réplication, la réparation et la stabilité du génome mitochondrial. Au cours de ma thèse, j'ai caractérisé l'exonucléase mitochondriale OEX1 d'*Arabidopsis thaliana*.

Les mutants d'OEX1 se sont avérés très affectés dans leur développement et fertilité. J'ai montré que OEX1 est capable d'activité 5'-3' exonucléase et flap-endonucléase ainsi que de dégradation des ARN hybridés à l'ADN. OEX1 pourrait jouer un rôle dans les mécanismes de réparation du BER et de la recombinaison homologue, mais aussi dans la maturation des fragments d'Okazaki et l'élimination des R-loop.

J'ai aussi généré des mutants pour OEX2, un paralogue de OEX1 mais adressée au chloroplaste, par la technologie CRISPR-Cas9. Ces mutants ne sont pas affectés dans leur développement, indiquant que les fonctions d'OEX2 ne sont pas aussi essentielles que celles de OEX1.

Mots clés : ADN mitochondrial, Arabidopsis, Réparation, Exonucléase, flap-endonucléase, R-loop

Résumé en anglais

Plant organelles are constantly exposed to various stresses that can alter their genomes, which require specific mechanisms for their maintenance and repair. If we know the mechanisms involved, several factors essential to the maintenance of the mitochondrial genome have not yet been identified, among others nucleases necessary for the replication, repair and stability of the genomes. During my thesis, I characterized the mitochondrial exonuclease OEX1 from *Arabidopsis thaliana*.

The mutants of OEX1 were found to be very affected in their development and fertility. I have shown that OEX1 is capable of 5'-3' exonuclease and flap-endonuclease activities, and of degrading RNAs hybridized to DNA. OEX1 could thus play a role in the repair mechanisms of BER and homologous recombination, but also in the maturation of Okazaki fragments and the elimination of R-loops.

I also generated mutants for OEX2, a paralog of OEX1 but addressed to the chloroplast, by CRISPR-Cas9 technology. However, these mutants are not affected in their development, indicating that the functions of OEX2 are not as essential as those of OEX1.

Keywords: Mitochondrial DNA, Arabidopsis, Repair, Exonuclease, Flap-endonuclease, R-loop