



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-memoires-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

MASTER FAGE
Biologie et Ecologie pour la Forêt, l'Agronomie et
l'Environnement

Spécialité
BIPE

**Mise au point d'un système de transfection des
mitochondries**

Mémoire de stage, soutenu à Nancy le 05/09/2012

Présenté par : **Clémentine WALLET**

Encadré par André Dietrich, Directeur de recherche

Département : Biogenèse des mitochondries dans la cellule végétale
CNRS UPR2357,
Institut de Biologie Moléculaire des Plantes,
12 rue du Général Zimmer, 67000 Strasbourg

REMERCIEMENTS

J'adresse mes remerciements à toute l'équipe du département mitochondries pour m'avoir accueillie ces 6 mois de stage.

Je remercie Anne Cosset pour le temps qu'elle m'a consacré au début de mon stage et pour ses conseils avisés.

Je remercie Malek Alioua pour son efficacité à réaliser mes centaines de séquençages en un temps record.

Je remercie Daria Mileschina pour son encadrement, et toute l'aide qu'elle m'a apportée.

Je remercie mon maître de stage André Dietrich pour ses conseils tout au long du stage et le temps qu'il m'a consacré pour finaliser ce rapport.

Encore merci à toute l'équipe pour la bonne humeur qui règne au labo.

Présentation de l'Institut de Biologie Moléculaire des Plantes

L'UPR2357 est un institut du CNRS situé sur le campus de l'Esplanade, conventionné avec l'Université de Strasbourg et affilié à l'Ecole Doctorale de la Vie et de la Santé. Avec près de 200 collaborateurs, l'IBMP est la plus grande unité propre du CNRS dans le domaine de la biologie végétale intégrative.

Les axes de recherche de l'IBMP privilégient les mécanismes moléculaires et cellulaires de la croissance, du développement des végétaux et de leurs réactions vis-à-vis de stress environnementaux et pathogéniques (virus), ainsi que la caractérisation de biomolécules actives. L'IBMP, dont la direction est assurée par Pascal Genschink, est organisé en quatre départements de recherche :

- Le département Mécanismes moléculaires de la plasticité phénotypique, dont les recherches portent sur les multiples et complexes mécanismes moléculaires qui régulent l'ARN (RNA silencing), les protéines. Il aborde également les mécanismes régulant la biosynthèse et la dynamique du cytosquelette végétal ainsi que la fonction d'oncogènes d'origine bactérienne.
- Le département Réseaux métaboliques chez les végétaux, qui étudie la biosynthèse de molécules issues du métabolisme secondaire et son influence dans la plante sur: le développement, la croissance, son adaptation à l'environnement climatique, chimique et biotique (parasites, prédateurs, insectes pollinisateurs).
- Le département Virologie intégrative dont les chercheurs étudient les mécanismes d'interactions entre les virus et leurs hôtes et comment en tant que parasites, ils ont besoin de cellules hôtes pour assurer leur cycle de multiplication. Le détournement cellulaire de la plante par les virus, et les défenses que la plante met en place contre ceux-ci sont abordés.
- Enfin, le département Biogenèse des mitochondries dans la cellule aborde les thèmes de recherche fondamentale de la biogenèse de la mitochondrie, son expression génétique et ses interactions avec les autres compartiments de la cellule végétale.

C'est dans ce dernier département, dirigé par Laurence Drouard, que j'ai effectué mon stage. L'équipe d'André Dietrich travaille sur la transformation des mitochondries et a déposé un brevet sur une technologie de transfert d'ARN via une navette constituée d'un mime d'ARNt. L'équipe travaille également sur l'élaboration de vésicules de transport d'ADN vers la mitochondrie dans la cellule et d'autres sujets de recherche abordant la transformation des mitochondries.

Table des matières

Présentation de l'Institut de Biologie Moléculaire des Plantes	
I. Introduction Bibliographique.	- 1 -
A. La mitochondrie, centre de la phosphorylation oxydative	- 1 -
B. Le génome mitochondrial des plantes	- 1 -
1. Structure et dynamique	- 1 -
2. La CMS	- 2 -
C. Le génome mitochondrial humain et les maladies neuromusculaires	- 4 -
1. Structure et contenu	- 4 -
2. Les maladies neuromusculaires	- 4 -
D. La transformation des mitochondries	- 5 -
E. Problématiques du stage.....	- 6 -
II. Matériel et Méthodes.....	- 7 -
A. Matériel.....	- 7 -
1. Matériel génétique	- 7 -
2. Culture de cellules humaines	- 8 -
3. Matériel végétal	- 8 -
4. Matériel bactérien	- 8 -
B. Méthodes	- 8 -
1. Synthèse des substrats.....	- 8 -
2. Extraction de mitochondries	- 9 -
3. Import d'ADN et extraction.....	- 10 -
4. Analyses.....	- 11 -
III. Résultats	- 12 -
A. Recombinaison d'un fragment d'ADN dans les mitochondries isolées de pomme de terre - 12 -	
1. Recombinaison du fragment nad2/gfp de 2,4 kb	- 13 -
2. Recombinaison du fragment nad2/gfp de 0,7 kb	- 17 -
B. Import d'ADN dans des mitochondries isolées de cellules humaines.....	- 18 -
1. Import du fragment DR/gfp (3,5 kb).....	- 18 -

2.	Import de l'ADNmt entier linéaire (16,5 kb).....	- 18 -
3.	Import d'un fragment linéaire d'ADNmt avec ou sans D-loop	- 20 -
4.	Circularisation d'un fragment d'ADN après import.....	- 21 -
IV.	Conclusions et perspectives	- 22 -
	BIBLIOGRAPHIE	- 24 -
	Annexe 1	
	Annexe 2:	
	Annexe 3 :	

I. Introduction Bibliographique.

A. *La mitochondrie, centre de la phosphorylation oxydative*

Les cellules eucaryotes, contrairement aux procaryotes, sont compartimentées. Les fonctions de la cellule sont donc réparties et organisées dans ces divers compartiments. Le noyau contient la majorité de l'information génétique, qui code pour la plupart des protéines et des fonctions de régulation de la cellule. On trouve également le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi et les peroxysomes, intervenant dans la maturation, l'adressage et la dégradation des protéines. Cependant les mitochondries, ainsi que les chloroplastes, présents uniquement chez les plantes, ont des propriétés bien particulières. Contrairement aux autres compartiments et tout comme le noyau, ils sont délimités par une double membrane lipidique. Et bien que beaucoup de leurs protéines soient codées par le génome nucléaire et synthétisées dans le cytosol, ils possèdent leur propre génome avec des caractéristiques qui lui sont propres.

L'ATP est la principale molécule énergétique des cellules. Elle est indispensable à de nombreux processus cellulaires comme par exemple la transcription des gènes, la traduction des ARN, les transports intra- et intercellulaires et les mouvements du cytosquelette. Tout comme les chloroplastes, les mitochondries sont un centre de la production d'ATP. La membrane interne des mitochondries est le lieu de mise en place de la chaîne respiratoire. Ce sont les coenzymes réduites (NADH₂ et FADH) qui cèdent leurs électrons à des complexes protéiques membranaires qui, par une cascade d'oxydoréductions, vont les échanger avec l'accepteur final : l'oxygène. La membrane mitochondriale est imperméable aux ions H⁺ mais cette chaîne de transfert d'électrons permet le passage d'ions H⁺ vers l'espace intermembranaire. Cela a pour conséquence la mise en place d'un gradient de protons. Cette énergie osmotique permet la formation d'ATP, catalysée par l'ATP synthétase qui phosphoryle l'ADP. La matrice mitochondriale est également le lieu du cycle de Krebs, transformant le pyruvate en pouvoir réducteur et en GTP. La mitochondrie est donc un lieu de réactions chimiques permanent et pour cela, de nombreux polypeptides, intramembranaires pour la chaîne respiratoire notamment, ou intramatriels sont nécessaires.

La majorité des protéines présentes dans la mitochondrie sont codées par le génome nucléaire et importées post-traductionnellement. D'autres encore sont transférées pendant la traduction. Cependant, les protéines codées par le génome mitochondrial sont destinées à rester dans la mitochondrie. Elles ont toutes une importance cruciale dans la phosphorylation de l'ADP et donc dans l'approvisionnement énergétique de la cellule. Des recombinaisons, mutations ou délétions dans le génome mitochondrial peuvent ainsi avoir des conséquences importantes sur les plantes pendant le développement ou la fabrication des étamines, du pollen ou du gynécée et chez les mammifères cela peut entraîner des maladies neuromusculaires.

B. *Le génome mitochondrial des plantes*

1. Structure et dynamique

Le génome mitochondrial des plantes a une taille qui varie selon les espèces. En effet il va de 220 kb chez *Brassica napus* à 1685 kb chez le concombre (Havey *et al.* 2002, Handa *et al.* 2003,) (Alverson *et al.* 2011). Il y a beaucoup d'introns et une faible densité de gènes, ce qui peut expliquer une taille de génome si importante. En effet chez *Arabidopsis thaliana* par exemple, on y trouve 82% de séquences non codantes (Unsel *et al.* 1997). Chez les plantes,

la structure du génome mitochondrial est très dynamique et il peut être présent en même temps sous des formes linéaires, circulaires ou branchées de différentes tailles (Kubo *et al.* 2008). On y retrouve de nombreuses séquences répétées de différentes sortes et dont l'activité diffère. Les grandes séquences répétées (au-dessus de 0,5 kb) présentent une forte activité et une fréquence élevée de recombinaisons. Ce sont ces séquences, dont la recombinaison est fréquente et réversible, qui confèrent au génome mitochondrial des plantes une structure dynamique. On trouve également des séquences répétées plus courtes entre 6 et 36 bp qui sont à l'origine de recombinaisons plus rares et à caractère irréversible. (Kmiec *et al.* 2006).

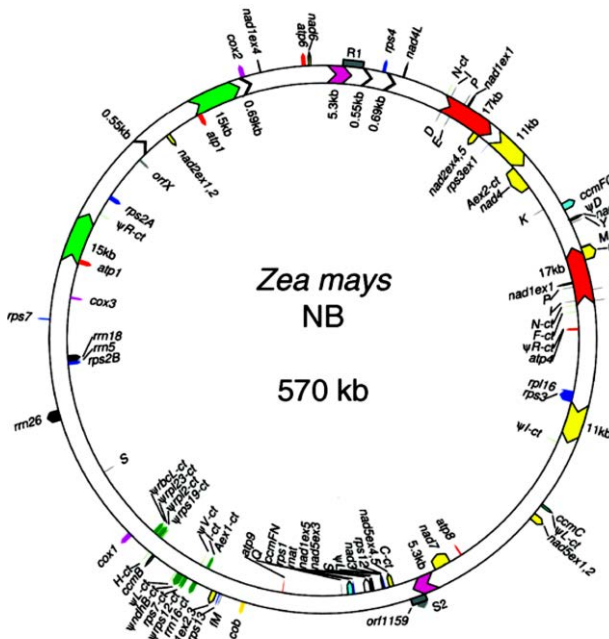


Figure 1 : Exemple d'ADNmt végétal chez le maïs
Les zones blanches représentent les régions non-codantes. Les zones colorées représentent les zones codant pour un gène de protéine. (Kubo *et al.* 2008)

Très peu de mutations ponctuelles du génome mitochondrial affectant les fonctions de la plante ont été reportées. Des délétions résultant de recombinaisons entre des petits fragments répétés (6 à 100 bp) ont parfois lieu, entraînant des désordres au niveau des zones chlorophylliennes ou de la croissance (« Non Chromosomal Stripe » ou NCS chez le maïs Karpova *et al.* 2003). Chez les angiospermes, la majorité des mutants mitochondriaux sont dus à des cadres de lecture ouverte chimériques (open reading frame : orf) qui proviennent de fragments de gènes mitochondriaux ayant été recombinaisonnés de manière aberrante. Ces orf sont à l'origine du plus grand groupe de mutants dont le phénotype est une stérilité mâle cytoplasmique (« cytoplasmic male sterility » ou CMS), qui se manifeste au niveau du développement des gamétocytes (Kubo *et al.* 2008). Cela peut aller de l'absence d'étamines, à la malformation voire l'absence de pollen, en règle générale à la production de pollen non-viable (Pelletier and Budar, 2007).

2. La CMS

La CMS est définie comme une stérilité mâle d'ascendance maternelle due à un gène mitochondrial spécifique dont l'expression empêche la production de pollen viable, sans que le reste de la plante ne soit affecté (Budar and Pelletier, 2001). De nombreuses CMS de phénotypes différents ont été observées chez un grand nombre d'espèces. Les protéines responsables et les gènes codants sont divers et ont parfois pu être identifiés. Historiquement, la première CMS dont le gène responsable a été identifié est la CMS Ogura due à l'orf138 chez le radis (*Raphanus sativus*). Mais d'autres CMS ont été étudiées chez le maïs (CMS-T, CMS-S), le pétunia, le tournesol, le tabac et *A.thaliana* (Chase, 2007).

Le génome mitochondrial étant transmis de la plante mère à la descendance, la CMS est donc un caractère à hérédité maternelle. Or, le phénotype est le résultat de l'interaction des génomes nucléaires et mitochondrial. La présence de gènes restaurateurs dans le noyau peut donc masquer la CMS jusqu'à ce que l'allèle restaurateur disparaisse au fil des croisements (Chase, 2007). Le mécanisme de restauration peut être à l'origine d'une compensation métabolique de la CMS, ou agir sur l'expression de protéines PPR (« pentatricopeptide-repeat proteins »), impliquées dans les processus post-transcriptionnels des organelles (Schmitz-Linneweber and Small, 2008).

L'utilisation des CMS et des gènes restaurateurs associés ouvrent un champ d'application en amélioration du végétal pour contrôler la sélection variétale chez certaines plantes cultivées. En effet chez les plantes utilisées en agronomie on observe un phénomène appelé vigueur hybride. Les individus hétérozygotes présentent de meilleures qualités agronomiques, ils sont plus résistants aux agresseurs et produisent plus de grain, de meilleure qualité. On cherche donc à créer des variétés hybrides bénéficiant de l'effet d'hétérosis. Pour cela on croise deux lignées homozygotes obtenues par autofécondation. La maîtrise de ces croisements nécessite une castration des organes sexuels mâles. Or ceci n'est pas toujours réalisable sur les plantes comme le blé, hermaphrodite, et demande du temps pour le maïs en grand champs. L'idéal est donc d'obtenir une lignée mâle stérile cytoplasmique, car cette stérilité est transmise de la plante femelle à tous ses descendants. La fertilité de cette lignée peut être restaurée grâce à l'intervention de gènes nucléaires à allèles récessifs et dominants. En utilisant cette lignée comme parent femelle, croisée avec une lignée homozygote contenant un l'allèle restaurateur, on obtient un hybride fertile.

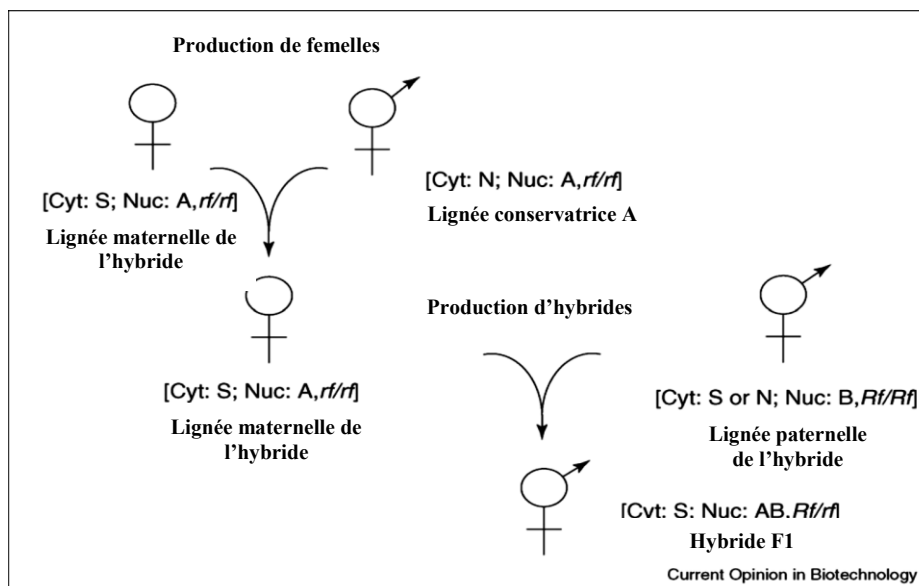


Figure 2 : L'utilisation de la CMS pour les croisements agronomiques.

Cyt: caractère stérilisant du cytoplasme (dû aux mitochondries): S pour stérile et N pour non-stérile.
Nuc : génotype A ou B du noyau, caractère récessif (rf) ou dominant (Rf) de l'allèle restaurateur situé sur chaque chromosome. (De Pelletier et Budar, 2007)

La lignée mâle stérile maternelle est obtenue par croisement entre l'ovule d'un individu A homozygote contenant un cytoplasme stérilisant et le pollen d'un individu B ne contenant pas l'allèle restaurateur, mais de bonnes propriétés agronomiques. En effectuant un rétrocroisement avec l'individu B, on finit par obtenir un individu avec le noyau de l'individu B mais possédant les propriétés cytoplasmiques de l'individu A.

L'obtention de lignées CMS dont le gène restaurateur est connu peut prendre quelques années en utilisant uniquement la sélection variétale. C'est pourquoi la transgénèse mitochondriale au même titre que la transgénèse nucléaire ou chloroplastique, est une stratégie envisagée pour obtenir des lignées CMS.

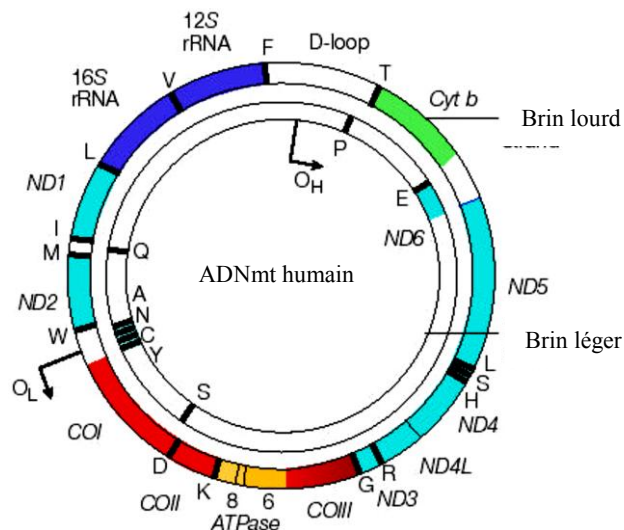
C. Le génome mitochondrial humain et les maladies neuromusculaires

1. Structure et contenu

Le génome mitochondrial humain est bien connu. Il est présent sous la forme d'un ADN double brin circulaire de 16,5 kb qui a été entièrement séquencé dès le début des années 80. On sait donc qu'il code pour 13 protéines de la chaîne respiratoire, 22 ARN de transfert (ARNt) et 2 ARN ribosomiques (ARNr). Il présente également une origine de réplication pour chaque brin et une région non codante (« displacement loop » ou D-loop) (Figure 3). La D-loop ou région de contrôle est un domaine de l'ADN mitochondrial (ADNmt), essentiel pour la réplication et la transcription (Tuppen *et al.* 2010). Ce génome est présent en copies multiples dans la mitochondrie, et on observe souvent une hétéroplasmie. Certaines mutations sont homoplasmiques et affectent toutes les copies de l'ADNmt, d'autres n'en affectent que certaines copies et sont donc hétéroplasmiques. Dans ce cas, c'est le pourcentage d'ADNmt muté qui va déterminer le phénotype (Taylor and Turnbull. 2005).

Figure 3 : Shématisation de l'ADNmt humain de 16,5 kb

Il code dans plusieurs sens et certains gènes se chevauchent. La D-Loop est présente sur le brin lourd. (De Taylor et Turnbull 2005)



2. Les maladies neuromusculaires

Alors que les recombinaisons sont rares, les mutations ponctuelles et délétions peuvent être assez courantes dans le génome mitochondrial humain et sont la source de nombreuses maladies héréditaires graves et incurables (Zeviani *et al.* 2004). Une même maladie peut résulter de mutations différentes, tandis qu'une même mutation peut provoquer des maladies différentes. Les mutations de l'ADNmt sont toutes transmises de la mère à l'enfant, le degré d'hétéroplasmie dépendra de la distribution des mitochondries mutées lors de la formation des oocytes (Figure 4) (Tuppen *et al.* 2010). D'après une étude anglaise, une personne sur 3500 pourrait être atteinte d'une de ces maladies ou risque d'en développer une (Schaefer *et al.* 2004). Ces maladies sont nombreuses et peuvent toucher des organes divers, gourmands en énergie comme le cerveau, les muscles et le cœur. Ces affections peuvent être à plus ou moins grande intensité et sont pour la plupart des maladies neuromusculaires. Mais ces mutations peuvent aussi avoir un rôle dans la prédisposition à certaines maladies comme le diabète, et sont impliquées dans le vieillissement cellulaire (Greaves *et al.* 2012). L'intensité et la gravité de la maladie dépendra du nombre de copies d'ADNmt mutées. Dans le but de soigner ces maladies, des stratégies de complémentation, ou d'inhibition de la réplication de l'ADNmt muté sont envisagées. Une approche différente consisterait à déplacer l'équilibre génome muté/génome sauvage, en important des ADNmt non mutés.

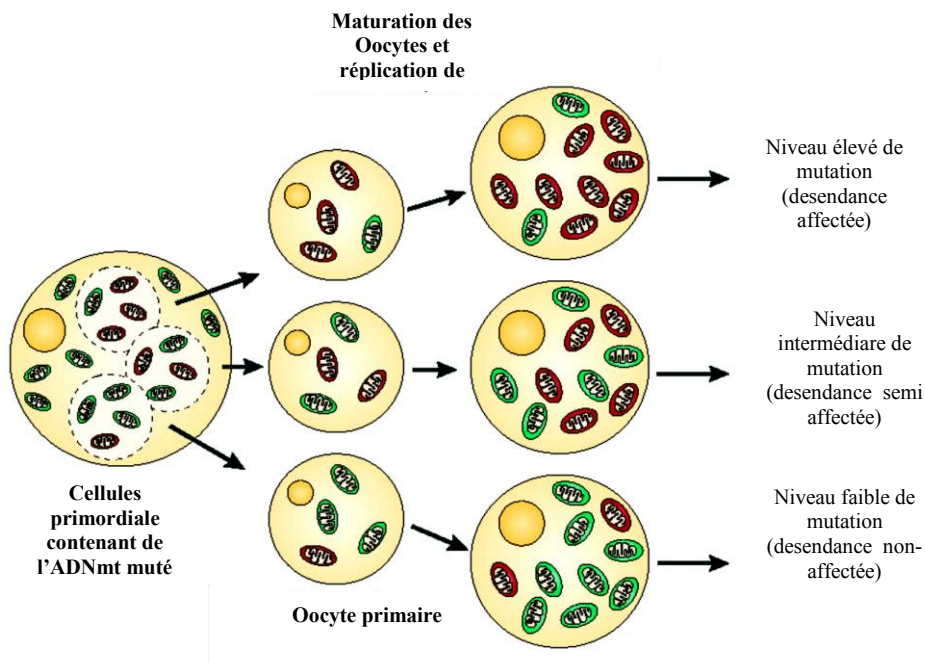


Figure 4 : Répartition des différents réplicons de l'ADNmt lors de la formation des Oocytes. (Taylor and Turnbull 2005).

En vert mitochondries non-mutées.
En rouge mitochondries mutées.
En jaune le noyau

D. La transformation des mitochondries

Dans le contexte actuel, la transformation des mitochondries semblerait une approche évidente pour étudier le fonctionnement génétique des organelles, maîtriser la CMS ou soigner les maladies dues à des mutations de l'ADNmt, par des approches de thérapie génique.

Les premiers essais de manipulations génétiques des mitochondries ont eu lieu dans les années 80. Clark et Shay ont réussi à importer des mitochondries purifiées portant un gène de résistance à un antibiotique dans des cellules de mammifère (Clark and Shay, 1982). D'autres essais ont été menés mais il s'avère complexe d'envisager un mode de thérapie où l'on injecte des mitochondries purifiées dans les cellules. Des essais de transformation conventionnelle des mitochondries dans les cellules entières, comme cela se fait pour les chloroplastes, ont été effectués par la méthode de biolistique. Cette approche consiste à bombarder les cellules avec des particules d'or ou de tungstène recouvertes d'ADN. Elle n'a été couronnée de succès que dans le cas de *Saccharomyces.cerevisiae*, *Chlamydomonas reinhardtii* et *Candida glabrata* (Bonney et al. 2007) (Zhou et al. 2010). C'est pourquoi l'élaboration de stratégies alternatives a été explorée.

Certains ARNt sont naturellement transférés du cytosol dans la mitochondrie. En associant un mime d'ARNt à une séquence à importer, on peut exploiter cette capacité d'import pour transférer de l'ARN dans la mitochondrie (Val et al. 2011). Dans ce cas on transforme le noyau et c'est l'ARN qui est adressé dans les organelles. Dans la même idée, chez les mammifères, l'ARNr 5S qui est naturellement importé dans les mitochondries, peut être modifié pour insérer une séquence d'intérêt. Cette séquence pourrait être un ARN antisens bloquant la réplication des ADNmt mutés (Smirnov et al. 2008). D'autres navettes, telles qu'une région de la composante ARN de l'enzyme RNase P, ont été proposées. En effet, cet ARN serait importé du cytosol vers la mitochondrie grâce à une séquence spécifique formant une tige-boucle (Wang et al. 2010). L'utilisation de cette séquence permet l'import d'ARN (Wang et al. 2012).

D'autres stratégies ont été pensées pour transporter de l'ADN dans les mitochondries au sein des cellules. Des essais ont été menés en conjuguant l'ADN à une séquence signal peptidique permettant l'import des protéines vers la mitochondrie (Flierl et al. 2003). Une navette protéique plus grosse a également été élaborée. Elle contient un domaine de transduction (TD)

permettant son entrée dans la cellule à travers la membrane plasmique, puis un domaine MTS d'adressage à la mitochondrie. Les deux domaines sont associés au facteur de transcription mitochondrial TFAM, qui va porter l'ADN. Des essais ont déjà été faits sur des cellules humaines. (Iyer *et al.* 2009)

Il a été montré que les mitochondries isolées étaient capables d'importer de l'ADN. (Koulintchenko *et al.* 2003, 2006). Beaucoup d'études portent donc sur l'apport d'ADN à l'intérieur de la cellule, jusqu'à la mitochondrie. Des vésicules mitochondriotropiques comme les DQasomes ou les liposomes, capables de relarguer de l'ADN au contact des organelles sont à l'étude (Lyrawati *et al.* 2011, Wagle *et al.* 2011). Les MITO-Porter quant à eux sont des vésicules entourées de deux membranes, l'une pouvant fusionner avec la membrane plasmique, puis l'autre pouvant fusionner avec celle des mitochondries (Yamada and Harashima, 2012). Seul le transport de protéines a été testé pour l'instant par cette approche.

Si les recherches sur le transfert d'ADN jusque dans la mitochondrie sont en cours, les modalités de recombinaison et les mécanismes au niveau de l'ADNmt sont encore mal connus. C'est pourquoi des études sur la recombinaison après import dans des mitochondries isolées permettront d'en savoir plus et de maintenir l'ADN importé.

E. Problématiques du stage

Les objectifs de mon stage étaient larges et m'ont été donnés dans l'optique de pouvoir continuer les recherches dans le cadre d'une thèse. Le but était de définir des constructions ADN qui pourront être maintenues dans les mitochondries par recombinaison ou réplication et remplir les fonctions attendues. Nous avons profité pour ces études de la possibilité d'importer l'ADN dans les mitochondries isolées.

Chez les plantes, l'objectif à long terme serait d'intégrer un gène responsable de la CMS, pour directement obtenir des lignées mâle-stériles. Pour cela il est indispensable de pouvoir exercer une pression de sélection, comme la résistance à un antibiotique, afin de promouvoir une transformation mitochondriale homoplasmique. Le but est également d'obtenir un transcrit fonctionnel, et pour cela d'avoir une unité fonctionnelle contenant un promoteur fort d'un gène mitochondrial. Il a été montré que l'import d'ADN dans les mitochondries dépend de la séquence pour les gros fragments (>7 kb) (Ibrahim *et al.* 2011). Au cours de mon stage, Un fragment a été construit avec un morceau du gène de la gfp flanqué de séquences propres au génome mitochondrial de *Solanum tuberosum* (pomme de terre). L'objectif était de voir si la longueur de ces séquences influe sur la recombinaison, et à plus long terme de remplacer la séquence gfp par une séquence CMS.

Chez les mitochondries humaines, l'objectif à long terme serait de pouvoir abaisser le rapport ADNmt muté/ ADNmt sauvage en important des réplicons. En effet, l'ADNmt de l'homme est de taille raisonnable et il est envisageable de le manipuler en entier avec les outils moléculaires actuels. D'un autre côté, pour être plus efficace *in vivo*, il est imaginable de ramener l'ADN à importer à une construction fonctionnelle palliant à la mutation d'un gène donné. Cependant, pour maintenir et exprimer l'ADN importé, il doit contenir le promoteur approprié et pouvoir se répliquer dans la mitochondrie. Plusieurs points sont donc à étudier. L'objectif a été dans un premier temps d'amplifier l'ADNmt humain (16,5 kb) et de voir si un ADN de si grande taille peut être importé dans les mitochondries. Les ADN utilisés pour l'import sont linéaires car les mitochondries n'importent pas d'ADN circulaire. Or pour pouvoir être répliqué, l'ADN importé doit être circulaire. L'objectif a donc été de circulariser l'ADN après import en utilisant une stratégie de « bouts collants ».

II. Matériel et Méthodes

A. Matériel

1. Matériel génétique

a) Construction nad2-St/gfp

La construction utilisée avait déjà été clonée auparavant dans le vecteur pBluescript KS (Stratagene) (plasmide pBnad2-St/gfp). Il s'agit d'un fragment du gène de la GFP entouré de séquences connues du génome mitochondrial de la pomme de terre (*Solanum tuberosum*). On postule ainsi que les séquences homologues vont se recombinaison avec le génome mitochondrial et ainsi insérer le fragment du gène de la GFP (Mileshina *et al.* 2011).

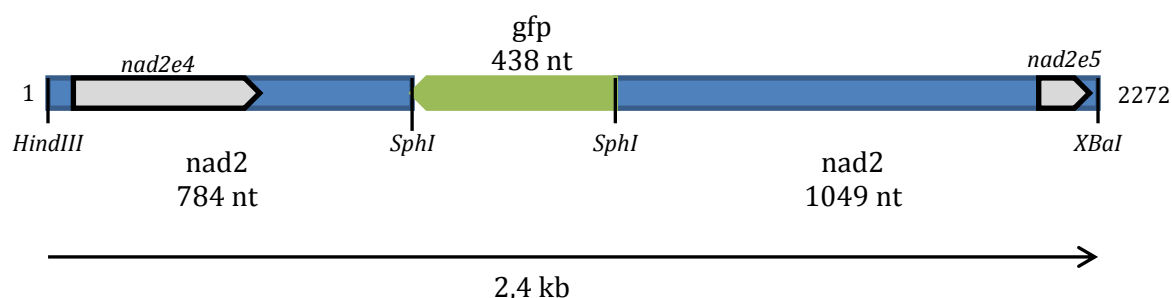


Figure 5: Construction nad2-St/gfp.

Morceau de gène gfp inséré dans le gène nad2 de la pomme de terre ; nad2e4 et nad2e5 : exons du gène nad2. SphI, XbaI et HindIII : sites de restriction.

b) Construction DR-Zm/gfp

Cette construction a été préparée de la même manière que pour nad2-St/gfp, mais le morceau de GFP a été flanqué de séquences répétées du génome mitochondrial de maïs (Mileshina *et al.* 2011).

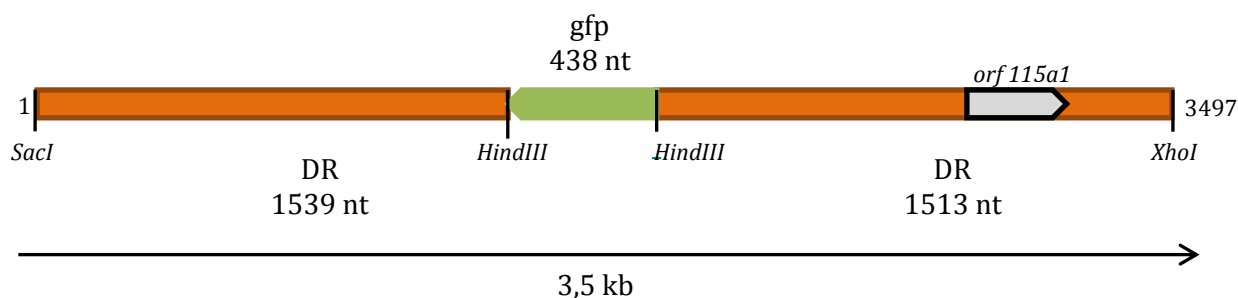


Figure 6: construction DR-Zm/gfp

Morceau de gène gfp inséré dans le gène DR du maïs. orf115a1 : région codantes ; SacI, HindIII et XhoI sites de restriction

c) Amorces utilisées

La liste des amorces utilisées lors des PCR est en Annexe 1.

2. Culture de cellules humaines

Les cellules humaines HEPG2 sont des cellules provenant d'une tumeur cancéreuse du foie humain. Elles sont adhérentes et poussent en monocouche. Elles sont donc cultivées en flasques, à l'obscurité. Elles se développent à 37°C sous une atmosphère contenant 5% de CO₂, dans du milieu HEPG2. Le milieu est changé tous les jours et les cellules sont repiquées tous les deux jours : après aspiration du milieu, les cellules sont décollées avec une solution de PBS + EDTA 1 mM, puis remises en solution dans du milieu frais. Environ la moitié est ensemencée dans une nouvelle boîte.

Milieu HEPG2 : poudre MO643 SIGMA (Minimum essential medium) 9,6 g/L; bicarbonate de sodium à 2,2 g/L; 10% (v/v) de sérum fœtal de bœuf décomplémenté (FBS) GIBCO ; 1% (v/v) de Fungizone GIBCO (Amphotericin B 250µg/mL) ; 1% (v/v) de Pen Strep GIBCO (Penicilline 5000 unités/mL, Streptomycine 5000 µg/mL).

Tampon PBS: NaCl 137 mM ; KCl 2,7 mM ; Na₂HPO₄ 10 mM; KH₂PO₄ 1,76 mM ; pH 7,5.

3. Matériel végétal

Les mitochondries de plantes ont été extraites de *Solanum tuberosum* communément appelée pomme de terre. Les tubercules utilisés sont des pommes de terre de consommation et sont achetées chez un producteur local.

4. Matériel bactérien

Les bactéries utilisées lors du clonage en vue de séquencer sont de la souche DH5α d'*Escherichia.coli*.

B. Méthodes

1. Synthèse des substrats

Pour toutes les réactions d'amplification et de synthèse, le master mix Phusion (Fermentas) contenant une ADN polymérase thermostable a été utilisé. Elles ont été catalysées dans un thermocycleur T3000 (Biometra). Les réactions de PCR directe ont été réalisées avec 50 ng d'ADN final extrait des mitochondries. Pour les analyses de PCR inverse, 1 µg d'ADN final extrait des mitochondries a été digéré à l'aide de l'enzyme de restriction *MseI*. Après une extraction au phénol/chloroforme (1:1) et une précipitation éthanolique, 100 ng d'ADN ont été utilisés pour une religation des extrémités *MseI* entre elles. Pour obtenir le maximum de fragments reliés, la réaction a eu lieu toute la nuit à 11°C à l'aide de la T4 ADN ligase (5 unités pour 100 ng d'ADN).

a) Synthèse des fragments nad-2/gfp

La recombinaison a été testée avec des fragments contenant des séquences flanquantes de différentes longueurs. Les amorces nad3 et nad5 (Annexe 1) sont utilisées pour synthétiser le fragment de 2,4 kb contenant le morceau de gfp tel que présenté dans la Figure 5. Les amorces nad150FW et nad150REV, situées à environ 150 nucléotides de chaque côté du morceau de gfp, permettent de synthétiser le fragment suivant, long de 0,7 kb (Figure 7). La matrice utilisée est toujours le plasmide pBnad2-St/gfp contenant la construction.

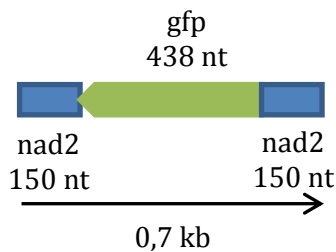


Figure 7: construction *nad2-St/gfp* avec de petites séquences flanquantes

b) Synthèse des fragments DR/*gfp* avec ou sans extrémités modifiées

Le fragment DR/*gfp*, a d'abord été synthétisé par PCR avec ou sans 13 nucléotides supplémentaires à ses extrémités grâce aux couples d'amorces M13FW/M13REV (Annexe 1) et UniFW/UniREP, respectivement. Pour rechercher la circularisation après import dans les mitochondries, le fragment a ensuite été synthétisé avec les 13 nucléotides supplémentaires contenant un uracile. Pour cela, plusieurs enzymes ont été testées avec les amorces M13UFW et M13UREV : la PfuTurbo ADN polymérase (Stratagene), une LongRange ADN polymérase (KAPA Biosystems) et une Taq Polymérase préparée à l'institut, dans différents tampons, avec présence ou non de $MgCl_2$.

c) Synthèse d'ADN de grande taille (9 à 16,5 kb)

De l'ADNmt humain a d'abord été extrait selon la méthode décrite ci-dessous. Après contrôle sur gel, une PCR a été effectuée pour amplifier ce génome dans son intégralité. Au vu de la taille de l'ADN à amplifier (16,5 kb), l'enzyme LongRange (KAPA Biosystems) a été utilisée selon les conditions recommandées.

d) Marquage d'ADN pour l'import

Le fragment d'ADN destiné à être importé est marqué radioactivement, afin de suivre son import dans les mitochondries. Pour cela, un cycle de PCR de 20 minutes est effectué sur le fragment en présence de 100 μCi de $[\alpha\text{-}^{32}P]$ dCTP (3000 Ci/mmol), des amorces utilisées pour synthétiser le fragment, d'une ADN polymérase et de dATP, dGTP, dTTP (0,4 mM chacun). Pour terminer l'élongation, 0,4 mM de dCTP non radioactif est ajouté et le tout est incubé 5 minutes à 72°C. Le produit est purifié sur une colonne de Sephadex G50 et on effectue ensuite un comptage pour évaluer l'efficacité du marquage.

2. Extraction de mitochondries

a) Mitochondries de pomme de terre

Le but est d'obtenir des mitochondries isolées intactes et purifiées du matériel nucléaire ou cytosolique. Les tubercules sont broyés dans un extracteur de jus domestique. L'extract est recueilli dans 1/2 volume de tampon de broyage puis filtré. Ce filtrat subit plusieurs centrifugations différentielles à 4°C. Une première de 10 minutes à 3000 *g* permet d'éliminer les plus gros débris cellulaires et les noyaux. La deuxième de 20 minutes à 9000 *g* est réalisée sur le surnageant et permet d'obtenir un culot formé entre autres de mitochondries. Le culot est repris dans du tampon de lavage et resuspendu dans un homogénéisateur de Dounce. Après une deuxième série de centrifugations différentielles, le culot est encore une fois resuspendu dans du tampon de lavage. Les mitochondries sont purifiées par dépôt sur une solution de Percoll 30% (v/v) et une centrifugation de 50 minutes 18000 *g*. Dans le gradient de densité qui se forme durant la centrifugation, les mitochondries intactes sont séparées des abimées et des restes de membranes. Les mitochondries purifiées, sont récupérées dans le bas du tube, puis reprises dans du tampon de lavage et centrifugées à 9000 *g* pendant 20 minutes. Après un lavage final dans du tampon sans BSA, elles sont reprises dans un volume minimal de tampon de lavage sans BSA.

Tampon de broyage : saccharose 0,9 M ; pyrophosphate de sodium 90 mM ; EDTA 6 mM, BSA 9% (p/v) ; Glycine 15 mM ; PVP 10000 2,4% (p/v) ; Cystéine 1,5% (p/v) ; β -mercaptoethanol 6 mM ; pH 7,5.

Tampon de lavage : saccharose 0,3 M ; phosphate de potassium 10 mM pH 7,5 ; EDTA 1 mM ; BSA 0,1% (p/v) ; glycine 5 mM.

Solution de Percoll: saccharose 0,3 M; phosphate de potassium 10 mM pH 7,5; EDTA 1 mM ; BSA 0,1% (p/v) ; Percoll 30% (v/v).

b) Mitochondries humaines

Après avoir décollé les cellules humaines HEPG2 avec du PBS + EDTA (1 mM), et les avoir lavées avec du PBS, celles-ci sont reprises dans un petit volume de Tampon H puis broyées dans un homogénéisateur de Dounce (piston à jeu étroit). Afin de ne pas abîmer les mitochondries, le mouvement de broyage est effectué seulement 15 fois. Une première centrifugation de 4 minutes à 400 *g* est effectuée. Le surnageant est mis de côté et, afin d'extraire le maximum de mitochondries, les étapes de broyage et centrifugation sont répétées sur le culot. La première centrifugation permet d'éliminer les plus gros débris cellulaires. Une deuxième centrifugation est ensuite réalisée à 15000 *g* pendant 10 minutes, pour obtenir un culot brut de mitochondries. Après resuspension dans du tampon H, les mitochondries sont purifiées grâce à une solution de Percoll H sur coussin de saccharose et une centrifugation de 30 minutes à 100000*g*. Elles sont lavées dans 10 volumes de tampon H et enfin dans du tampon H sans BSA. Les mitochondries sont finalement reprises dans un petit volume de tampon H sans BSA.

Tampon H: Saccharose 250 mM; Tris-HCl 10 mM pH 7,4; EGTA 1 mM; BSA 0,1% (p/v); PMSF 1 mM.

Coussin de saccharose: saccharose 60% (p/v); Tris-HCl 10 mM pH 7,4; EGTA 1 mM; BSA 0,1% (p/v).

Solution de Percoll H: Un volume de Percoll pour un volume de Tampon H.

c) Mesure de la quantité de mitochondries extraites

Pour mener à bien les expérimentations, il est important de doser la quantité de mitochondries obtenues. En effet, cette quantité peut-être très variable selon le matériel cellulaire, notamment pour les cellules humaines. Un test de Bradford est donc effectué. Le principe de ce test est basé sur le changement de couleur de bleu de Coomassie en présence de protéines. Cela permet d'évaluer la quantité de protéines présentes par spectrophotométrie à 595 nm.

3. Import d'ADN et extraction

a) Mitochondries de pomme de terre

L'objectif est d'observer s'il y a import d'ADN dans les mitochondries isolées et recombinaison avec l'ADNmt. Pour cela, les mitochondries sont simplement mises en contact avec une quantité d'environ 12 ng d'ADN pour 1 mg de protéines mitochondriales dans du tampon d'import, puis incubées pendant 40 minutes à 25 °C. Selon le cas, on effectue ensuite une post-incubation en conditions de synthèse d'ADN pour favoriser la recombinaison. Après 2 lavages au tampon de lavage + 1 mM EDTA + 1 mM EGTA, on incube 1h30 à 25 °C dans du tampon de réplication, contenant les éléments nécessaires à la synthèse d'ADN. Pour certaines expériences, les mitochondries ont d'abord été incubées 1h à 25°C sous une

agitation de 300 rpm en présence de 100 μ M de bléomycine. Elles ont ensuite subi 2 lavages au tampon de lavage + 1 mM EDTA + 1 mM EGTA, puis ont suivi les phases d'import et de post-incubation.

Les acides nucléiques sont finalement extraits en ajoutant 1 volume de phénol/chloroforme (1 :1), puis en vortexant 2 minutes. Après une centrifugation de 15 min à 13000 *g* la phase aqueuse est prélevée, puis l'on ajoute 2,5 volumes d'éthanol et 0,1 volume d'acétate de sodium 1 M avant de laisser précipiter pour la nuit à -20°C. Pour permettre la quantification exacte de l'ADN et pour éviter les interférences dans les diverses réactions amenant à la PCR inverse, les ARN sont hydrolysés en utilisant un mélange des RNases T1 et A. Les échantillons sont incubés pendant 30 minutes à 25°C. Cette étape est suivie d'une nouvelle extraction au phénol/chloroforme ainsi que d'une précipitation à l'éthanol.

Tampon d'import : saccharose 0,4 M ; phosphate de potassium 40 mM, pH 7.

Tampon de réplication : saccharose 0,33 M ; KCl 90 mM ; Tricine 12 mM; KH₂PO₄ 5 mM ; EDTA 1,2 mM ; MgCl₂ 5 mM ; DTT 2 mM ; ADP 1 mM ; dNTP mix 50 μ M ; succinate 10 mM, pH 7,2.

b) Mitochondries humaines

Les mitochondries purifiées sont mises en contact avec le fragment d'ADN à importer dans le tampon d'import H. On met une quantité d'ADN marqué correspondant à 150000 cpm pour 300 μ g de protéines mitochondriales. L'incubation se déroule à 30°C pendant 2h. Pour éliminer l'ADN non importé, la DNase I est utilisée à 7,5 μ g par μ L de milieu, pendant 20 minutes à 30 °C. L'action de l'enzyme est stoppée par deux lavages avec du tampon de lavage H. Les culots sont repris dans 150 μ L de tampon d'extraction et 150 μ L de phénol/chloroforme (1:1) puis vortexés pendant 2 minutes. Afin d'extraire au maximum l'ADN, on effectue une incubation de 5 minutes à 55°C. Le tout est centrifugé à 13000 *g* et la phase aqueuse est prélevée. L'ADN est ensuite précipité toute la nuit à -20°C avec 2,5 volumes d'éthanol et 0,1 volume d'acétate de sodium 1 M. Pour éliminer les protéines résiduelles, on fait agir la protéinase K (200 μ g/120 μ L) dans du tampon TE pendant 2 heures à 55°C, puis pendant 16 heures à 37°C. Après une nouvelle addition de 200 μ g de protéinase K, on incube encore pendant 2 heures à 55°C. Ces étapes sont suivies d'une nouvelle extraction au phénol/chloroforme ainsi que d'une précipitation à l'éthanol.

Tampon d'import H: mannitol 220 mM; saccharose 70 mM; Tris-HCl 20 mM pH 7,4; EDTA 1 mM; EGTA 1 mM; glutamate 10 mM; malate 1 mM.

Tampon de lavage H: tampon d'import H; EDTA 10 mM; EGTA 10 mM.

Tampon d'extraction: Tris-HCl 10 mM pH 7,5; NaCl 0,15 M; EDTA 10 mM; SDS 1% (p/v).

Tampon TE : Tris-HCl 10 mM pH 7,5 ; EDTA 1 mM.

4. Analyses

a) Extraction et précipitation d'ADN

Pour ne pas inhiber ou interférer dans les réactions de ligation, digestion ou PCR, et afin d'éliminer les tampons et enzymes, l'ADN est ré-extrait après chaque réaction. Pour cela, il est mis en contact avec un volume de phénol/chloroforme (1:1) puis vortexé pendant 2 minutes et centrifugé 15 minutes à 13000 *g*. Afin de précipiter l'ADN, la phase aqueuse est mise à -20°C toute la nuit après addition de 2,5 volumes d'éthanol et 0,1 volume d'acétate de sodium 1 M.

b) Electrophorèse

L'électrophorèse consiste en la migration différentielle des molécules d'ADN selon leur taille, sous la contrainte d'un courant électrique au sein d'une matrice. Les migrations sont effectuées dans des gels d'agarose 1% (p/v) dans du tampon TAE contenant du Bromure d'Ethidium (BET) à 0,5 µg/mL. Avant d'être chargés sur le gel, les échantillons sont préparés en ajoutant du Tampon de charge. Le BET permet la visualisation de l'ADN sur gel par révélation aux UV.

Tampon TAE : Tris 40 mM ; acide acétique 20 mM ; EDTA 1 mM.

Tampon de charge : Tris-HCl 10 mM pH 7,6 ; Bleu de bromophénol 0,3% (v/v) ; glycérol 60% (v/v) ; EDTA 60 mM.

c) Transfert sur membrane pour autoradiographie

Pour l'exposition à un film autoradiographique, les fragments d'ADN sont transférés du gel d'agarose sur une membrane de nylon (Hybond N+, GE Healthcare). Après un bain d'HCl à 0,25 M pendant 15 minutes et un autre bain de NaOH à 0,4 M pendant 20 minutes, le transfert par capillarité a lieu dans cette même solution, pendant 8 à 10 heures.

Une autoradiographie consiste en l'exposition d'un film photographique au produit radioactif, dans notre cas l'ADN. Le rayonnement impressionne le film comme le ferait la lumière. La présence de l'ADN et son taux peuvent donc être observés après développement du film.

d) Clonage et séquençage

Les fragments amplifiés par PCR directe ou inverse sont insérés par ligation dans le vecteur pGEM-T Easy (Invitrogen). L'insertion est réalisée dans le gène lac Z, ce qui permet une sélection blanc/bleu des colonies transformées. En effet, en l'absence de la β -galactosidase codée par le gène lac Z, le 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (X-gal) ajouté sur les boîtes de Petri, ne peut plus être hydrolysé et former un produit chromogène (bleu). Des bactéries *E. coli* DH5 α sont ensuite transformées par choc thermique et cultivées sur milieu contenant de l'ampicilline, du X-Gal et de l'IPTG. Les colonies blanches sont choisies pour extraire les plasmides recombinants grâce au kit Nucleospin Quickpure (Macherey-Nagel). Le principe du kit est de lyser les bactéries puis de précipiter les débris cellulaires ainsi que l'ADN génomique. Le surnageant contenant le plasmide est ensuite passé sur colonne de silice, ce qui permet de retenir le plasmide sur la colonne. Après une étape de lavage, le plasmide est élué dans de l'eau. Le séquençage est effectué par la méthode de Sanger (Sanger *et al.* 1977) à la plateforme de l'IBMP sur un séquenceur ABI3130 XL (Applied Biosystems).

III. Résultats

A. Recombinaison d'un fragment d'ADN dans les mitochondries isolées de pomme de terre

L'objectif était de savoir si un fragment d'ADN composé d'un morceau du gène gfp flanqué de séquences identiques à des régions du génome mitochondrial pouvait se recombiner et s'intégrer au sein de ce génome. On cherche à déterminer l'effet de la longueur des séquences flanquantes sur la recombinaison. En effet, dans l'objectif d'intégrer une construction contenant un promoteur mitochondrial, la maîtrise de l'endroit de la recombinaison est

primordiale. Si le promoteur de la construction se recombine avec le promoteur équivalent déjà existant dans le génome, il y a un risque d'extinction d'un gène mitochondrial, entraînant des dysfonctionnements non attendus. De plus, il pourrait y avoir un conflit entre les séquences flanquantes proprement dites et la séquence du promoteur pour le lieu d'insertion dans le génome. Dans la lignée des résultats déjà obtenus par le laboratoire (Mileshina *et al.* 2011), la recombinaison a d'abord été vérifiée avec des séquences flanquantes respectives de 0,7 et 1,0 kb et avec une substance provoquant des cassures double brin et favorisant donc les recombinaisons: la bléomycine. Puis une construction dans laquelle les séquences mitochondriales flanquant le gène gfp étaient réduites à une longueur de 150 nucléotides a été synthétisée et testée.

1. Recombinaison du fragment nad2/gfp de 2,4 kb

Le fragment de 2,4 kb (Matériel et méthodes : Figure 5) Figure 5: Construction nad2-St/gfp. a été synthétisé puis importé dans des mitochondries de pommes de terre.

a) Analyse en PCR directe

Après isolement des mitochondries, import du fragment et post-incubation, les acides nucléiques ont été extraits des organelles. Une première série d'analyses a reposé sur de la PCR directe. En effet en choisissant judicieusement les bonnes amorces, on peut faire une amplification sélective d'ADN. Pour chaque échantillon, deux couples d'amorces ont été utilisés, un premier couple amplifiant la région en 3' de la séquence gfp et un deuxième, la région en 5' de la séquence gfp (Figure 8). Cela permet de déterminer si le fragment a bien été inséré des deux côtés et d'approfondir l'étude de la recombinaison. Les amorces utilisées étaient :

- Une amorce directe dans l'ADNmt (d1) située en amont de la région mise en jeu dans l'expérience et une amorce réverse (r1), située dans la séquence gfp (Annexe 1).
- Une amorce directe dans la séquence gfp (d2) et une amorce réverse dans l'ADNmt (r2) située en aval de la région mise en jeu dans l'expérience.

On s'attend donc à obtenir des produits de PCR à partir de l'ADN extrait de mitochondries où il y a bien eu recombinaison, mais aucun produit dans les échantillons qui n'ont pas été en contact avec le substrat d'import.

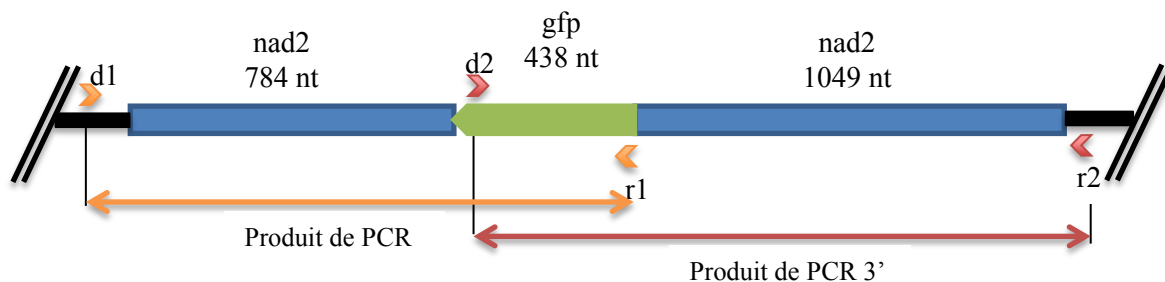


Figure 8 : Construction nad2/gfp recombinaisonnelle dans l'ADNmt.

Position des différentes amorces (Annexe 1) et produits de PCR directe attendus.

(1) Essais sans bléomycine

Les phases d'import, et d'import + post-incubation en conditions de synthèse d'ADN ont été effectuées avec la construction nad2/gfp (2,4 kb). L'ADN de mitochondries ayant subi les mêmes traitements mais en absence du fragment de 2,4 kb a servi de témoin négatif.

Après une PCR directe de chaque échantillon avec chaque couple d'amorces, et une migration sur gel d'agarose voici les résultats obtenus (Figure 9).

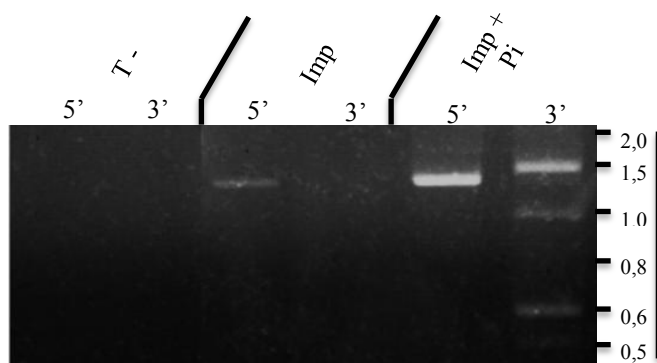


Figure 9 : Electrophorèse des produits de PCR directe sur les ADN issus de mitochondries incubées ou non avec la construction nad2/gfp de 2,4 kb.

T-: incubation et post-incubation sans la construction de 2,4kb ; Imp : import seul de la construction 2,4 kb ; Imp+Pi : import et post-incubation avec la construction 2,4kb.

5' : région 5' ; 3' : région 3'

Comme attendu, aucune bande n'est observée pour le témoin négatif. Il n'y a donc pas eu d'amplification lors de la PCR, ce qui montre la spécificité des couples d'amorces dans ces conditions. Il y a présence d'un léger signal pour la région 5' dans le cas de l'échantillon recueilli après l'étape d'import. Un produit de même taille (1,2 kb), correspondant à la taille attendue, est observé pour les échantillons recueillis après la phase de post-incubation. De plus, c'est seulement après cette phase qu'il y a une amplification de la région 3'. La phase de post-incubation semble donc nécessaire pour obtenir un signal significatif pour cette région. Pour la région 3', un des produits possède la taille attendue (1,5 kb). Cependant on observe la présence d'autres produits plus courts dans la piste. La recombinaison pourrait donc s'effectuer de différentes façons du côté 3' ou des produits non spécifiques sont synthétisés. En effet la PCR directe n'est qu'une première approche car elle n'exclut pas la présence d'artefacts lors de l'amplification.

(2) Essais avec bléomycine

Pour déterminer si l'action de la bléomycine peut favoriser la recombinaison, la molécule a été testée dans l'expérience suivante. La bléomycine est un antibiotique et une substance utilisée dans le traitement des cancers. Ce glycopeptide a un rôle dans le blocage d'enzymes impliquées dans la réparation et clive les molécules d'ADN double brin (Ishida and Takahashi 1975, Akiyama *et al.* 2008). Utilisée à faibles doses, elle pourrait donc favoriser la recombinaison.

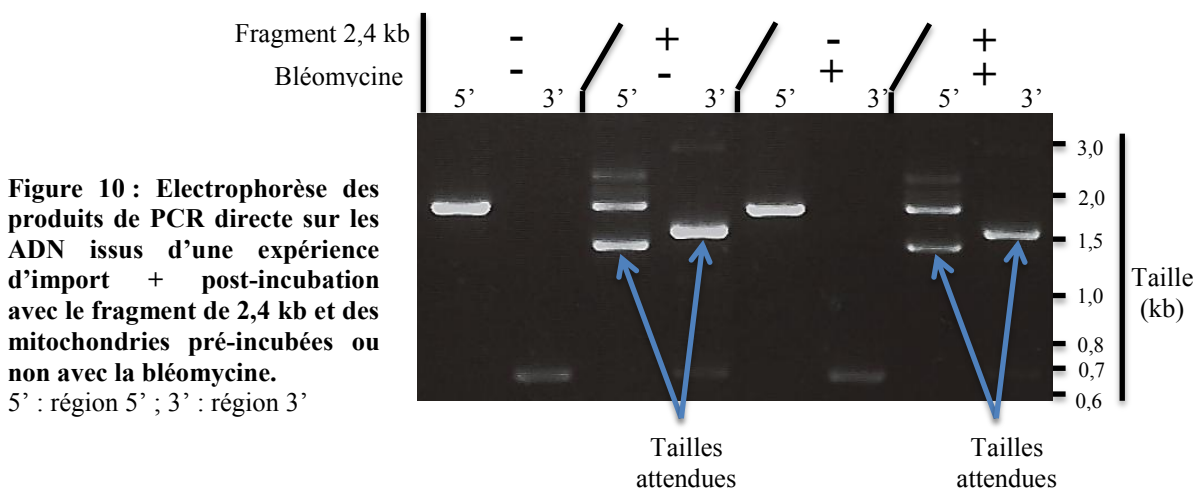


Figure 10 : Electrophorèse des produits de PCR directe sur les ADN issus d'une expérience d'import + post-incubation avec le fragment de 2,4 kb et des mitochondries pré-incubées ou non avec la bléomycine.

5' : région 5' ; 3' : région 3'

Une expérience d'import a donc été menée avec ou sans incubation préalable des mitochondries avec la bléomycine. Pour les essais où la construction nad2/gfp a été ajoutée,

une phase d'import et une phase de post-incubation ont été effectuées. Le témoin doublement négatif n'a pas été incubé en présence de bléomycine ni de fragment à importer. Un autre témoin a subi uniquement l'incubation avec la bléomycine. Les résultats de la PCR directe sont présentés en Figure 10.

Pour les deux échantillons ayant été incubés avec la construction, on observe des bandes correspondantes à la taille attendue (1,2 kb pour la région 5' et 1,5 kb pour la région 3') non visibles pour les témoins. Après séquençage, on peut certifier que ces produits sont bien ceux attendus après un événement de recombinaison et d'intégration dans l'ADNmt. Il ne semble pas y avoir de différences entre les échantillons traités à la bléomycine et les non-traités. En effet le séquençage a confirmé que les produits de PCR de même taille étaient identiques pour les échantillons provenant de mitochondries traitées et non-traitées.

Il y a également des produits aspécifiques pour la région 5' dans le cas de ces deux échantillons, dont l'un de 2 kb que l'on retrouve dans les pistes des témoins correspondants. Les produits ont été séquencés et il s'est avéré que le fragment de 2 kb retrouvé dans tous les échantillons pour la région 5' est un fragment d'ADNmt non recombiné amplifié. En effet, l'amorce d1 a une faible homologie pour une séquence de l'ADNmt non impliquée dans la recombinaison de la construction nad2/gfp et située 2 kb en aval en orientation réverse. Il semblerait donc que cette amorce s'hybride doublement à l'ADNmt, servant à la fois d'amorce directe et d'amorce reverse et permettant la synthèse d'un produit plus grand non attendu.

Un autre fragment, de petite taille, est présent dans les pistes pour la région 3', y compris dans le cas des témoins. Le séquençage a permis de conclure que l'amorce spécifique de la gfp (d2) possède une séquence de 8 nucléotides en commun avec l'ADNmt non recombiné. Cela pourrait être suffisant pour permettre une hybridation à l'ADNmt et la synthèse de produits non spécifiques.

La raison de l'apparition de bandes aspécifiques dans les pistes témoins n'est pas claire. Elles n'étaient en effet pas visibles dans l'expérience précédente. Cela peut s'expliquer par le changement de master-mix utilisé pour la PCR. Une polymérase un peu différente peut être moins sélective et synthétiser plus de produits non spécifiques.

Les observations de PCR directe montrant de produits spécifiques pour les régions 5' et 3' amènent à penser que la recombinaison a bien eu lieu. Cependant la synthèse d'artefacts lors de la PCR n'est pas à exclure. En effet, on peut envisager que la présence de la construction non recombinée aux côtés de l'ADNmt permettrait la synthèse de « méga-primers » ou méga amorces, ce qui, par changement de matrice, pourrait aboutir à la production du fragment attendu sans qu'il y ait eu recombinaison. C'est pourquoi une stratégie de PCR inverse a été élaborée.

A ce stade de l'analyse, il n'y a pas de différences de séquence ou d'intensité de signal entre les produits de PCR obtenus à partir des échantillons traités à la bléomycine et les autres. Les effets attendus étaient essentiellement quantitatifs, la bléomycine devant augmenter la fréquence de recombinaison. Or nos analyses ne sont pas suffisamment quantitatives pour le moment. La concentration en bléomycine lors de l'incubation n'était peut-être pas suffisante et des essais avec une échelle de concentration plus élevée peuvent être envisagés.

b) Analyse en PCR inverse

Pour éliminer la possibilité de formation d'artefacts, un protocole de PCR inverse a été mis en place. Le gène *nad2* de pomme de terre présente plusieurs sites de digestion *MseI*. Le morceau de *gfp*, lorsqu'il est inséré, ajoute 5 sites de digestion. Le principe est donc de faire une digestion avec l'enzyme de restriction *MseI*. On obtient alors divers fragments de différentes tailles, dont l'un contenant la jonction entre le gène *gfp*. On effectue ensuite une religation des fragments sur eux-mêmes pour obtenir des petites molécules d'ADN circulaire. Seuls les échantillons ayant subi une recombinaison pourront être reliés selon la configuration montrée dans la Figure 11.b). En utilisant des amorces divergentes dont l'une, directe, spécifique du gène *gfp*, et l'autre, réverse, située dans l'ADNmt en amont de la région mise en jeu dans l'expérience, l'amplification d'un produit (438 nt) ne sera effective qu'en cas de recombinaison. On peut noter que, dans les échantillons recombinés, il y a également d'autres produits plus longs synthétisés, des fragments *MseI* générés lors de la digestion de l'ADNmt pouvant s'insérer entre les sites considérés au moment de la religation.

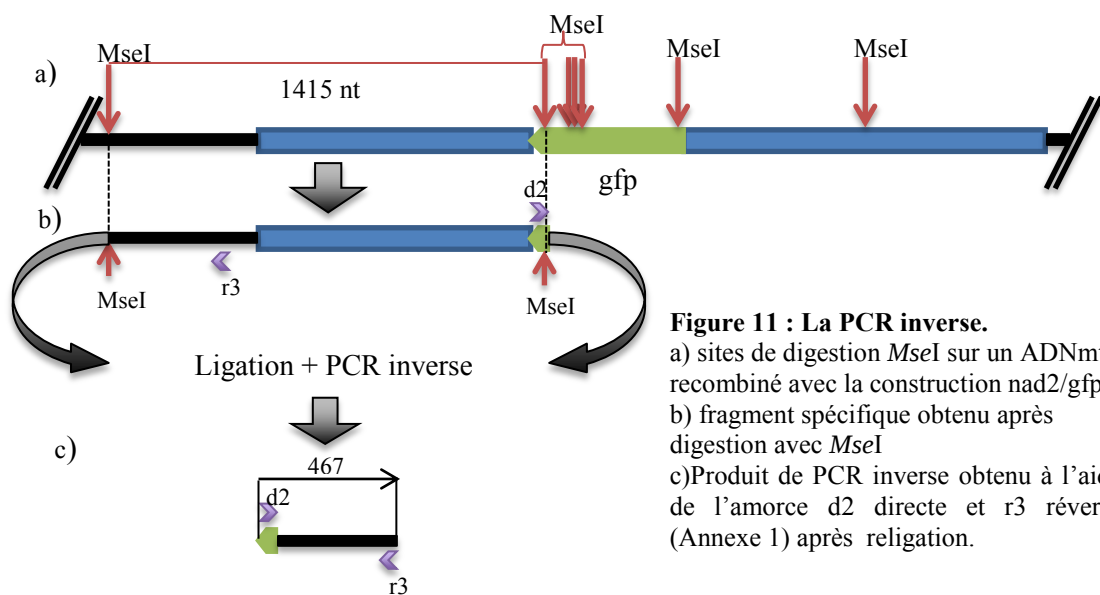


Figure 11 : La PCR inverse.

a) sites de digestion *MseI* sur un ADNmt recombiné avec la construction *nad2/gfp*.

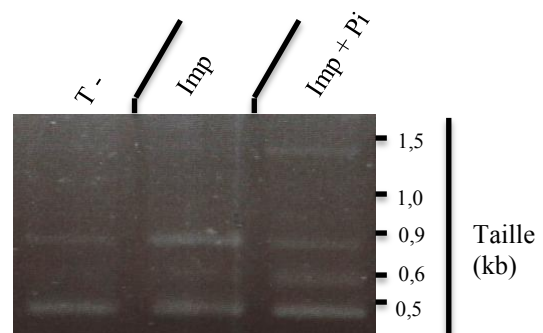
b) fragment spécifique obtenu après digestion avec *MseI*

c) Produit de PCR inverse obtenu à l'aide de l'amorce d2 directe et r3 réverse (Annexe 1) après religation.

Une PCR inverse a donc été réalisée sur les échantillons de la première expérience (sans pré-incubation des mitochondries avec la bléomycine) après digestion *MseI* et religation.

Figure 12 : Électrophorèse des produits de PCR inverse sur l'ADN issu d'une expérience d'import et d'import + post-incubation avec la construction de 2,4 kb après digestion *MseI* et religation.

T- : incubation et post-incubation sans fragment de 2,4kb ;
Imp : import seul avec le fragment *nad2/gfp* de 2,4 kb ;
Imp+Pi : import et post-incubation avec le fragment *nad2/gfp* de 2,4kb.



On observe bien des bandes correspondant à la taille attendue et mais aussi des produits de taille plus grande. Après séquençage, il s'est avéré que nous étions bien en présence de produits spécifiques issus d'ADNmt recombiné avec la construction *nad2/gfp*. On observe également des bandes dans la piste du témoin négatif. Le séquençage a révélé que ces produits

étaient les mêmes que dans les autres pistes et correspondaient aux produits de recombinaison entre le fragment et l'ADNmt.

On peut conclure qu'il y a bien eu recombinaison du fragment de 2,4 kb avec l'ADNmt. Cependant, le témoin a été contaminé et afin de clarifier le résultat, la même expérience sera renouvelée.

Les expériences de PCR inverse sur les ADN issus des échantillons traités à la bléomycine sont également en cours.

La question est maintenant de savoir si l'on obtient aussi de la recombinaison avec une construction aux séquences flanquantes plus courtes et quelles en sont les modalités.

2. Recombinaison du fragment nad2/gfp de 0,7 kb

La construction utilisée est représentée dans la Figure 7 (Matériel et méthodes).

Cette expérience a été menée sans incubation préalable des mitochondries avec la bléomycine. Un témoin a été mené sans la construction. Et comme dans la toute première expérience, un échantillon a été extrait après la phase d'import, et un autre après l'import et la post-incubation.

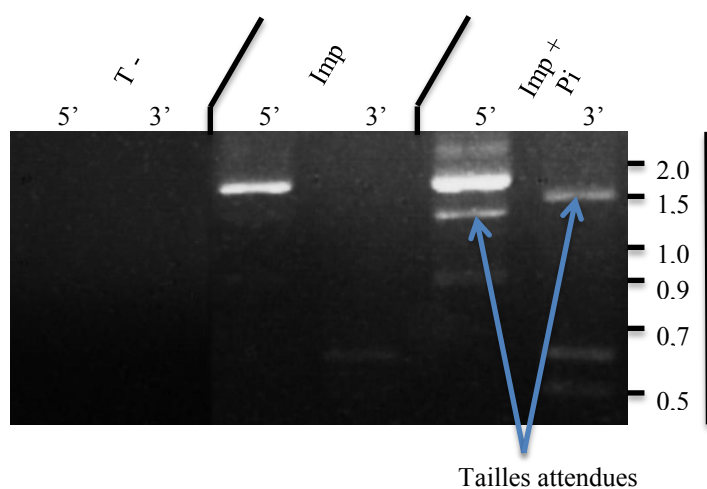


Figure 13 Electrophorèse des produits de PCR directe sur les ADN issus de mitochondries incubées ou non avec la construction nad2/gfp de 0,7 kb.

Taille (kb) T-: incubation et post-incubation sans la construction de 0,7 kb ; Imp: import seul de la construction 0,7 kb; Imp+Pi: import et post-incubation avec la construction 0.7 kb.

Ici encore, c'est après la phase de post-incubation que l'on observe le plus de bandes. On a bien les deux bandes correspondant à la taille attendue pour les régions 5' et 3'. Cependant, la présence de trois autres bandes pour la région 5' ainsi qu'une autre bande pour la région 3' suggère comme précédemment que la recombinaison se fait peut-être de différente façon ou, que l'amplification résulte de la formation de méga-primers. Le signal pour la région 3' n'apparaît qu'après la post-incubation. Or les quantités de construction et d'ADNmt dans la réaction sont les mêmes pour les échantillons import et import + post-incubation. On peut donc penser que s'il devait y avoir formation de méga-primers, et donc d'artefacts, ce serait le cas pour les deux échantillons. Il est donc fort probable qu'il y ait eu recombinaison durant la phase de post-incubation, bien que les séquences de la construction identiques à l'ADNmt aient été ramenées à seulement 150 nucléotides.

Pour plus d'informations, un séquençage des produits de PCR est en cours. Une PCR inverse est également en cours de réalisation, pour confirmer la recombinaison du fragment.

B. Import d'ADN dans des mitochondries isolées de cellules humaines.

Le but au cours des manipulations sur les mitochondries de cellules humaines, était de tenter l'import de l'ADNmt dans son intégralité (16,5 kb), toujours dans l'objectif lointain de rétablir l'équilibre entre ADNmt muté et ADNmt sauvage chez les patients atteints de maladies mitochondriales. Le second objectif serait d'importer des fragments plus petits mais renfermant les origines de réplication, et d'obtenir leur circularisation dans les mitochondries afin qu'ils soient maintenus, répliqués et donc fonctionnels *in vivo*. Nous avons donc d'abord testé l'import d'une petite molécule d'ADN. Puis nous avons tenté de synthétiser entièrement l'ADNmt par PCR, de le marquer radioactivement et de l'importer. En parallèle, d'autres expériences ont été menées sur la circularisation de petits fragments après import dans la mitochondrie.

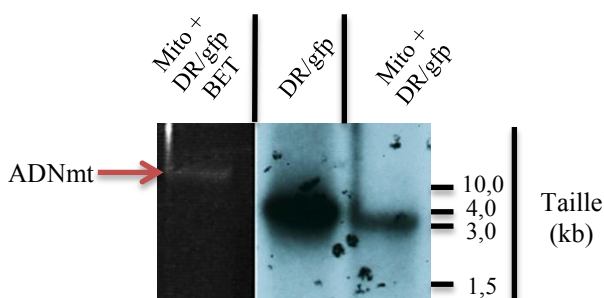
1. Import du fragment DR/gfp (3,5 kb)

Pour tester l'import qui avait déjà été démontré auparavant (Koulintchenko *et al.* 2006, Ibrahim *et al.* 2011) et affiner la méthode d'extraction, des essais ont été effectués avec le fragment DR/gfp. Ce fragment est un morceau du gène gfp flanqué de deux séquences de la région répétée DR de l'ADNmt du maïs. Il est représenté en Figure 6 (Matériel et méthodes). Ce fragment a été marqué radioactivement puis importé dans les mitochondries extraites de cellules humaines. Après extraction de l'ADN et migration sur gel d'agarose, une première image a été prise aux UV. Après transfert sur membrane de nylon, une image autoradiographique révélant la radioactivité a été prise.

Figure 14 : Import de la construction DR/gfp marquée dans les mitochondries humaines.

Mito+ DR/gfp : électrophorèse d'ADN extrait de mitochondries incubées avec la construction DR/gfp (piste gauche : BET, image aux UV ; piste droite : autoradiographie).

DR/gfp : électrophorèse de la construction marquée seule (autoradiographie).



La piste Mito + DR/gfp BET, révélée aux UV montre que l'ADNmt est bien présent et a bien été extrait. L'image autoradiographique de cette même piste montre une bande plus basse correspondant à 3,5 kb, c'est-à-dire la taille de la construction DR/gfp marquée. On peut donc conclure que l'ADN a bien été importé au sein des mitochondries humaines. L'extraction et la digestion à la protéinase K ont été suffisamment efficaces pour éliminer les interactions résiduelles pouvant mener à une co-migration de l'ADN importé avec l'ADNmt. Une fois vérifié l'import d'un fragment de taille modérée, les essais sur l'ADNmt, plus grand, ont pu être entamés.

2. Import de l'ADNmt entier linéaire (16,5 kb)

L'import dans les mitochondries humaines d'une grande molécule d'ADN (11,6 kb) issue de l'ADNmt de *Brassica rapa* (navet) a déjà été démontré auparavant (Ibrahim *et al.* 2011). L'objectif est maintenant de tester l'import avec l'ADNmt entier.

a) Synthèse et marquage de l'ADNmt entier

L'ADNmt humain est circulaire. Or les mitochondries n'importent que de l'ADN linéaire. De plus, pour pouvoir observer les résultats, le substrat d'import doit être marqué. Cependant l'amplification d'un si gros ADN n'est pas courante. En premier lieu, de l'ADNmt humain a été extrait de mitochondries de cellules humaines pour pouvoir servir de matrice à la réaction d'amplification (Figure 15.a). Une polymérase « long range » a été utilisée avec les amorces DR3 et 12SRN5 (Annexe1) et, après optimisation des paramètres de la PCR, un produit a été obtenu (Figure 15.b).

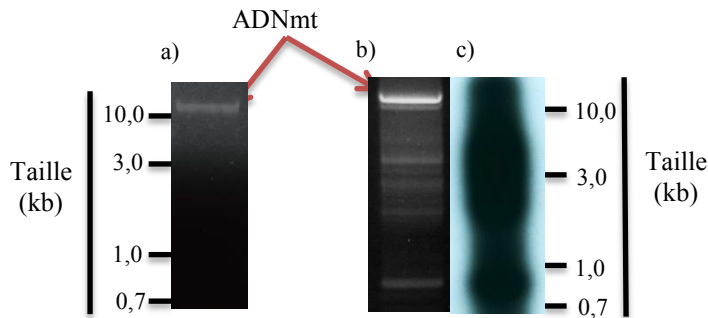


Figure 15 : Amplification et marquage de l'ADNmt humain

a) Electrophorèse de l'ADNmt extrait de mitochondries HepG2 (image aux UV).

b) Electrophorèse du produit de la PCR « long range » (image aux UV).

c) Electrophorèse du produit de PCR « long range » marqué (autoradiographie).

Le produit de PCR obtenu présente bien une bande principale correspondant à l'ADNmt. Cependant, on observe la présence de nombreux autres produits plus courts. En effet, le produit à amplifier étant de grande taille, l'élongation ne s'effectue pas toujours jusqu'au bout lors de la PCR, malgré un temps d'élongation de 15 à 20 minutes.

Dans un deuxième temps, un marquage a été réalisé sur le produit de PCR en utilisant la même polymérase « long range » pour un cycle d'amplification supplémentaire avec une élongation en deux phases : 30 minutes en présence de $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ sans dCTP non-radioactif, puis 30 minutes additionnelles après ajout de dCTP non-radioactif. L'autoradiographie après marquage et migration sur gel montre la présence d'ADNmt radioactif. Cependant, on observe également la présence de nombreux autres produits marqués plus courts. Tous les produits présents dans la PCR initiale semblent avoir été marqués. Un autre protocole de marquage a été testé, en introduisant de l' $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ dès le premier cycle d'amplification à partir de l'ADNmt. Cela ne s'est pas avéré efficace. L'essai d'autres enzymes « long range » pourrait peut-être permettre d'améliorer les étapes de synthèse et de marquage.

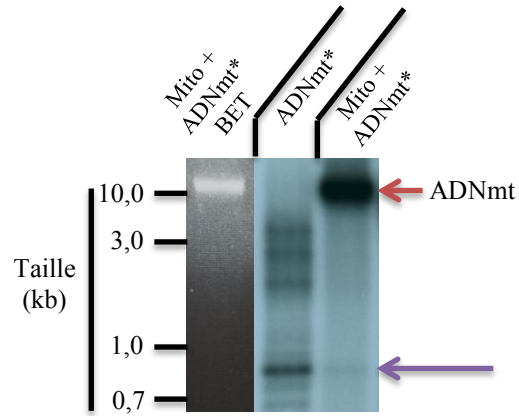
b) Import

L'import a été testé avec l'ADN amplifié et marqué. Puis l'ADN extrait de la fraction mitochondriale a été déposé sur gel d'agarose pour une électrophorèse comme le montre la Figure 16.

L'image aux UV permet de dire que l'ADNmt d'origine est bien intact et présent. On observe d'autre part sur l'autoradiographie un signal correspondant à la taille de l'ADNmt. D'autres bandes reflétant des fragments de taille plus faible présents dans le marquage, peuvent également être observées, comme celle pointée par la flèche. On peut supposer que l'ADNmt linéaire de 16,5 kb a bien été importé dans les mitochondries avec potentiellement une certaine sélectivité. En effet, le profil du marquage se retrouve bien dans l'échantillon d'import, mais la plus grande quantité de radioactivité est retrouvée là où migre l'ADNmt.

Figure 16 : Import d'ADNmt linéaire marqué dans les mitochondries humaines.

Mito+ADNmt* : électrophorèse de l'ADN des mitochondries mises en contact avec l'ADNmt marqué (1.10^5 cpm déposés) (piste gauche : BET, image aux UV ; piste droite : autoradiographie).
ADNmt* : électrophorèse de l'ADNmt linéaire marqué ayant servi à l'import (1.10^4 cpm déposés) (autoradiographie)



Cependant, l'ADN à importer ayant la même taille que l'ADNmt, il est difficile de dire si la radioactivité provient en effet de l'ADN de 16,5 kb marqué ou de fragments marqués plus petits co-migrant avec l'ADNmt endogène. En effet, l'ADN importé est de provenance humaine et il est donc peut-être plus susceptible d'être intégré dans les complexes protéiques entourant l'ADNmt que les constructions provenant d'ADNmt végétal. Il pourrait donc être plus difficile à ré-extraire malgré l'action de la protéinase K. Ceci expliquerait pourquoi l'on retrouve autant de radioactivité au niveau où migre l'ADNmt. De plus, ces fragments, selon leur séquence, peuvent posséder la D-Loop, comme tout ADNmt humain. Dans la littérature, la D-Loop est une région particulière sujette à invasion de brin et s'associant facilement pour le contrôle de l'expression et la réplication. On pourrait alors imaginer des interactions spécifiques entre les régions D-loop des différents ADN.

Pour répondre à ces questions, des expériences complémentaires ont été réalisées, impliquant l'import de séquences d'ADNmt humain de petite ou de grande taille, mais inférieure à 16,5 kb, et avec ou sans la D-Loop.

3. Import d'un fragment linéaire d'ADNmt avec ou sans D-loop

Lors de travaux antérieurs, des problèmes dus à l'extraction avaient été observés (Ibrahim *et al.* 2011). En effet, l'ADNmt humain est condensé dans les nucléoïdes, où il est empaqueté avec des protéines. Si ces protéines ne sont pas suffisamment dégradées, l'ensemble des ADN reste associé et co-migre lors de l'électrophorèse. Il a donc été choisi de tester l'import d'un grand fragment d'ADNmt linéaire de 9 kb, de taille inférieure à 16,5 kb. En effet dans l'expérience précédente, il était impossible de dire sur le gel, si l'ADN importé était associé ou non avec l'ADNmt endogène car ils avaient de toute façon la même taille. De plus, pour voir si les fragments étaient importés sélectivement selon la taille, un fragment beaucoup plus petit d'ADNmt de 2 kb sera testé.

La D-Loop est une portion de l'ADNmt régissant la transcription et la réplication. C'est une région apte à former un triple brin. On peut donc se poser la question de l'existence d'interactions spécifiques au niveau de la D-Loop. C'est pourquoi le fragment de 9 kb a été synthétisé avec ou sans la région D-Loop dans la séquence, puis marqué, grâce à la polymérase « long range » et aux couples d'amorce 16Smut2sh/ND3-5 et 12SRN5/ND3-3 respectivement (Annexe 1) (Figure 17).

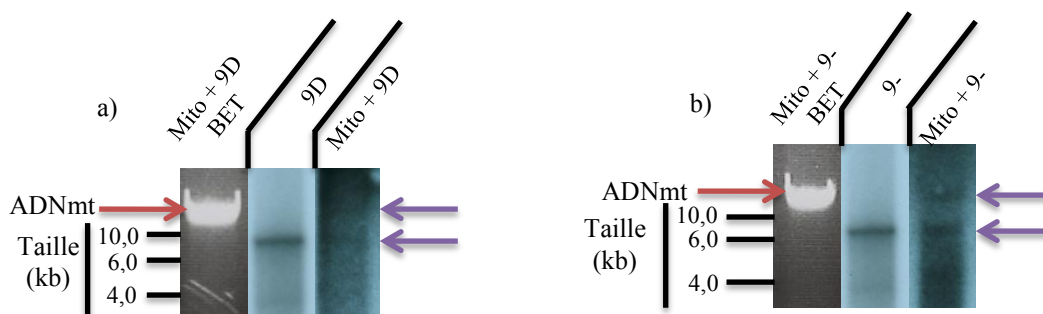


Figure 17 : Import d'une séquence linéaire d'ADNmt marquée de 9 kb dans les mitochondries humaines.

Mito+ : électrophorèse de l'ADN des mitochondries mises en contact avec le fragment marqué ;
(piste de gauche : BET, visualisation aux UV ; piste de droite : autoradiographie)

9D et 9- : électrophorèse des fragments avec ou sans D-Loop, respectivement (autoradiographie).

a) Import de la séquence de 9 kb avec D-Loop.

b) Import de la séquence de 9kb sans D-Loop

Dans les deux cas, on observe une bande correspondant à la taille du fragment marqué. On observe également de la radioactivité au niveau de l'ADNmt. Cependant, la répartition de la radioactivité entre ces deux bandes (indiquées par des flèches dans la Figure 17) diffère selon que le fragment possède la D-Loop ou non. En effet, le signal à la hauteur de 9 kb semble plus fort pour l'échantillon d'import sans D-Loop. Au contraire, il y a plus de radioactivité au niveau de l'ADNmt pour l'échantillon d'import avec D-Loop.

On peut donc confirmer les études précédentes montrant l'import d'ADN de grande taille dans les mitochondries humaines. L'extraction semble ne pas encore bien séparer les ADN car il reste de la radioactivité associée à l'ADNmt pour l'import du fragment sans D-Loop. Cependant, l'on observe tout de même une bande correspondant à la taille du fragment importé. Le fragment possédant la D-Loop semble plus en interaction avec l'ADNmt que celui qui ne la possède pas. Ceci sous-entendrait la présence d'interactions spécifiques entre le fragment importé et l'ADNmt, comme suggéré précédemment (Boesch *et al.* 2011).

Le comportement de fragments possédant la D-Loop est donc à approfondir. D'autre part, la comparaison avec un fragment d'ADNmt de petite taille est encore à faire.

4. Circularisation d'un fragment d'ADN après import

Jusqu'ici, les études étaient basées sur l'import d'ADN linéaire dans les mitochondries isolées humaines. Or le but serait de maintenir ces molécules dans la mitochondrie une fois importées et de permettre leur expression. L'ADNmt humain est exprimé et répliqué uniquement sous la forme circulaire. Or les molécules circulaires sont impossibles à importer efficacement. Il a donc fallu réfléchir à une stratégie favorisant la circularisation post-import. On a donc imaginé la création de bouts collants de 13 nucléotides aux extrémités de la construction DR/gfp, dont l'import a été montré auparavant. De plus, ces 13 nucléotides (inverted repeat IR) n'ont pas été choisis au hasard et correspondent à une séquence fréquemment retrouvée à la jonction de délétion dans l'ADNmt. On suppose donc que ce motif de séquence est reconnu par les mécanismes de ligation de l'ADN dans la mitochondrie. Pour générer les bouts collants, on insère un uracile dans les amorces servant à amplifier le fragment. L'utilisation de l'enzyme Uracil-Specific Excision Reagent (USER) (Biolabs), mélange d'uracile-ADN glycosylase et d'endonuclease VIII bactériennes, permettra d'exciser le nucléotide U, la libération du fragment simple brin de 13 nucléotides générant ensuite le bout collant (Figure 18).

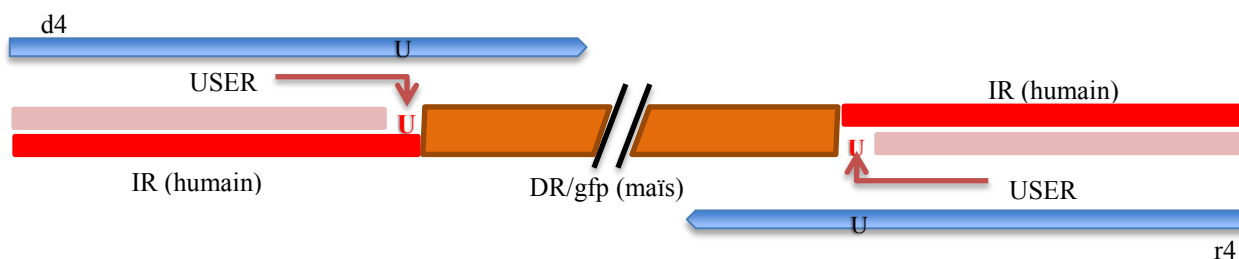


Figure 18 : Préparation d'un fragment DR/gfp à bouts collants.

d4 et r4 : amorces directe et réverse utilisées pour l'amplification ; fragments en roses : fragments pouvant être détachés après l'action de l'enzyme USER.

On a donc d'abord synthétisé le fragment DR/gfp avec, aux extrémités, le motif spécifique de 13 nucléotides mais sans l'uracile. L'import de ce substrat dans les mitochondries humaines a été testé et a fonctionné comme dans la toute première expérience.

Beaucoup de conditions et d'enzymes ont ensuite été testées pour tenter de synthétiser le fragment DR/gfp contenant les 13 nucléotides avec l'uracile. Or, à cause de la présence d'uracile dans l'amorce, la synthèse n'a réussi qu'une fois et tous les marquages ont échoué. Il reste donc du travail pour préparer ce substrat et essayer d'obtenir son import dans les mitochondries, ainsi que sa circularisation post-import. Cette voie ouvre cependant de nombreuses perspectives.

IV. Conclusions et perspectives

En agronomie, dans une optique d'optimisation du rendement, la sélection variétale est importante. Lorsque les agriculteurs achètent leurs semences, ils attendent qu'elles donnent le rendement prévu et qu'elles aient les caractéristiques de croissances annoncées. Pour le semencier, la sélection variétale d'hybrides peut prendre des années et elle demande du travail. En effet pour qu'une variété A soit fécondée uniquement par la B, la castration de la variété A est indispensable pour éviter les autofécondations et avoir la maîtrise totale de la reproduction. Or cette castration a un coût en termes de main d'œuvre et de temps. L'utilisation de variétés dont les fleurs mâles sont déjà stériles serait donc un avantage pratique et économique. La CMS existe déjà dans la nature et les gènes mitochondriaux responsables ont été identifiés dans un certain nombre de cas (Budar et Pelletier, 2001 ; Chase, 2007 ; Kmiec *et al.* 2006 ; Pelletier et Budar, 2007). Dans cette optique, l'utilisation d'un transgène mitochondrial provoquant la stérilité des fleurs mâles peut être envisagée. Cependant, pour l'instant, la transformation des mitochondries n'est pas accessible par les approches conventionnelles permettant la transformation nucléaire ou chloroplastique. Mais avant toutes choses, les modalités de recombinaison et d'insertion d'une séquence exogène dans l'ADNmt sont à définir. Même si le but final est de pouvoir transformer les organelles *in vivo*, les études menées ici avec des mitochondries isolées apportent des données importantes. Les premiers résultats montrent que l'on peut importer un fragment d'ADN dans les organelles des plantes et le recombinaison avec l'ADNmt. L'utilisation d'un morceau du gène de la gfp, qui n'est pas un gène mitochondrial, a permis un meilleur suivi de la recombinaison. Cependant, cela reste une première approche. La démarche à terme est d'intégrer une construction contenant un gène qui engendre une CMS, lié à un promoteur mitochondrial, ce qui permettrait son expression. Pour diriger la localisation de la recombinaison dans l'ADNmt, des séquences mitochondriales adéquates ont été disposées de part et d'autre du fragment à insérer. On peut imaginer que la présence d'un promoteur mitochondrial dans la construction puisse entraîner des recombinaisons non désirées avec le promoteur équivalent dans l'ADNmt. Dans notre étude, si le fragment de 0,7 kb, contenant des séquences

flanquantes mitochondriales courtes s'avère vraiment pouvoir se recombinaison avec l'ADNmt, alors ce problème risquera effectivement de se poser lors de la transformation. La prochaine étape sera de synthétiser un fragment contenant l'orf 138, caractéristique de la CMS *Ogura*, flanqué de séquences mitochondriales et de tester la recombinaison *in organello*. Si les résultats sont positifs, on pourra alors rajouter un promoteur dans la construction. A plus long terme, la transformation de mitochondries *in vivo* pourra être envisagée, différents types de vésicules mitochondriotropiques liant l'ADN ayant été proposées dans la littérature (Niazi *et al.* 2011).

Avec l'apparition d'outils permettant d'étudier le génome, beaucoup de progrès ont été réalisés ces dernières années en médecine humaine. De nombreux gènes nucléaires responsables de maladies héréditaires ont pu être identifiés et des méthodes de thérapie génique ont pu être mises au point. En parallèle, l'étude du génome mitochondrial a révélé que les mutations dans l'ADNmt humain provoquent des maladies neuromusculaires graves. Au fil du temps, de nombreuses maladies ou dégénérescences ont été identifiées comme ayant une origine génétique mitochondriale. L'ADNmt humain, circulaire, et présent en copies multiples dans l'organelle est donc bien connu. Il a également été identifié que c'était la proportion d'ADNmt muté par rapport à l'ADNmt sauvage qui déterminait le déclenchement et la sévérité des maladies. Importer des copies non-mutées du gène impliqué, les maintenir et les exprimer permettrait une thérapie génique. Cependant, tout comme pour les plantes, la transformation mitochondriale n'est pas accessible chez les mammifères. De plus, une fois importé, un fragment d'ADN sera exprimé et répliqué uniquement s'il possède un promoteur mitochondrial de la D-Loop, ainsi que les origines de répllication, et s'il est circulaire. Des travaux menés sur des mitochondries isolées issues de cultures cellulaires humaines ou de mammifères ont montré que l'import d'ADN linéaire était possible (Koulintchenko *et al.* 2006). Lors de cette étude, nous avons importé avec succès de l'ADNmt linéaire entier et des expériences sont en cours dans le but d'étudier l'influence de la présence de la D-Loop dans l'ADN exogène pour la mise en place d'interactions spécifiques avec l'ADNmt. S'il s'avère que ces interactions ont lieu, cela confirmerait que l'ADN exogène rejoint bien les nucléoïdes mitochondriaux et s'intègre dans les processus génétiques des organelles. Les expériences de circularisation peuvent également beaucoup apporter. Si les essais avec le fragment modèle DR/gfp de maïs sont un succès, on pourra tester la circularisation avec des portions d'ADNmt humain contenant un gène donné, voire avec l'ADNmt entier. De nombreux mécanismes et stratégies sont à l'étude pour pouvoir transporter de l'ADN à travers la membrane plasmique, jusqu'à la surface ou à l'intérieur des mitochondries notamment des systèmes de vésicules (Niazi *et al.* 2012). Ainsi les perspectives se précisent pour l'élaboration de méthodes thérapeutiques destinées à soigner les maladies mitochondriales aujourd'hui incurables.

BIBLIOGRAPHIE

- Akiyama, Y., Ma, Q., Edgar, E., Laikhter, A., and Hecht, S.M. (2008). Identification of strong DNA binding motifs for bleomycin. *J. Am. Chem. Soc.* 130, 9650–9651.
- Alverson, A.J., Rice, D.W., Dickinson, S., Barry, K., and Palmer, J.D. (2011). Origins and recombination of the bacterial-sized multichromosomal mitochondrial genome of cucumber. *Plant Cell* 23, 2499–2513.
- Boesch, P., Ibrahim, N., Dietrich, A., and Lightowlers, R.N. (2010). Membrane association of mitochondrial DNA facilitates base excision repair in mammalian mitochondria. *Nucleic Acids Res.* 38, 1478–1488.
- Bonnefoy, N., Remacle, C., and Fox, T.D. (2007). Genetic transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and *Chlamydomonas reinhardtii* mitochondria. *Methods Cell Biol.* 80, 525–548.
- Budar, F., and Pelletier, G. (2001). Male sterility in plants: occurrence, determinism, significance and use. *C. R. Acad. Sci. III, Sci. Vie* 324, 543–550.
- Chase, C.D. (2007). Cytoplasmic male sterility: a window to the world of plant mitochondrial-nuclear interactions. *Trends Genet.* 23, 81–90.
- Clark, M.A., and Shay, J.W. (1982). Mitochondrial transformation of mammalian cells. *Nature* 295, 605–607.
- Flierl, A., Jackson, C., Cottrell, B., Murdock, D., Seibel, P., and Wallace, D.C. (2003). Targeted delivery of DNA to the mitochondrial compartment via import sequence-conjugated peptide nucleic acid. *Mol. Ther.* 7, 550–557.
- Greaves, L.C., Reeve, A.K., Taylor, R.W., and Turnbull, D.M. (2012). Mitochondrial DNA and disease. *J. Pathol.* 226, 274–286.
- Handa, H. (2003). The complete nucleotide sequence and RNA editing content of the mitochondrial genome of rapeseed (*Brassica napus* L.): comparative analysis of the mitochondrial genomes of rapeseed and *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res.* 31, 5907–5916.
- Havey, M.J., Lilly, J.W., Bohanec, B., Bartoszewski, G., and Malepszy, S. (2002). Cucumber: a model angiosperm for mitochondrial transformation? *J. Appl. Genet.* 43, 1–17.
- Ibrahim, N., Handa, H., Cosset, A., Koulintchenko, M., Konstantinov, Y., Lightowlers, R.N., Dietrich, A., and Weber-Lotfi, F. (2011). DNA delivery to mitochondria: sequence specificity and energy enhancement. *Pharm. Res.* 28, 2871–2882.
- Ishida, R., and Takahashi, T. (1975). Increased DNA chain breakage by combined action of bleomycin and superoxide radical. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 66, 1432–1438.
- Iyer, S., Thomas, R.R., Portell, F.R., Dunham, L.D., Quigley, C.K., and Bennett, J.P., Jr (2009). Recombinant mitochondrial transcription factor A with N-terminal mitochondrial transduction domain increases respiration and mitochondrial gene expression. *Mitochondrion* 9, 196–203.
- Karpova, O.V., Kuzmin, E.V., Elthon, T.E., and Newton, K.J. (2002). Differential expression of alternative oxidase genes in maize mitochondrial mutants. *Plant Cell* 14, 3271–3284.
- Kmiec, B., Woloszyńska, M., and Janska, H. (2006). Heteroplasmy as a common state of mitochondrial genetic information in plants and animals. *Curr. Genet.* 50, 149–159.
- Koulintchenko, M., Konstantinov, Y., and Dietrich, A. (2003). Plant mitochondria actively import DNA via the permeability transition pore complex. *EMBO J.* 22, 1245–1254.
- Koulintchenko, M., Temperley, R.J., Mason, P.A., Dietrich, A., and Lightowlers, R.N. (2006). Natural competence of mammalian mitochondria allows the molecular investigation of mitochondrial gene

expression. *Hum. Mol. Genet.* **15**, 143–154.

Kubo, T., and Newton, K.J. (2008). Angiosperm mitochondrial genomes and mutations. *Mitochondrion* **8**, 5–14.

Lyrawati, D., Trounson, A., and Cram, D. (2011). Expression of GFP in the mitochondrial compartment using DQAsome-mediated delivery of an artificial mini-mitochondrial genome. *Pharm. Res.* **28**, 2848–2862.

Mileshina, D., Koulintchenko, M., Konstantinov, Y., and Dietrich, A. (2011). Transfection of plant mitochondria and in organello gene integration. *Nucleic Acids Res.* **39**, e115.

Pelletier, G., and Budar, F. (2007). The molecular biology of cytoplasmically inherited male sterility and prospects for its engineering. *Curr. Opin. Biotechnol.* **18**, 121–125.

Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74**, 5463–5467.

Schaefer, A.M., Taylor, R.W., Turnbull, D.M., and Chinnery, P.F. (2004). The epidemiology of mitochondrial disorders--past, present and future. *Biochim. Biophys. Acta* **1659**, 115–120.

Schmitz-Linneweber, C., and Small, I. (2008). Pentatricopeptide repeat proteins: a socket set for organelle gene expression. *Trends Plant Sci.* **13**, 663–670.

Smirnov, A.V., Entelis, N.S., Krashennnikov, I.A., Martin, R., and Tarassov, I.A. (2008). Specific features of 5S rRNA structure - its interactions with macromolecules and possible functions. *Biochemistry Mosc.* **73**, 1418–1437.

Taylor, R.W., and Turnbull, D.M. (2005). Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nat. Rev. Genet.* **6**, 389–402.

Tuppen, H.A.L., Blakely, E.L., Turnbull, D.M., and Taylor, R.W. (2010). Mitochondrial DNA mutations and human disease. *Biochim. Biophys. Acta* **1797**, 113–128.

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.

Val, R., Wyszko, E., Valentin, C., Szymanski, M., Cosset, A., Alioua, M., Dreher, T.W., Barciszewski, J., and Dietrich, A. (2011). Organelle trafficking of chimeric ribozymes and genetic manipulation of mitochondria. *Nucleic Acids Res.* **39**, 9262–9274.

Wagle, M.A., Martinville, L.E., and D'Souza, G.G.M. (2011). The utility of an isolated mitochondrial fraction in the preparation of liposomes for the specific delivery of bioactives to mitochondria in live mammalian cells. *Pharm. Res.* **28**, 2790–2796.

Wang, G., Chen, H.-W., Oktay, Y., Zhang, J., Allen, E.L., Smith, G.M., Fan, K.C., Hong, J.S., French, S.W., McCaffery, J.M., et al. (2010). PNPASE regulates RNA import into mitochondria. *Cell* **142**, 456–467.

Wang, G., Shimada, E., Zhang, J., Hong, J.S., Smith, G.M., Teitell, M.A., and Koehler, C.M. (2012). Correcting human mitochondrial mutations with targeted RNA import. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**, 4840–4845.

Yamada, Y., and Harashima, H. (2012). Delivery of bioactive molecules to the mitochondrial genome using a membrane-fusing, liposome-based carrier, DF-MITO-Porter. *Biomaterials* **33**, 1589–1595.

Zeviani, M., and Di Donato, S. (2004). Mitochondrial disorders. *Brain* **127**, 2153–2172.

Zhou, J., Liu, L., and Chen, J. (2010). Mitochondrial DNA heteroplasmy in *Candida glabrata* after mitochondrial transformation. *Eukaryotic Cell* **9**, 806–814.

Annexe 1 : Liste des amorces utilisées lors des différentes expériences.

Nom	Séquence 5' -> 3'
nad2St5	AGCGGCGAATTTCAAACCTTGTG
nad2St3	CAATGGATCGTGACAAGTCGTT
d1: nest-dir-St5	GATAACCACGTCTCTGCTAGGCA
r2: nad2-ex-ST-3a	CCTCTTTCATTACTTCATTCTTT
r1: gfp-int-5	CGTATGTTGCATCACCTTCAC
d2: gfp-int-3	CTAGTTGAACGCTTCCATCTTC
r3: nad100upnew	AGCGGCGAATTTCAAACCTTGTG
nad150FW	CTTACTTCCTAGCCCCAGTG
nad150REV	ATGGATTTCTATAGTGTTGTAGC
UniFW	GTAAAACGACGGCCAGT
UniREV	CAGGAAACAGCTATGAC
M13FW	AACCTCCCTCACCAGTAAAACGACGGCCAGT
M13REV	ATGGTGAGGGAGGTCAGGAAACAGCTATGAC
d4: MU13FW	AACCTCCCTCACCAUGTAAAACGACGGCCAGT
r4: MU13REV	ATGGTGAGGGAGGTUCAGGAAACAGCTATGAC
DR3	GTACAACTAGTGTTTATGGGGTGATGTGAGC
12SRN5	AGCATGGATCCGAGGAGCCTGTTCTGTAATCG
ND3-5	AGCATAAGCTTTCAACACCCTCCTAGCC
ND3-3	GTACACTCGAGGTTAGTTGTTTGTAGGGC
16Smut2sh	GTCCTGATCCAACGTCGAGGTCG

Annexe 2: Produits de PCR directe lors de l'amplification d'ADNmt recombiné avec la construction nad2/gfp a) en 5', avec les amorces d1/r1 ; b) en 3' avec les amorces d2/r2. Les séquences de la gfp sont représentées en vert.

a

d1 →

GATAAACACGTCCTCTGCTAGGCA GCGTGTGGAATGGCCGAGAGCGGACCTTTTGGATATATAATCCAAGTCGAGAGTAGAGTTACAG
GAAAAGCCGTCGATGGAACCAACTTTCACGTTCCGTTTCAGAGAGCACTTTTTCGTTGAGAATTCCTCGTTCCCTTTCGTGTGAAT
TCCTCCAGCGGGCGAATTTCAAACCTTGTGGGGCCCTATCTATTCCATCTCTCGAGCCCCGAAGAAAACCCCTACCTTCGGACTCCATA
TATCTTTTGACTCTATATATGTGGGCACCTGATATCTATGAGGGTTCACCCACCCGGTTACAGCATTCCTTTCTATTGCGCCTAAAA
TCTCTATTTCTGCTAATATTTACAGTGTTTCTATTTATGGTTCTTATGGAGCTACATTGCAACAAATCTCTTTTCTGCAGCATTGC
TTCTATGATCTTAGGAGCACGGG CCGCCATGGCCCAAACGAAAGTAAAAAGACTTCTAGCTCATAGTTCAATTGGACATGTAGGTTA
TATTTCGTAAGTTTCTCATGTGGAACCATAGAAGGAATTCATCACTACTAATTGGTATCTTTATTTATGCATCAATGACGATAGAT
GCATTCGCCATAGTTTTCAGATTACGGCAAACCCGTGTCAAATATATAGCTGATTTGGGCGCTCTAGCCAAAACGAATCCTATTTTGG
CTATTACCTTCTCCATTACTATGTTCTCATACGAGGAATACCCCGTTAGCCGGCTTTGTAGCAAATCTATTTGTCTTCGCCGC
TTTGGGTTGTGGGGCTTACTTCTAGCCCCAGTGGGAGTAGTACTAGCGTTATAGGTCGTTGGGCGGCCGAAGGTTGCCACGAGTA
AGTAAGTTTGGGGACCGAAGGCAGTTCTCCGTGCACCGGACAGTAGCTTACCGAATCAGTTGCGACACGGATGGGAATGCATGCT
AGTTGAACGCTTCCATCTTCAATGTTGTGTCTAATTTTGAAGTTAACTTTGATTCCATTCTTTTGTGTTGCTGCCATGATGTATACAT
TGTGTGAGTTATAGTTGATTCCAAATTTGTGTCCAAGAATGTTCCATCTTCTTTAAATCAATGCCTTTTAACTCGATTCTATTAAC
AAGGGTATCACCTTCAAACCTTGACTTCAGCACGTGTCTTGTAGTTCCCGTCATCTTTGAAAAATATAGTTCTTTCTGTACATAACCT
TCGGGCATGGCACTCTTGAAGAAAGTCATGCTGTTTCATATGATCTGGGTATCTTGAAGAGCATTGAACACCATTAAGTAAGAGTAGTGA
CAAGTGTTGGCCAAGGAACAGGTAGTTTTCAGTAGTGCAAATAAATTTAAGGGTAAGTTTTCGATGTTGCATCACCTTCAC

← r1

b

d2 →

CTAGTTGAACGCTTCCATCTTCAATGTTGTGTCTAATTTTGAAGTTAACTTTGATTCCATTCTTTTGTGTTGCTGCCATGATGTATAC
ATTGTTGTGAGTTATAGTTGTATTCCAATTTGTGTCCAAGAATGTTTCCATCTTCTTTAAATCAATGCCTTTTAACTCGATTCTATTA
ACAAGGGTATCACCTTCAAACCTTGACTTCAGCACGTGTCTTGTAGTTCCCGTCATCTTTGAAAAATATAGTTCTTTCTGTACATAAC
CTTCGGGCATGGCACTCTTGAAGAAAGTCATGCTGTTTCATATGATCTGGGTATCTTGAAGAGCATTGAACACCATTAAGTAAGAGTAGT
GACAAAGTGTGGCCAAGGAACAGGTAGTTTTCAGTAGTGCAAATAAATTTAAGGGTAAGTTTCCGTATGTTGCATCACCTTCACGC
ATGCGGGAACGGGCACGGAGAAAAAGAAGTGTGGAGGAGAAGCAGCCGAGCTCATTCCCTTCGCTTCTGGGCCCAAAGCAGTGCAGTC
TTTCTTGGCCAAATCAAGGATTTGGGGCTTCTTGCTACGCTACAACACTATAGAAATCCATTTTCTTAGTAATATATATGAATAGAA
AGATAGATCCATCCATCTATCCTATCCGATTCTATTGTTGTTATCTAAAAAGAATCGATTTCAATCAACCTTTGATTCAAAGAACT
GCGCTTAGCCCCCGCCCATGAAACGCTCTGCTGCAATGGATGGCAGAGGGTCCGTAGTACCCGAAGCACTGGAGTGATCCAGTAG
CCGGGAAGGGGCTAGAAGTGCTACTACTACACCACACTACACTTGGCTCTACACATTTACAGAGCTAACCCCTGTCCAGTGCTGG
CAGAGCTAAGGGGCTTCAATCCTTACTCTTTATCCCATCTTCGCCAGGCTTAACGGGGCTTTACTTATTAGGGGGGAGAGTGG
AGCCTCGAAAAGCACTGTAGAGAGGAAGATCCTTGGCCCTCTTATTCTCTACAGGGTTCCAAACCTTTCTTCAACATAGGTGACAA
CGAGCCAGGCAGAGATGGAAGAGATCAAAACGCGAATAAGAAGCAAGCTCGCCTTCTTTTGTATCATTTTGTATAGAGGGGATGAA
GAAAGTGGACAAAACAGACTCGCATTCTCATCGAACAATAACAGGAAAGAATCATATTGAAAACGCTCCTAACCCAAACCTTCTCT
TCGTAGAGCCCGTGATTGTAAGTGATCCGAACCTGCCCGGAGCGAGCTCCCATAGAGGCAAGTGAAGTTGGTGAGCCGTATGATGG
GCAACTATCTCTGCGGTTCCGGAGAGGACTCAGCTGTTAGTTAGTACCCCTTGGTTTCGGGGTGGACCTTTTCACTCTATTTTATTA
TATACGCTTAGCGAAAAGAATGTTTTTGTATACACCTAGGACATGGATTCTATATGAACCAATGGATCGTACAAGTCGTTACTACTA
GCAATGACTTCTCTTTTCATTACTTCTTTT

← r2

Annexe 3 : Produit de PCR inverse obtenu après digestion et religation à la *MseI* de l'ADNmt recombiné avec la construction nad2/gfp avec les amorces d2 et r3. la séquence issue de la gfp est représentée en vert.

d2 →
CTAGTTGAACGCTTCCATCTTCAATGTTGTGTCTAATTTGAAGTTAAAGTAAAGGCTCGACGAAGGGAGGGAGGTGCGGCGGGG
AAGGAAAACGCTTTCGGAGATCGAGATTTTTTTTCATCGAAAACGAAGAAGCCGAGGATGGCCTACGGTGCGTCTTATCTGAAG
GGAACACGCTTTTTTGACCGCCGTGGTATGATTGCCGGGCCCTCCTTACAGTCAAGTGGCTTTCAGCTCCTCTCCTCGTTCCGC
CCTTCCTATTGGGATAGCAGCCTTCGGGCTTGCCTGCCCTTCTAATAAAAAATTCGGGCTCGGCCCGGGAAAGCGCTGGCAACA
ACTGAAAGGAAGGGTCCATGTAGCTGCTGTGTCCGCCCTTCTTAGTCAATGGGCGACAGCAGGTTTCGGCATCTACTACAAAAG
AGAGAATCCACTTCAGATAAQCACGTCTCTGCTAGGCAGCTTGCT
← r3

WALLET Clémentine

Master FAGE

Mémoire de stage réalisé à l'IBMP, encadré par André Dietrich

Mise au point d'un système de transfection de mitochondries.

Soutenu le 05/09/2012

Résumé :

Les mitochondries, organelles régissant la production d'énergie dans la cellule, possèdent leur génome propre. La transformation mitochondriale, n'est pas accessible par des méthodes conventionnelles. En agronomie, elle serait pourtant particulièrement utile pour générer des lignées mâles stériles cytoplasmiques (CMS) en sélection variétale. D'autre part de nombreuses maladies neurodégénératives ont été identifiées comme ayant une origine mitochondriale et nécessitent des stratégies de thérapie génique. Dans cette étude, nous avons utilisé la compétence des mitochondries isolées pour étudier l'import et le maintien d'ADN exogène dans les organelles. Nous avons ainsi obtenu la recombinaison d'un ADN importé et l'insertion d'une séquence rapporteur dans l'ADN de mitochondries de plantes. Nous avons abordé l'analyse des modalités de cette recombinaison. Nous avons parallèlement montré l'import d'ADN mitochondrial linéaire entier dans des organelles isolées à partir de cellules humaines. Le problème de la circularisation de l'ADN importé, condition indispensable pour la réplication, a également été abordé *in organello*. Nos résultats apportent différentes perspectives pour la manipulation génétique des mitochondries, tant chez les plantes que dans les cellules humaines.