

Université Louis Pasteur, Strasbourg I

2004

THESE

présentée à
la Faculté des Sciences de la Vie
pour obtenir le titre de
Docteur de l'Université Louis Pasteur
Domaine : Biologie Moléculaire Végétale

par
Etienne H. MEYER

**La voie de réduction dans la maturation
des cytochromes de type *c* mitochondriaux :
étude de la protéine CCMH d'*Arabidopsis thaliana***

soutenue le **21 octobre 2004**, devant la commission d'examen

G. Bonnard	(CNRS, Strasbourg)	Directrice de thèse
E. Glaser	(SU, Stockholm)	Examinatrice
J.P. Jacquot	(UHP, Nancy)	Rapporteur externe
L. Otten	(ULP, Strasbourg)	Président et Rapporteur interne
L. Thöny-Meyer	(ETH, Zürich)	Rapporteur externe

Institut de Biologie Moléculaire des Plantes (IBMP)

UPR-CNRS 2357

Remerciements

Tout d'abord, un grand merci à Géraldine. Merci d'avoir su me convaincre de rejoindre ton laboratoire. J'ai passé 4 années formidables sous ta direction. Merci pour tout, ton aide, tes conseils, tes coups de gueule. Merci pour ta confiance. Si c'était à refaire, je signerais les yeux fermés.

Je remercie Mme Linda Thöny-Meyer et Mr Jean-Pierre Jacquot de m'avoir accueilli temporairement dans leur laboratoire puis d'avoir accepté de juger mon travail.

Merci à Mr Léon Otten et Mme Elzbieta Glaser d'avoir accepté de juger mon travail.

A very special thank to Nag. Thank you for teaching me molecular biology, indian food, english, rules of cricket, ... Thank you for your permanent smile, your advices, your kindness. You are a wonderful guy, the big brother I do not have.

Un merci très très spécial à Philippe et Aimée qui ont fait du box "the place to be", un endroit où on a refait le monde, l'histoire et la science, autour d'un café, en travaillant.

Je remercie aussi tous les autres membres du labo 306 : Anne-Lyse, Marie-France, Nathalie, Gaëlle, Michal, Jérémie.

Merci au Yéti de m'avoir prêté ses bras et aux Pingus de ne s'être jamais plaints.

Enfin, merci à tous les autres membres du département Biogenèse des mitochondries qui font que ce département est le meilleur : André, Anne, Anne-Marie, François, Frédérique, Gag, Ginette, Heike, José, Laurence, Ludo, Marlyse, Marie-Jo, Monique, Patrice, Romary, Thalia et bien sur un énorme Merci à notre Chef Jean-Michel sans qui tout serait différent.

Un méga-gigantesque merci à toute la bande de fous qui ont rendus ces années extraordinaires : Alban, Ben, Cécile, Clarisse, Delphine, Elodie, Fred H., Fred L., Isa, Olivier, Pierre, Sarah, Vincent. Merci pour tout ce qu'on a partagé, les discussions scientifiques, les soirées, les lunchs, le tarot, les pauses, les concerts... Vous êtes tous géniaux, ne changez pas.

Un immense merci à mes parents. Vous avez su me conseiller, me calmer, m'encourager, me recadrer, ne rien dire... quand il le fallait. Merci pour tout ce que vous m'avez donné. Sans vous, je n'y serais pas arrivé.

Merci aussi à ma sœur et colocatrice Odile (Je t'ai doublé !) et à mon frère Jacques qui ont toujours été là quand j'avais besoin d'eux.

Merci à tous mes amis footballeurs : Stéphane, Jean-Michel, Laurent, Max, Gaylord, Damien, Vincent, Seb, Jo et les autres. Grâce à vous j'ai pu me défouler plusieurs fois par semaine.

Merci au Racing pour m'avoir fait tantôt rêver, tantôt rire.

Merci à tous les autres que j'ai croisé plus ou moins longtemps : Nathalie, Elise, Seb, Sandrine, Marie, Denis, Stéphanie, Thierry, Noémie, Irina, Chrystel, Lionel, Sabine, Lili.

☀️♁☐♃♄♅ * ↘↙▽ ↻↺↻ ✓⓪Ⓜ️ 🏠📧✕✓📧📧📧 🌟⊕Ⓜ️Ⓜ️ ↻◀️ 🌟Ⓜ️Ⓜ️🌀
📧📧 🌀 ④🌀Ⓜ️ ☐🌀📂📂♁♂️ 📧🌀Ⓜ️📧📧? (remerciements secrets)

Enfin je re-remercie Géraldine, Jean-Michel, Aimée et Philippe pour leur aide lors de la correction de cette thèse. Merci d'avoir multiplié le nombre de 's' par 3 !

Let's talk about science.....

Abréviations

2,4 D : acide 2,4-dichloro-phenoxyacétique
ABC : ATP binding cassette
acétyl-CoA : acétyl coenzyme A
ADN : acide désoxyribonucléique
ADNc : ADN complémentaire
APS : persulfate d'ammonium
ARN : acide ribonucléique
ATP, ADP, AMP : adénosine triphosphate, adénosine diphosphate, adénosine monophosphate
bp, kb : paire de bases, kilo paire de bases
BisTris : Bis(2-hydroxyéthyl)imino-tris(hydroxyméthyl)méthane
BSA : sérum-albumine bovine
CCCP : carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone
CCM : "cytochrome c maturation"
CHAPS : 3-[(3-cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propanesulfonate
CNBr : bromure de cyanogène
kDa : kiloDalton
DNase : désoxyribonucléase
dNTP : désoxyribonucléoside-5'-triphosphate
DO_x : Densité optique à x nm
DTT : dithiothréitol
EDTA : Acide éthylène diamine tétraacétique
EST : "expressed sequence tag"
FADH₂ : Flavin Adenine Dinucleotide
FMN : Flavine mononucléotide
GFP : "green fluorescent protein"
HEPES : N-(2-hydroxyéthyl)piperazine-N'-(2-éthanesulfonate) de sodium; 4-(2-hydroxyéthyl)piperazine-1-(2-éthanesulfonate) de sodium
Hsp : "Heat-shock protein"
IPTG : isopentényl-β-D-thiogalactopyranoside
λ_{max} : longueur d'onde d'absorption maximum
LB : Luria broth
LB : "left border" (bordure gauche d'un ADN-T)
MES : acide 2-(N-morpholino) éthanesulfonique
Met : méthionine
MOPS : acide 3-N-morpholino-propanesulfonique
mt : mitochondrial
NADH, NADPH :
NP40 : Nonidet P-40
(p/v) : poids/volume
PCR : réaction de polymérisation en chaîne
PM : poids moléculaire
PMSF : phényl méthyl sulfonyl fluoride
PVDF : difluorure de polyvinylidène
RB : "right border" (bordure droite d'un ADN-T)
RFP : "red fluorescent protein"
RMN : résonance magnétique nucléaire
RNase : ribonucléase

RT-PCR : Transcription inverse puis PCR

SDS : dodécylsulfate de sodium

SSC : Standard sodium citrate

TCA : acide trichloroacétique

TEMED : N, N, N',N'-tétraméthyléthylène diamine

Triton X100 : polyéthylène glycol tert-orthophényl éther; t-octylphénoxyéthoxyéthanol;

4-(1,1,3,3-tétraméthylbutyl)phényl-polyéthylène glycol

Tween-20 : polyéthylène glycol sorbitane monolaurate

Tris : N-tris(hydroxyméthyl)aminométhane

U : unité enzymatique

UV : ultraviolet

(v/v) : volume/volume

X-gal : 5-bromo 4-chloro 3-indole 1-D-galactopyranoside

Table des matières

INTRODUCTION	1
1. La respiration mitochondriale	1
1.1. La glycolyse	1
1.2. Le cycle de l'acide citrique	1
1.3. Le transfert d'électrons et la phosphorylation oxydative	2
1.4. Particularités des mitochondries végétales.....	3
1.4.1. NAD(P)H déshydrogénases insensibles à la roténone	3
1.4.2. La voie de l'oxydase alternative.....	4
2. L'importation des protéines dans les mitochondries	4
2.1. Importation des protéines contenant une préséquence.....	5
2.2. Importation des protéines possédant un signal interne.....	6
2.2.1. Cas des transporteurs de la membrane interne	6
2.2.2. Autres protéines.....	6
3. Les cytochromes	6
3.1. Classification des cytochromes	7
3.2. Les cytochromes de type <i>c</i> bactériens	7
3.3. Les cytochromes de type <i>c</i> chez les plantes	9
3.3.1. Le cytochrome <i>c</i>	9
3.3.2. Le cytochrome <i>c</i> ₁	10
3.3.3. Le cytochrome <i>c</i> ₆	10
3.3.4. Le cytochrome <i>f</i>	11
4. La maturation des cytochrome de type <i>c</i>	11
4.1. Le système III.....	12
4.1.1. Translocation des apocytochromes	12
4.1.2. Liaison de l'hème	13
4.1.3. Caractérisation <i>in vitro</i> de l'activité hème lyase	14
4.2. Le système I bactérien.....	14
4.2.1. Le transporteur ABC	15
4.2.2. La voie de livraison de l'hème	16
4.2.3. La voie de réduction.....	16
4.2.4. CcmF, l'hème lyase putative	18
4.2.5. L'opéron <i>nrf</i>	18
4.3. Le système II	19
4.4. Un système <i>in vitro</i> pour la formation d'holocytocrome <i>c</i>	20
5. Le système I dans les mitochondries de plantes	21
5.1. Le génome mitochondrial.....	21
5.2. Les gènes <i>cmm</i> dans les génomes mitochondriaux	22
5.3. Les gènes <i>cmm</i> dans les génomes mitochondriaux de plantes	23
5.3.1. CcmB et CcmC.....	23
5.3.2. CcmF	24

5.4. Les gènes <i>ccm</i> dans le génome nucléaire de plantes.....	25
5.4.1. AtCCMA.....	25
5.4.2. AtCCME.....	26
5.4.3. AtCCMH.....	26
5.5. Les gènes <i>ccm</i> non identifiés chez les plantes.....	27
5.5.1. AtCCMD.....	27
5.5.2. AtCCMG.....	27
5.5.3. Le domaine C-terminal de CcmH.....	28
6. Les thiols/disulfure oxydoréductases.....	28
6.1. Formation et isomérisation des ponts disulfures.....	29
6.1.1. Les protéines isomérase de disulfure.....	29
6.1.2. Le système d'oxydation/isomérisation du périplasme bactérien.....	30
6.2. Réduction des ponts disulfures.....	30
6.2.1. Le système thiorédoxine.....	31
6.2.2. Le système glutathion/glutarédoxine.....	33
6.3. Cas des mitochondries végétales.....	35
7. Présentation du travail de thèse.....	35
MATERIELS ET METHODES.....	37
1. Matériels et outils informatiques.....	37
1.1. Matériel végétal.....	37
1.2. Souches de bactéries.....	37
1.3. Vecteurs de clonage.....	38
1.4. Oligonucléotides.....	40
1.5. Outils informatiques.....	40
2. Méthodes.....	41
2.1. Purification et fractionnement de mitochondries.....	41
2.1.1. Purification de mitochondries de tubercules de pomme de terre ou de têtes de chou-fleur.....	41
2.1.2. Fractionnement sous-cellulaire d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	42
2.1.3. Purification de mitoplastes.....	43
2.1.4. Fractionnement des mitoplastes d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	43
2.1.5. Solubilisation des protéines extrinsèques.....	44
2.2. Méthodes concernant l'ADN.....	44
2.2.1. Extraction d'ADN à partir de plantes.....	44
2.2.2. Electrophorèse sur gel d'agarose.....	44
2.2.3. Purification des fragments d'ADN issus de gels d'agarose.....	45
2.2.4. Digestion de l'ADN par des enzymes de restriction.....	45
2.2.5. Ligation de deux fragments d'ADN.....	45
2.2.6. Transformation.....	46
2.2.7. Préparation d'ADN plasmidique.....	46
2.2.8. Séquençage d'ADN.....	47
2.2.9. Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR).....	47
2.3. Méthodes concernant les ARN.....	48
2.3.1. Extraction des ARN d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	48

2.3.2. Gel d'agarose dénaturant pour ARN	49
2.3.3. Synthèse d'une sonde radioactive	49
2.3.4. Northern blot et hybridation	49
2.3.5. Transcription inverse	50
2.3.6. RACE en 5'	50
2.4. Méthodes concernant les protéines	51
2.4.1. Quantification des protéines	51
2.4.2. Concentration des protéines	51
2.4.3. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide	52
2.4.4. Détection des protéines	55
2.4.5. Surexpression de protéines dans <i>E. coli</i>	56
2.4.6. Purification de polypeptides sur colonne d'affinité Ni-NTA	56
2.5. Méthodes immunologiques	57
2.5.1. Obtention d'anticorps	57
2.5.2. Purification des anticorps	58
2.5.3. Transfert des protéines sur membrane de PVDF	59
2.5.4. Immunodétection	59
2.5.5. Far-Western	60
2.5.6. Immunoprécipitation	60
2.5.7. Co-immunoprécipitation	61
2.6. Import <i>in vitro</i>	61
2.6.1. Synthèse <i>in vitro</i> d'une protéine radioactive	61
2.6.2. Tests d'import <i>in vitro</i>	62
2.7. Importation <i>in vivo</i>	64
2.7.1. Matériel végétal	64
2.7.2. Préparation des particules	64
2.7.3. Bombardement des cellules	65
2.7.4. Observation au microscope confocal	65
2.8. Complémentation d'un mutant d' <i>E. coli</i>	66
2.8.1. Transformation d' <i>E. coli</i> par choc thermique	66
2.8.2. Complémentation	66
2.8.3. Préparation d'un extrait périplasmique bactérien	67
2.8.4. Coloration d'hème	67
2.8.5. Isolement de sphéroplastes	67
2.8.6. Préparation des protéines membranaires bactériennes	68
2.9. Tests d'activité redox <i>in vitro</i>	68
2.9.1. Réduction d'une protéine marquée au DTNB	68
2.9.2. Réduction d'insuline	69
2.10. Techniques microscopiques	69
2.10.1. Observation de graines décolorées	69
2.10.2. Observation des embryons au microscope électronique	70
RESULTATS – DISCUSSION	71
1. Identification d'AtCCMH	71
1.1. Identification <i>in silico</i> d'AtCCMH	71
1.2. Clonage d'un ADNc et structure d'AtCCMH	72
1.2.1. 1 ^{er} Clonage par RT-PCR	72
1.2.2. 5'-RACE	72

1.2.3. 2 ^{ème} clonage par RT-PCR.....	73
1.2.4. 3' RACE.....	74
1.2.5. Bilan des travaux concernant la structure d'AtCCMH.....	74
1.3. Expression d'AtCCMH dans différents organes.....	76
1.4. Homologues d'AtCCMH chez les plantes.....	77
1.5. Caractéristiques d'AtCCMH.....	78
1.5.1. Adressage aux organelles.....	78
1.5.2. Caractéristiques structurales.....	78
1.5.3. Modifications post-traductionnelles.....	80
2. Localisation cellulaire et topologie d'AtCCMH.....	81
2.1. Localisation sous-cellulaire.....	81
2.1.1. Immunodétection d'AtCCMH sur des fractionnements cellulaires.....	81
2.1.2. Importation <i>in vitro</i>	82
2.1.3. Localisation <i>in vivo</i> par expression transitoire d'une protéine fusionnée à la GFP.....	84
2.2. Localisation sous-mitochondriale.....	86
2.3. Topologie.....	87
2.4. Caractérisation de l'importation <i>in vitro</i>	88
2.4.1. Immunoprécipitation après importation.....	88
2.4.2. Cinétique de l'importation.....	89
2.4.3. Fractionnements après importation.....	89
2.4.4. Etude de la maturation d'AtCCMH.....	90
2.4.5. Inhibition du potentiel transmembranaire.....	91
2.4.6. Prétraitement des mitochondries avec une protéase.....	91
2.4.7. Influence de l'ATP.....	92
2.4.8. Etude du signal d'adressage.....	93
2.4.9. Bilan sur l'importation d'AtCCMH.....	94
3. Caractérisation fonctionnelle d'AtCCMH.....	97
3.1. Complémentation fonctionnelle d'un mutant d' <i>E. coli</i> Δ CCMH.....	97
3.1.1. Principe de l'expérience.....	97
3.1.2. Construction des plasmides contenant AtCCMH.....	98
3.1.3. Complémentation.....	99
3.1.4. Hypothèses permettant d'expliquer ce résultat.....	100
3.2. Etude d'un mutant d'insertion <i>AtccmH</i>	104
3.2.1. Identification d'un mutant.....	105
3.2.2. Analyse des plantes T4 et de leurs descendants.....	105
3.2.3. Caractérisation du phénotype.....	108
3.2.4. Bilan.....	111
3.3. Tests d'oxydoréduction <i>in vitro</i>	112
3.3.1. Titration des thiols d'AtCCMH purifiée.....	112
3.3.2. Réduction d'AtCCMH.....	113
3.3.3. Réduction de l'insuline par AtCCMH.....	114
3.3.4. Bilan.....	115
4. Interactions entre AtCCMH et d'autres protéines.....	116
4.1. Far-Western.....	116
4.2. Co-immunoprécipitation.....	117
4.3. Pontage chimique <i>in vitro</i>	117

4.4. Electrophorèse sur gels Bleu-Natifs	119
4.5. Bilan	120
5. Recherche bioinformatique d'autres protéines CCM.....	122
5.1. Le domaine C-terminal d'EcCcmH.....	122
5.2. CCMG, l'autre membre de la voie de réduction	122
5.2.1. Caractéristiques des CcmG bactériens	122
5.2.2. Recherche bioinformatique	123
CONCLUSIONS – PERSPECTIVES	126
ANNEXES.....	134
BIBLIOGRAPHIE	137

Introduction

Introduction

Les mitochondries sont des organites intracellulaires pourvus d'une double membrane. Elles sont vraisemblablement issues d'un phénomène de symbiose entre une bactérie pourpre (α -protéobactérie) et une cellule protoeucaryotique (une bactérie anaérobie sûrement proche des archaeobactéries) (Gray and Doolittle, 1982). Cette symbiose permet à la cellule hôte de vivre en conditions aérobies grâce à l'acquisition de la respiration.

1. La respiration mitochondriale

La respiration aérobie est le processus de transfert des électrons du NADH ou du FADH₂ sur l'oxygène moléculaire (O₂). Le NADH et le FADH₂ sont produits lors de la glycolyse et/ou du cycle de l'acide citrique. Ces deux mécanismes utilisent les acides organiques et autres composés résultants de la dégradation des sucres ou de l'amidon. La respiration, qui se déroule dans les mitochondries, produit un gradient de protons qui est utilisé pour la synthèse d'ATP lors de la phosphorylation oxydative.

1.1. La glycolyse

La glycolyse fait intervenir des enzymes cytoplasmiques qui dégradent les hexoses en pyruvate, un composé à trois atomes de carbone. Certains de ces enzymes se trouvent fonctionnellement associées aux mitochondries végétales (Giegé *et al.*, 2003). L'oxydation des hexoses en pyruvate produit du NADH aussi bien que de l'ATP. Le pyruvate est ensuite importé dans la matrice mitochondriale.

1.2. Le cycle de l'acide citrique

Aussi appelé cycle de Krebs ou cycle des acides tricarboxyliques, le cycle de l'acide citrique se déroule dans la matrice mitochondriale. Ce cycle fait intervenir huit enzymes. Avant d'entrer dans le cycle de l'acide citrique, le pyruvate est oxydé et décarboxylé par la pyruvate déshydrogénase pour former du CO₂, de l'acétyl-CoA et du NADH. L'acétyl-CoA entre dans le cycle par l'intermédiaire de l'acide citrique synthase qui transfère le groupement acétyl sur l'acide oxaloacétique pour synthétiser l'acide citrique. Il s'en suit une série de

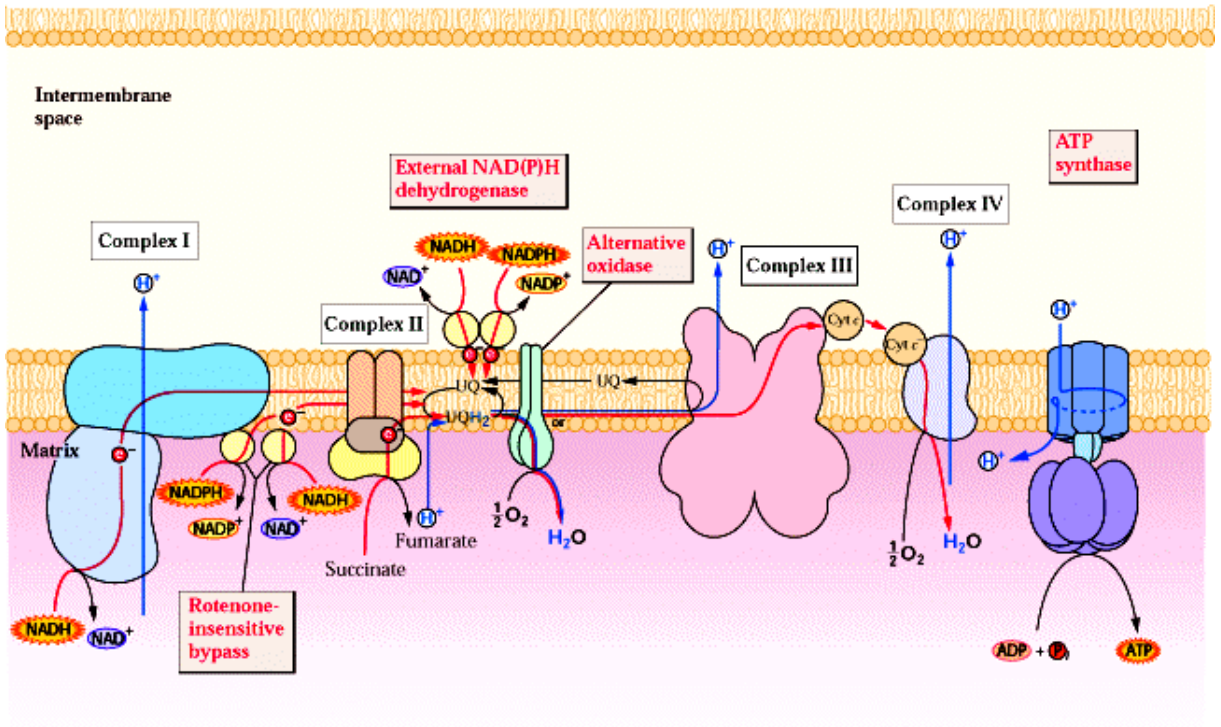


Figure 11 : Représentation schématique de la chaîne de transfert des électrons de la membrane mitochondriale interne (Buchanan *et al.*, 2000).

déshydratation, oxydations, décarboxylation qui conduisent à la régénération d'acide oxaloacétique.

1.3. Le transfert d'électrons et la phosphorylation oxydative

Le transfert d'électrons a lieu au niveau de la chaîne respiratoire. Localisée dans la membrane mitochondriale interne, la chaîne respiratoire est composée de quatre complexes multiprotéiques appelés complexes I à IV (Figure i1). Les substrats de la chaîne respiratoire sont le NADH au niveau du complexe I et le FADH₂ qui est produit au niveau du complexe II lors de l'oxydation du succinate en fumarate. Ces deux complexes transfèrent les électrons résultant de l'oxydation des substrats au pool d'ubiquinone. L'ubiquinone réduite en ubiquinol achemine les électrons vers le complexe III qui les transfère vers le cytochrome *c*. Puis, au niveau du complexe IV, les électrons provenant de l'oxydation du cytochrome *c* sont utilisés pour réduire l'oxygène moléculaire (O₂). Cette voie de transfert des électrons est aussi appelée voie des cytochromes. Ces transferts d'électrons sont accompagnés au niveau des complexes I, III et IV par une expulsion de protons dans l'espace intermembranaire. Le gradient de protons ainsi créé sera utilisé par le complexe V pour la synthèse d'ATP lors de la phosphorylation oxydative.

Le complexe I (NADH : ubiquinone oxydoréductase) d'un poids moléculaire d'environ 900 kDa est le plus grand des complexes de la chaîne respiratoire. Il est composé de 30 à 40 sous-unités. Des études de microscopie électronique ont montré qu'il avait une structure en L (Weiss *et al.*, 1991). Il transfère les électrons du NADH vers l'ubiquinone (coenzyme Q) via un mononucléotide à flavine (FMN) et au moins cinq centres fer-soufre. Le complexe I peut être inhibé par la roténone flavonoïde et ses analogues au site de réduction de l'ubiquinone.

Le complexe II (Succinate déshydrogénase) est un composant du cycle de l'acide citrique qui catalyse l'oxydation du succinate en fumarate. Les électrons résultant de cette oxydation sont transférés sur l'ubiquinone. Ainsi le cycle de l'acide citrique est lié à la chaîne respiratoire. Le malonate, un analogue du succinate, est un inhibiteur fort du complexe II.

Le complexe III (Complexe *bc*₁ ou ubiquinol-cytochrome *c* oxydoréductase ou cytochrome *c* réductase) accepte les électrons de l'ubiquinol et les transfère au cytochrome *c*. Le complexe III possède deux cytochromes : un cytochrome contenant deux hèmes de type *b* et le cytochrome *c*₁, une protéine à fer-soufre de type Rieske et cinq polypeptides. L'antimycine A et le myxothiazol sont des inhibiteurs du complexe III.

Le complexe IV (cytochrome *c* oxydase) transfère les électrons provenant du cytochrome *c* sur l'oxygène moléculaire pour le réduire en eau. Les transporteurs d'électrons de ce complexe sont deux centres contenant du soufre et deux cytochromes de type *a* : cyt *a* et cyt *a*₃. Le complexe IV est inhibé par le monoxyde de carbone, les azides et les cyanides.

Le complexe V (ATP synthétase) réalise la synthèse d'ATP en utilisant le retour de protons vers la matrice. Il est composé de deux parties : le domaine F₀ fonctionne comme un canal à protons et le domaine F₁, orienté dans la matrice, catalyse la formation d'ATP. Bien qu'il ne transfère pas d'électrons, le complexe V est parfois considéré comme un composant de la chaîne respiratoire. Ce complexe peut être inhibé par l'oligomycine B.

1.4. Particularités des mitochondries végétales

Les mitochondries végétales existent dans des cellules/organismes qui

- contiennent des chloroplastes produisant de l'ATP ainsi que de nombreux substrats de la respiration,

- ne peuvent pas fuir les stress environnementaux,

- nécessitent une grande quantité de précurseurs pour la synthèse de métabolites primaires et secondaires.

- photorespirent (Mackenzie and McIntosh, 1999).

Les mitochondries végétales ont donc développé des mécanismes qui permettent de court-circuiter la voie des cytochromes. Ces mécanismes sont peu connus à l'heure actuelle.

1.4.1. NAD(P)H déshydrogénases insensibles à la roténone

En plus de la NADH déshydrogénase présente dans le complexe I de la chaîne respiratoire, il existe au niveau de la membrane interne, quatre NAD(P)H déshydrogénases, deux « externes » (orientées vers l'espace intermembranaire) et deux « internes » (orientées vers la matrice) (Moller, 2002) (Figure i1). Ces déshydrogénases oxydent le NADH ou le NADPH et transfèrent les électrons au pool d'ubiquinone mais elles ne contribuent pas au gradient de protons. Les déshydrogénases « internes » ont une plus faible affinité pour le NADH que le complexe I, ainsi, elles ne fonctionnent que lorsque la concentration en NADH dans la matrice est élevée. L'activité des déshydrogénases « externes » dépend fortement de la présence de calcium. En plus ces enzymes peuvent influencer la balance redox du pool de

nucléotides pyrimidiques cytoplasmiques (le rapport $\text{NAD(P)}^+/\text{NAD(P)H}$) et ainsi elles peuvent influencer de nombreuses réactions cytoplasmiques.

1.4.2. La voie de l'oxydase alternative

Une voie alternative comportant une oxydase terminale unique qui transfère directement les électrons de l'ubiquinol à l'oxygène moléculaire est présente dans les mitochondries des végétaux (Figure i1), d'algues, de champignons et de certains protozoaires (Vanlerberghe *et al.*, 1995). Cette voie ne génère pas de gradient de protons, elle ne produit donc pas d'ATP mais elle a un rôle de régulation. Elle est activée lorsque la voie des cytochromes est à saturation (augmentation des rapports ATP/ADP et NADH/NAD^+). Normalement, des rapports ATP/ADP et NADH/NAD^+ trop élevés entraînent un ralentissement du cycle de l'acide citrique. Lorsque la voie alternative est activée, elle permet d'éviter ce ralentissement. Le cycle de l'acide citrique tournera donc essentiellement pour fournir des précurseurs pour la synthèse de métabolites. Ainsi, la voie alternative et le cycle de l'acide citrique travaillent en tandem pour fournir un nombre plus important de molécules carbonées nécessaires à la plante (Mackenzie and McIntosh, 1999).

2. L'importation des protéines dans les mitochondries

Les complexes respiratoires sont composés d'un grand nombre de protéines. Seules 16 de ces protéines (parmi les plus hydrophobes) sont produites dans la mitochondrie chez *A. thaliana* (Unsold *et al.*, 1997). Les autres doivent être importées du cytoplasme. La mitochondrie est un organe comprenant plusieurs centaines de protéines différentes. Le génome mitochondrial d'*A. thaliana* ne code que pour 28 protéines (Unsold *et al.*, 1997). Les composants des complexes respiratoires ne sont donc pas les seules protéines à être importées. L'immense majorité des protéines mitochondriales est codée par le génome nucléaire, synthétisée dans le cytoplasme puis importée dans les mitochondries. Ces protéines possèdent un signal d'adressage qui leur permet d'être importées dans les mitochondries. Deux types de signaux d'adressage mitochondrial sont généralement décrits : les préséquences et les signaux internes. L'importation des protéines dans les mitochondries a été essentiellement étudiée dans la levure mais les mécanismes mis en œuvre semblent bien conservés dans le règne des eucaryotes (Wiedemann *et al.*, 2004).

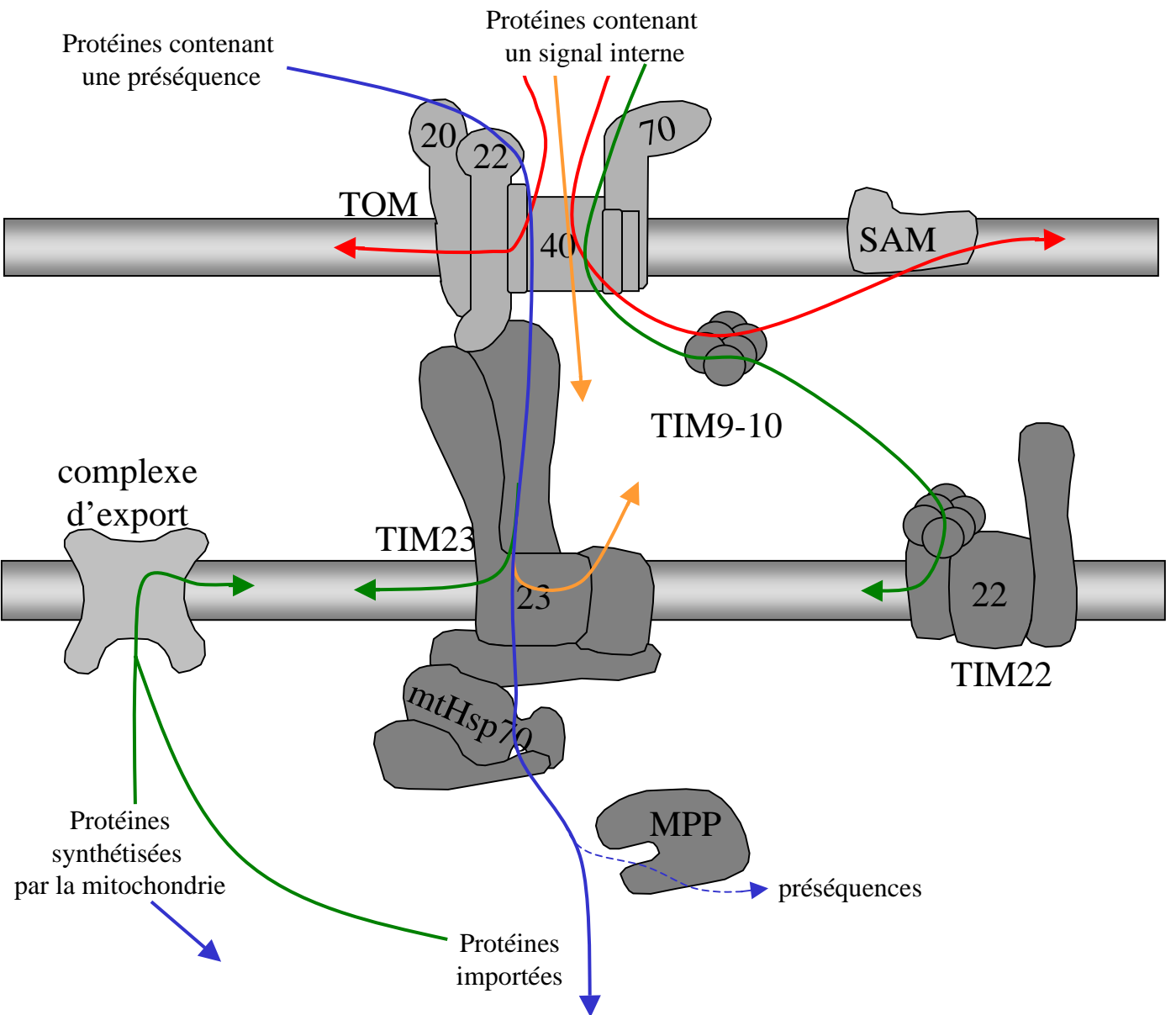


Figure i2 : Représentation schématique des mécanismes d'importation des protéines dans les mitochondries de levure. Les flèches montrent les différentes voies d'importation des protéines vers la matrice (en bleu), la membrane interne (en vert), l'espace intermembranaire (en orange) et la membrane externe (en rouge)(d'après Wiedemann *et al.*, 2004 et Truscott *et al.*, 2003).

TOM : translocase of outer membrane

TIM : translocase of inner membrane

MPP : mitochondrial processing peptidase

SAM : Sorting & Assembly Machinery

2.1. Importation des protéines contenant une préséquence

La préséquence consiste en une extension N-terminale de la protéine à importer. Les préséquences ne contiennent pas de séquence consensus d'adressage mitochondrial mais elles possèdent quelques particularités. Au niveau de leur structure primaire, elles sont riches en acides aminés basiques, hydrophobes et hydroxylés et elles ont une taille de 10 à 80 acides aminés. Au niveau de leur structure secondaire, elles se replient en une hélice α amphiphile possédant un côté chargé positivement et un côté hydrophobe (von Heijne *et al.*, 1989).

Lors de l'importation d'une protéine contenant une préséquence dans une mitochondrie (Figure i2), la protéine est préalablement dénaturée par un chaperon cytosolique de type Hsp70 puis la préséquence est reconnue par les récepteurs Tom20 et Tom22 qui sont localisés au niveau de la membrane mitochondriale externe. Ces deux récepteurs font partie du complexe TOM (translocase de la membrane externe). La protéine traverse la membrane externe en empruntant le pore du complexe TOM formé par Tom40. Puis elle emprunte le canal formé par Tim23 au niveau du complexe TIM23 (translocase de la membrane interne contenant Tim23). Le domaine N-terminal de Tim23 s'accroche à la membrane externe et ainsi les complexes TOM et TIM23 se retrouvent proches l'un de l'autre (Donzeau *et al.*, 2000). Un potentiel transmembranaire au niveau de la membrane interne est indispensable pour l'importation des protéines contenant une préséquence. Il permet d'attirer les préséquences chargées positivement dans le pore du complexe TIM23 (le côté matriciel de la membrane interne est chargé négativement) (Martin *et al.*, 1991). Un chaperon mitochondrial associé au complexe TIM23, mtHsp70, tire la protéine dans la matrice. Ce processus consomme de l'ATP. Lorsque la préséquence a pénétré dans la matrice, elle est clivée par une protéase MPP (Mitochondrial Processing Peptidase). La protéine importée se retrouve dans la matrice mitochondriale. Cette voie d'importation est appelée voie générale d'importation car elle concerne un très grand nombre de protéines mitochondriales.

Certaines protéines importées par cette voie sont réexportées dans la membrane interne par la machinerie d'exportation des protéines codées par le génome mitochondrial (Herrmann *et al.*, 1997). D'autres sont arrêtées en cours d'importation et transférées dans la membrane interne (Glick *et al.*, 1992) ou l'espace intermembranaire (Figure i2).

2.2. Importation des protéines possédant un signal interne

2.2.1. Cas des transporteurs de la membrane interne

Les transporteurs de la membrane interne sont des protéines très hydrophobes contenant plusieurs domaines transmembranaires. Ils sont déstructurés dans le cytoplasme par Hsp70 et Hsp90. Ils sont reconnus par Tom70, un récepteur présent dans le complexe TOM, puis traversent la membrane externe en utilisant le pore du complexe TOM. Dans l'espace intermembranaire, ils sont pris en charge par un complexe formé par Tim9 et Tim10 (Koehler *et al.*, 1998). Ce complexe les achemine vers le complexe TIM22 (translocase de la membrane interne contenant Tim22) qui permet leur insertion dans la membrane interne (Figure i2).

2.2.2. Autres protéines

Les protéines de la membrane externe ayant une topologie simple (par exemple un seul domaine transmembranaire) ne nécessitent que le complexe TOM pour leur insertion dans la membrane (Figure i2). Les protéines possédant une topologie plus complexe sont importées du côté interne de la membrane externe puis sont prises en charge par le complexe contenant Tim9 et Tim10. Celui-ci les achemine au complexe SAM (Sorting and Assembly Machinery) qui les insère dans la membrane externe (Wiedemann *et al.*, 2004) (Figure i2).

Les protéines de l'espace intermembranaire traversent la membrane par l'intermédiaire du complexe TOM (Figure i2).

3. Les cytochromes

Les cytochromes sont des pigments cellulaires abondants et facilement détectables par des mesures spectrométriques. Ces holoprotéines possèdent un cofacteur hémique (un noyau porphyrine liant un atome de fer par l'intermédiaire de quatre atomes d'azote) qui leur permet d'absorber la lumière à une longueur d'onde donnée et de participer à des réactions d'oxydoréduction. En effet, l'atome de fer contenu dans l'hème passe de son état ferrique oxydé (Fe^{III}) à son état ferreux réduit (Fe^{II}) lorsqu'il subit une réduction (gain d'un électron). L'hème peut ensuite perdre cet électron lors d'une réaction d'oxydation.

3.1. Classification des cytochromes

Les cytochromes sont classés selon les caractéristiques de leur spectre d'absorption, qui dépendent du type d'hème associé à l'apoprotéine (Figure i3). L'hème ferreux (réduit) donne trois pics d'absorption dans les spectres visible et UV. Ces trois pics sont nommés pic α , β , γ . Le pic dans la région α (>550 nm) est utilisé pour classer les cytochromes de manière spécifique.

- Les cytochromes de type *a* possèdent un pic α d'absorption vers 600 nm. Le groupement prosthétique (hème A) est lié à l'apoprotéine de manière non covalente. Il possède un groupement formyl en position 8 de l'anneau tétrapyrrole ainsi qu'une chaîne latérale farnésylhydroxyéthyl.

- Les cytochromes de type *b* ont un maximum d'absorption entre 555 et 565 nm. Ils possèdent un protohème IX (hème B) attaché de manière non covalente.

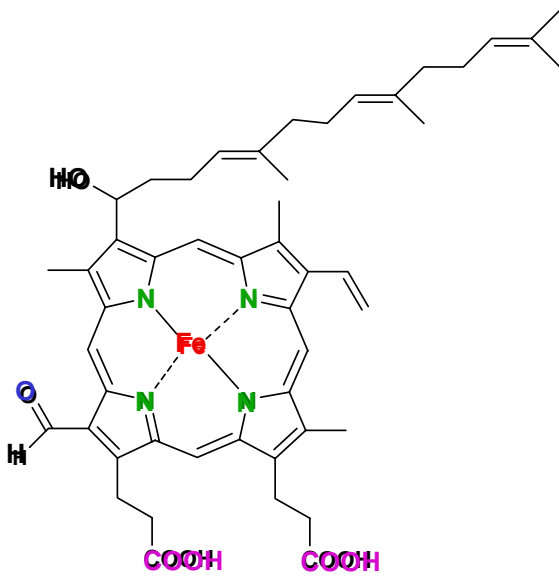
- Les cytochromes de type *c* absorbent au maximum entre 550 et 557 nm. Leur groupement prosthétique, le protohème IX (hème B) est lié de manière covalente sur l'apoprotéine par l'intermédiaire de deux liaisons thioéther entre les chaînes latérales vinyl de l'hème et les deux thiols des deux cystéines du motif conservé Cys-Xxx-Xxx-Cys-His. L'atome de fer des cytochromes de type *c* possède en plus un ou deux ligands dont l'un est toujours une histidine.

- Les cytochromes de type *d* possèdent un pic d'absorption vers 630 nm. Ils possèdent un groupement prosthétique (hème D) qui n'est pas lié de manière covalente à l'apoprotéine. L'anneau C du tétrapyrrole est saturé.

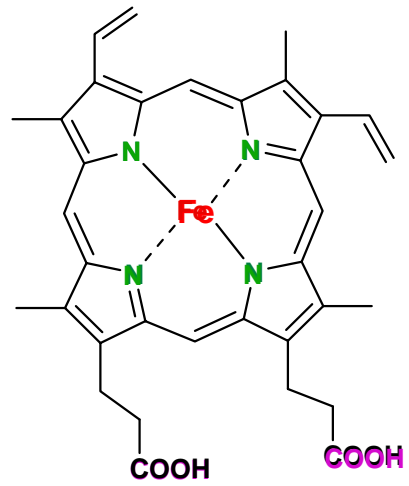
- Les cytochromes de type *o* ont un maximum d'absorption entre 555 et 565 nm. Ils possèdent un hème contenant une chaîne latérale farnésylhydroxyéthyl (hème O); cet hème n'est pas attaché de manière covalente.

3.2. Les cytochromes de type *c* bactériens

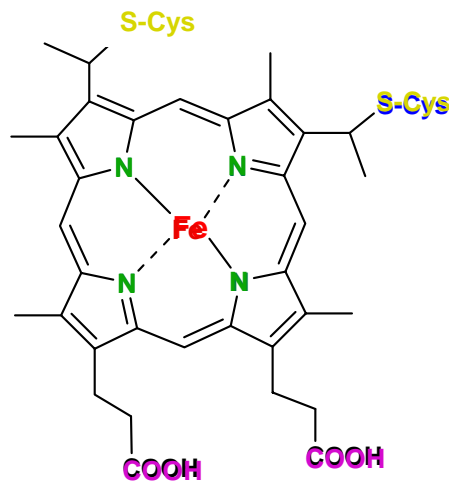
Les cytochromes de type *c* sont des protéines qui possèdent un ou plusieurs hèmes liés de manière covalente à l'apoprotéine et qui sont impliqués dans des réactions de transfert d'électron. Il existe chez les bactéries une grande diversité de respirations. Un grand nombre de cytochromes de type *c*, possédant souvent de multiples hèmes, sont présents chez ces organismes. Une analyse génomique basée sur la fréquence du motif Cys-Xxx-Xxx-Cyx-His



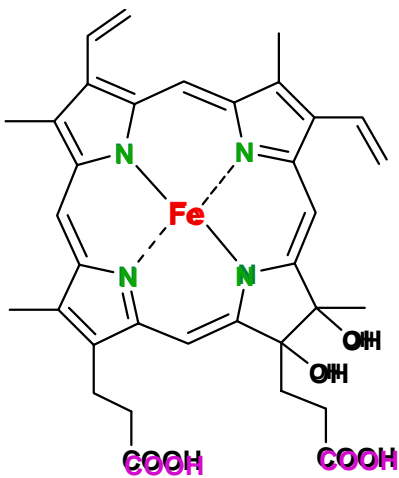
Hème A



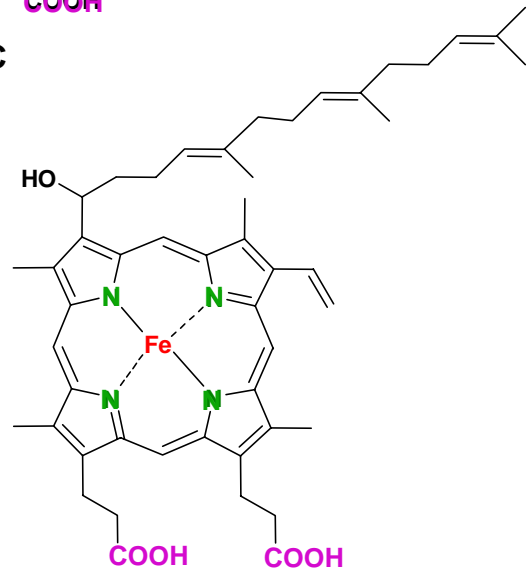
Hème B



Hème C



Hème D



Hème O

Figure i3 : Les différents types d'hèmes. L'hème C est un hème B attaché de manière covalente sur l'apoprotéine par deux liaisons thio-éther.

(le motif sur lequel l'hème sera fixé) montre que les bactéries pourraient contenir plus de trente cytochromes de type *c* (Ferguson, 2001).

Les cytochromes *c* jouent un rôle dans la chaîne respiratoire en transférant les électrons du complexe *bc₁* vers des oxydases terminales (Ferguson, 2001). Chez les bactéries, la respiration a lieu au niveau de la membrane plasmique. Les cytochromes *c* sont donc localisés au niveau de cette membrane ou dans l'espace périplasmique où ils transfèrent les électrons vers des accepteurs de la membrane plasmique. Les cytochromes *c* sont très souvent présents dans des complexes multiprotéiques. Lorsqu'ils ne sont pas associés à un complexe, ils agissent comme navette entre deux complexes respiratoires membranaires. Les cytochromes *c* périplasmiques sont soit solubles, soit ancrés dans la membranes par une extension N-terminale hydrophobe.

Les formes solubles sont des petites protéines de 8 à 14 kDa, homologues aux cytochromes *c* mitochondriaux. Les cytochromes *c* solubles ne transfèrent pas toujours les électrons du complexe *bc₁* vers des oxydases terminales (exemple en Figure i4). Ils peuvent recevoir les électrons directement de la déshydrogénation de produits organiques comme c'est le cas chez les bactéries méthylophiles. Celles-ci métabolisent le méthanol en formaldéhyde grâce à une déshydrogénase périplasmique (MOX) et les électrons qui sont produits sont alors transférés par un cytochrome de type *c* vers les oxydases terminales (Anthony, 1992). Un autre exemple est le cytochrome *c₃*, un cytochrome *c* tétra-hémique identifié dans une bactérie anaérobie réduisant les sulfates, qui transfère les électrons entre une hydrogénase et une thiosulfate réductase (Barrett and Clark, 1987).

Des exemples de cytochromes *c* liés aux membranes et possédant un domaine hydrophile périplasmique sont le cytochrome *c₅₅₀* de *Bacillus subtilis* (von Wachenfeldt and Hederstedt, 1990) possédant une fonction actuellement inconnue, CycM de *Bradyrhizobium japonicum*, *Paracoccus denitrificans* et *Rhizobium leguminosarum* qui transfère les électrons du complexe *bc₁* vers la cytochrome *aa₃* oxydase terminale (Bott *et al.*, 1991; Turba *et al.*, 1995; Wu *et al.*, 1996), le cytochrome *c_y* de *Rhodobacter capsulatus* qui fournit des électrons au centre réactionnel photosynthétique (Jenney and Daldal, 1993) ou au complexe *bc₁* (Hochkoeppler *et al.*, 1995). Le produit du gène *cycG* de *Rhodobacter sphaeroides* est un cytochrome *c* di-hémique mais son rôle dans la respiration n'a pas été démontré (Flory and Donohue, 1995).

Un cytochrome *c* localisé au niveau de la membrane externe de certaines bactéries Gram⁻ a été décrit. Ce cytochrome *c* pourrait lier la translocation des protons issus de la respiration à la réduction d'oxydes métalliques insolubles de l'environnement extracellulaire

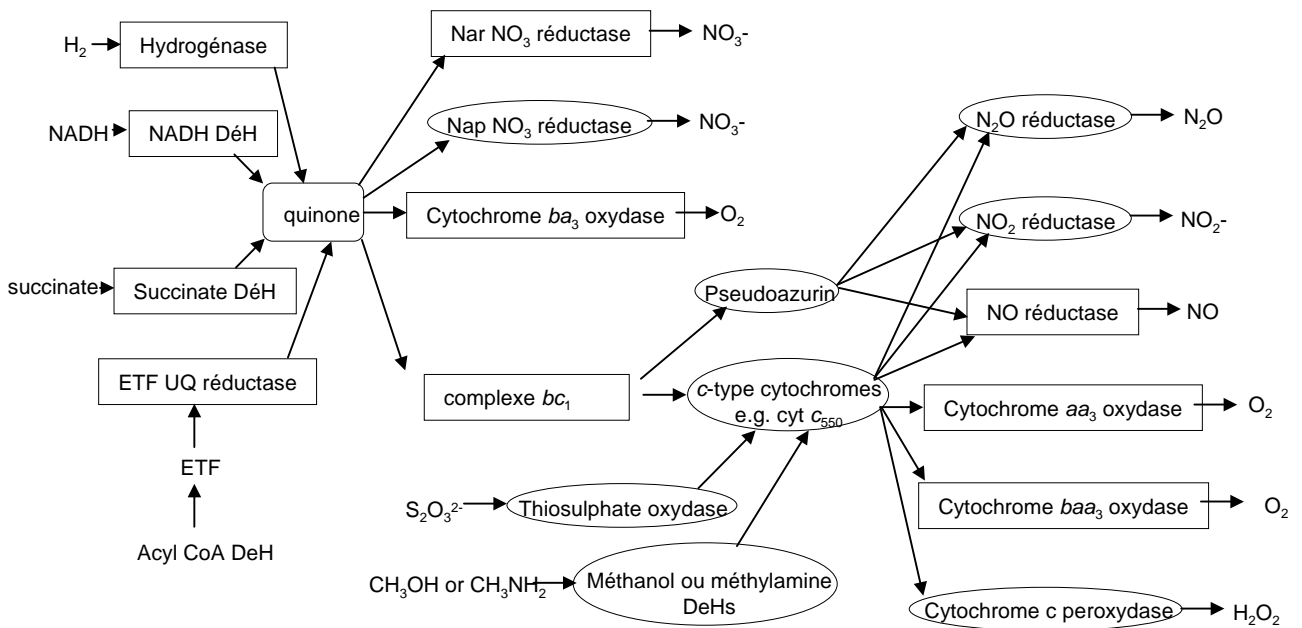


Figure i4 : Représentation schématique de quelques transporteurs d'électrons de *Pseudomonas denitrificans*, montrant les points de jonction au niveau des quinones et des cytochromes de type *c*. La plupart des composants sont seulement exprimés sous certaines conditions de culture, bien que la NADH déshydrogénase (NADH DÉH), la succinate déshydrogénase (succinate DÉH) et le complexe *bc*₁ soient exprimés constitutivement. Les rectangles indiquent des composants membranaires, les ovales entourent les protéines périplasmiques. ETF (electron transfer flavoprotein) et les déshydrogénases qui réduisent ETF sont localisés dans le cytoplasme.

UQ - Ubiquinone

Nap - nitrate réductase périplasmique

Nar - nitrate réductase attachée à la membrane (d'après Ferguson 2001).

(Myers and Myers, 1992). Un autre cas isolé est celui d'un cytochrome *c* localisé au niveau du cytoplasme et décrit dans des bactéries réduisant les sulfates (cytochrome *c*₅₅₃ chez *Desulfovibrio baculatus*) (Wood, 1991).

La présence d'un très grand nombre de cytochromes *c* dans les bactéries ainsi que leur fonction de transfert d'électrons associée à la respiration (aérobie ou anaérobie) ou à la photosynthèse, fait des cytochromes *c* d'excellents modèles expérimentaux pour l'étude de leur maturation.

3.3. Les cytochromes de type *c* chez les plantes

Dans la cellule eucaryotique végétale, les cytochromes de type *c* sont localisés dans les mitochondries et dans les chloroplastes. Contrairement à la variété des cytochromes *c* bactériens, tous les cytochromes de type *c* des cellules végétales sont mono-hémiques. Les quatre cytochromes *c* trouvés dans les plantes sont décrits ci-dessous.

3.3.1. Le cytochrome *c*

Le cytochrome *c* est une petite protéine de 12,5 kDa qui se situe dans l'espace intermembranaire des mitochondries végétales. Contrairement aux autres protéines de la chaîne de transfert d'électrons, le cytochrome *c* n'est pas associé à un complexe membranaire unique. Il transfère les électrons du complexe III (ubiquinol-cytochrome *c* oxydoréductase) au complexe IV (cytochrome *c* oxydase) de la chaîne respiratoire mitochondriale.

Cette protéine est le sujet de nombreuses études en raison de son rôle dans l'induction de la cascade apoptotique qui existe dans de nombreux systèmes animaux mais aussi dans certains systèmes végétaux comme les cellules de tabac cultivées en présence de ménadione (Sun *et al.*, 1999). Chez les mammifères, trois voies indépendantes liant la mitochondrie à l'apoptose ont été décrites (Wang, 2001). Chacune de ces voies est initiée par le relargage d'une protéine mitochondriale dans le cytoplasme, le cytochrome *c* déclenchant la voie des caspases (Liu *et al.*, 1996), le facteur induisant l'apoptose (AIF, une flavoprotéine) ou l'endonucléase G (Li *et al.*, 2001). Chez les plantes, des monodéhydroascorbate déshydrogénases ont été identifiées comme homologues d'AIF, mais leur rôle dans la mort cellulaire programmée n'a pas été démontré. Aucun homologue de l'endonucléase G n'a été trouvé chez les plantes. Récemment, une activité DNase potentiellement impliquée dans la mort cellulaire programmée a été mise en évidence dans l'espace intermembranaire des

mitochondries d'*Arabidopsis thaliana* (Balk *et al.*, 2003). Normalement, le cytochrome *c* est localisé dans l'espace intermembranaire des mitochondries. Pendant le processus apoptotique, il est localisé dans le cytosol où il active des caspases ou des protéases de type caspase (protéase de type cystéinyl-aspartate), ce qui résulte en un clivage oligonucléosomal de l'ADN. Le relargage du cytochrome *c* mitochondrial a été décrit pendant les processus de mort cellulaire programmée dans différentes plantes : le tournesol (Balk and Leaver, 2001), le concombre (Balk *et al.*, 1999), les cellules de maïs (Stein and Hansen, 1999) et les cellules de tabac (Balk *et al.*, 1999). En parallèle, la mort cellulaire programmée peut être réprimée par des inhibiteurs de caspases (Lam and del Pozo, 2000) mais aucun homologue de caspases n'a été identifié dans le génome d'*A. thaliana* (Arabidopsis Genome Initiative, 2000). L'hypothèse actuelle serait que des métacaspases (Uren *et al.*, 2000) ou d'autres protéases (Beers *et al.*, 2000) joueraient le rôle central dans la mort cellulaire programmée chez les plantes.

3.3.2. Le cytochrome *c*₁

Le cytochrome *c*₁ est un composant du complexe *bc*₁ (ubiquinol-cytochrome *c* oxydoréductase ou complexe III) de la chaîne respiratoire. Le cytochrome *c*₁ est une protéine de 31 kDa possédant une région C-terminale hydrophobe qui lui permet de s'associer à la membrane mitochondriale interne. Son domaine N-terminal hydrophile, portant l'hème, est orienté vers l'espace intermembranaire (Iwata *et al.*, 1998). Le cytochrome *c*₁ transfère directement ses électrons au cytochrome *c*.

3.3.3. Le cytochrome *c*₆

Le cytochrome *c*₆ est présent dans le lumen des thylakoïdes des chloroplastes où il transfère les électrons du complexe *b₆f* vers le photosystème I (PSI). Chez certaines algues et cyanobactéries, il remplace la plastocyanine en absence de cuivre. Récemment chez *A. thaliana*, il a été découvert par des tests de reconstitution de transport d'électrons qu'Atc6, une protéine ressemblant au cytochrome *c*₆ peut remplacer la plastocyanine dans le processus de transport d'électron lors de la photosynthèse. Une analyse génétique a montré que ni la plastocyanine, ni Atc6 n'étaient indispensables à la croissance et le développement d'*A. thaliana*, mais qu'une plante ne possédant ni l'un ni l'autre ne pouvait pas survivre (Gupta *et al.*, 2002).

3.3.4. Le cytochrome *f*

Le cytochrome *f* diffère des autres cytochromes de type *c* par sa taille et sa structure. C'est une protéine de 32 kDa qui possède une structure en feuillet β (Sabahi and Wittung-Stafshede, 2002). Elle est le principal composant du complexe photosynthétique b_6f localisé au niveau de la membrane des thylakoïdes des chloroplastes avec son domaine hydrophile orienté vers le lumen. Le cytochrome *f* participe au transfert des électrons entre les centres réactionnels photosynthétiques et les translocases de protons qui créent un potentiel électrochimique utilisé lors de la synthèse d'ATP. Le complexe chloroplastique b_6f est l'analogue fonctionnel du complexe bc_1 de la chaîne respiratoire mitochondriale (Soriano *et al.*, 1999).

4. La maturation des cytochrome de type *c*

La maturation des cytochromes de type *c* est le processus qui permet de rendre un polypeptide linéaire inactif, l'apocytochrome, en un polypeptide fonctionnellement actif possédant un ou plusieurs hèmes actifs liés de manière covalente, l'holocytochrome (Thöny-Meyer, 2002). Pour cela, il faut que l'hème et l'apocytochrome soient transportés sur le site de leur assemblage qui est localisé là où l'holocytochrome *c* sera fonctionnel, à savoir le périplasma des bactéries, l'espace intermembranaire des mitochondries ou le lumen des thylakoïdes des chloroplastes. Ensuite, la liaison covalente entre les groupements vinyles de l'hème et les thiols des cystéines du motif Cyc-Xxx-Xxx-Cys-His de l'apocytochrome doit être réalisée. Il a été montré que les cystéines de l'apocytochrome doivent être réduites pour la création de cette liaison (Tong and Margoliash, 1998; Setterdahl *et al.*, 2000). Il a aussi été démontré que l'atome de fer de l'hème doit également être réduit (Nicholson and Neupert, 1989). L'atome de fer incorporé dans l'hème est réduit lors des dernières étapes de la biosynthèse de l'hème. Les résidus cystéinyles de l'apocytochrome sont réduits lorsque le polypeptide quitte le ribosome, l'état réduit des deux substrats doit être maintenu car le milieu du compartiment dans lequel les deux substrats sont secrétés est oxydant (Kranz *et al.*, 1998).

Trois systèmes distincts de maturation des cytochromes de type *c* ont été mis en évidence par des études génétiques, génomiques et biochimiques. Ces trois systèmes

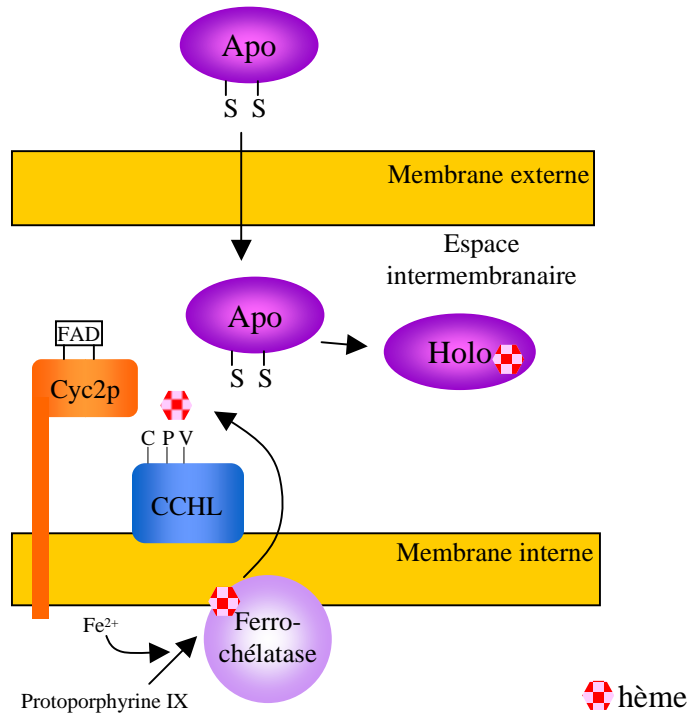


Figure i5 : Représentation schématique du System III pour la maturation des cytochromes de type *c*. Ce système est utilisé par les mitochondries de champignons, de vertébrés et d'invertébrés (Kranz et al., 1998). La cytochrome *c* hème lyase (CCHL) est impliquée dans le transport de l'apocytochrome *c* dans la mitochondrie. Elle est essentielle pour la ligature de l'hème. Le motif CPV de l'hème lyase est un site de fixation réversible de l'hème. Cyc2p permettrait de maintenir les différents partenaires réduits.

possèdent une complexité variable (Kranz *et al.*, 1998; Thöny-Meyer, 2002; Thöny-Meyer, 1997; Page *et al.*, 1998).

4.1. Le système III

C'est le mécanisme le plus simple développé pour la maturation des cytochromes de type *c*. Il est présent dans les mitochondries de certains champignons, d'invertébrés et de vertébrés (Figure i5). Deux cytochromes de type *c*, le cytochrome *c* et le cytochrome *c*₁ y sont toujours présents. L'organisme modèle pour ce système est la levure.

4.1.1. Translocation des apocytochromes

Dans la levure, l'apocytochrome *c* ne possède pas d'extension N-terminale susceptible d'être une séquence d'adressage mitochondrial. Son importation dans les mitochondries nécessite la présence du complexe TOM, l'apocytochrome *c* interagissant avec la partie interne du complexe contenant TOM40 et un récepteur localisé du côté interne de la membrane externe, la cytochrome *c* hème lyase (Diekert *et al.*, 2001). C'est la conformation d'ensemble de l'apocytochrome qui est responsable de l'adressage mitochondrial. Deux segments internes sont également nécessaires à cet adressage. Après son insertion dans la membrane externe par le complexe TOM, l'apocytochrome *c* interagit avec l'hème lyase (CCHL pour cytochrome c hème lyase), l'enzyme qui lui attache l'hème pour le convertir en holocytochrome *c*. La fixation de l'hème est indispensable à la translocation de l'apocytochrome à travers la membrane externe (Figure i6) (Stuart *et al.*, 1990). Des mutants de CCHL sont incapables d'accumuler de l'apocytochrome *c* à des niveaux proches du niveau normal (Dumont *et al.*, 1988; Nargang *et al.*, 1988; Dumont *et al.*, 1991).

L'import de l'apocytochrome *c*₁ est différent de celui de l'apocytochrome *c*. L'apocytochrome *c*₁ possède une préséquence d'adressage bipartite qui est clivée en deux temps lors de son importation. Tout d'abord, l'apocytochrome *c*₁ est importé dans la matrice en suivant la voie générale d'importation, la première partie de la préséquence d'adressage étant alors clivée. La deuxième partie de la préséquence sert de signal d'exportation vers l'espace intermembranaire. L'apocytochrome *c*₁ reste associé à la membrane par sa queue C-terminale hydrophobe. Dans l'espace intermembranaire, la deuxième partie de la préséquence est clivée. Puis la cytochrome *c*₁ hème lyase (CC₁HL) fixe l'hème sur l'apocytochrome pour

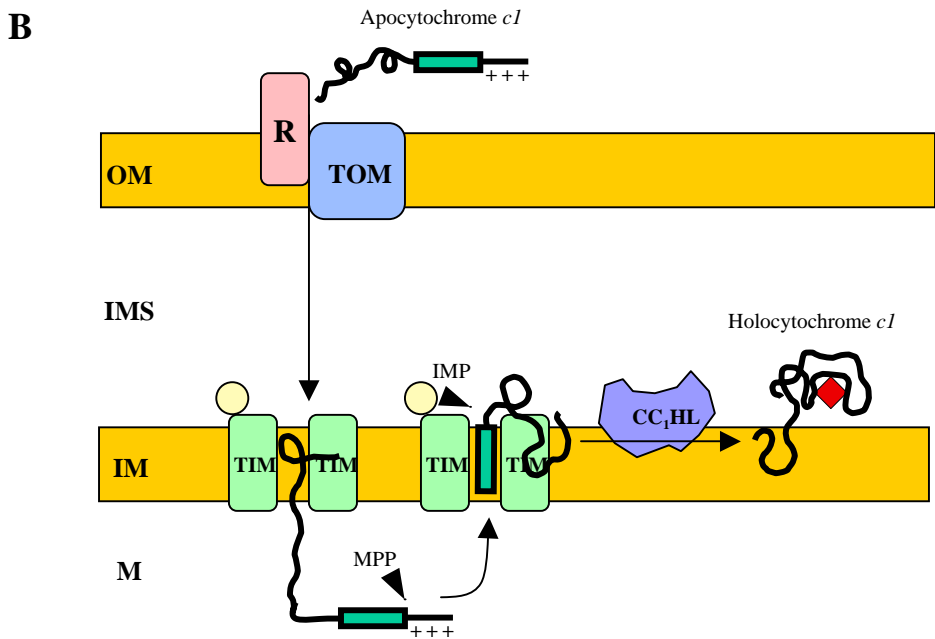
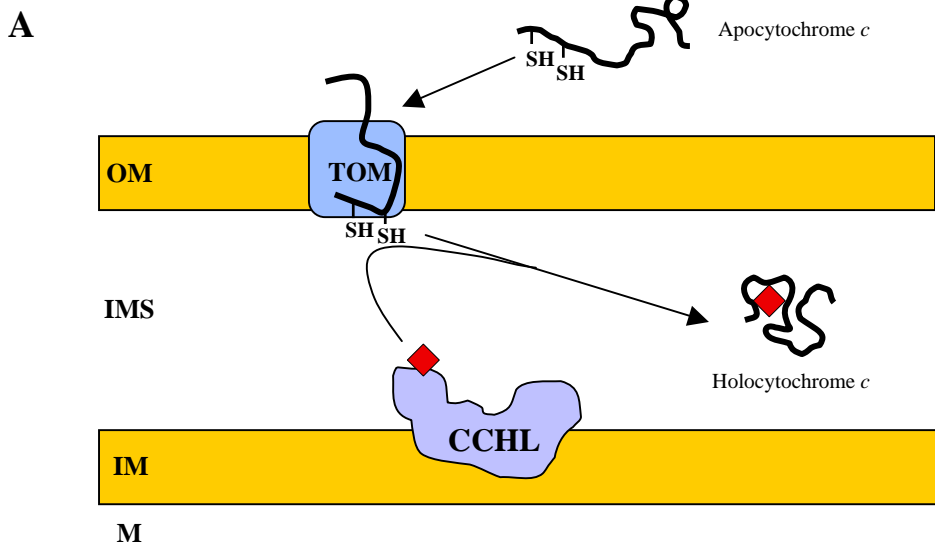


Figure i6 : Import de l'apocytochrome *c* (A) : il nécessite la translocase de la membrane externe (TOM) et la cytochrome *c* hème lyase (CCHL). Import de l'apocytochrome *c*₁ (B) : il utilise le complexe TOM et la translocase de la membrane interne (TIM) (d'après Diekert et al., 2001).

R : récepteur

OM : membrane externe

IMS : espace intermembrane

IM : membrane interne

M : matrice

MPP : peptidase matricielle de maturation

IMP : protéase de la membrane interne

former l'holocytochrome c_1 (Figure i6) (Stuart *et al.*, 1990; Steiner *et al.*, 1996). Des mutants de levure déficients en CC₁HL ont été identifiés. Ils accumulent de l'apocytochrome c_1 qui ne possède que la seconde partie de la préséquence et n'a pas d'hème attaché de manière covalente. Ceci indique un rôle de l'hème lyase dans la translocation de l'apocytochrome c_1 à travers la membrane interne et dans l'attachement covalent de l'hème (Zollner *et al.*, 1992).

4.1.2. Liaison de l'hème

La liaison de l'hème sur l'apocytochrome est réalisée par une hème lyase (Figure i5). Ce type d'enzyme est fortement spécifique de son substrat. En effet, chez *S. cerevisiae*, il existe une cytochrome c_1 hème lyase (CC₁HL) pour le cytochrome c_1 et une cytochrome c hème lyase (CCHL) pour le cytochrome c (Dumont *et al.*, 1987; Nargang *et al.*, 1988; Zollner *et al.*, 1992). Des mutants des hème lyases sont déficients en holocytochrome c , indiquant que les hème lyases ont un rôle important dans la formation des holocytochromes c . Il a été démontré que le substrat de l'hème lyase est l'hème sous forme réduite (Nicholson and Neupert, 1989). La CC₁HL est incapable de former de l'holocytochrome c alors que la CCHL peut synthétiser de faibles niveaux d'holocytochrome c_1 (Bernard *et al.*, 2003). L'activité de formation d'apocytochrome c_1 par CCHL peut être augmentée par :

- la réduction de la quantité d'apocytochrome c
- l'augmentation de l'accumulation de la CCHL
- la modification de l'interaction enzyme-substrat par des mutations ponctuelles dans la CCHL ou l'apocytochrome c
- la surproduction de Cyc2p, une protéine possédant un domaine de liaison du FAD qui interagit avec CCHL (Bernard *et al.*, 2003). Cyc2p jouerait un rôle dans le maintien à l'état réduit des groupements impliqués dans la liaison hème-cystéines.

Une seule hème lyase a été retrouvée dans les mitochondries humaines ou de souris. Cette hème lyase est responsable de la formation des holocytochromes c et c_1 . L'origine des hème lyases n'est pas encore déterminée bien qu'une recherche intensive d'homologues bactériens ait été réalisée (Allen *et al.*, 2003).

L'analyse des séquences peptidiques des hèmes lyases de levure, de souris et d'homme montre une identité de 35% entre les différentes protéines. Le domaine C-terminal est le plus conservé, indiquant un rôle dans la fonction de ces protéines. Dans le premier tiers de ces protéines, aucune similarité importante n'existe, à l'exception du motif C-P-V présent une

Protéine	Séquence du motif caractéristique	Fonction putative	Autre nomenclature		
Système I : α- andy -protéobactéries, Archae, mitochondries de plantes et de quelques protistes					
<i>E. coli</i>					
CcmA	motifs Walker-A and -B	sous unité liant l'ATP d'un transporteur ABC	<i>R. capsulatus</i>	<i>B. japonicum</i>	<i>A. thaliana</i>
CcmB	FXDXDXDGSL	domaine transmembranaire (transporteur ABC)	HelA	CycV	CCMA
CcmC	WGXXWXXWDXRLTS	CcmE hème Lyase	HelB	CycW	CcmB
CcmD		Stabilise CcmE	HelC	CycZ	CcmC
CcmE	LPDLFR and LAKHDE	Chaperon d'hème	Held	CycX	
CcmF	WGXWFWDPVEN	"Hème lyase"	CycJ	CycJ	CCME
CcmG	WCXXC	Réduction de CcmH	CeI1	CycK	CcmF ₁ , CcmF ₂ , CcmF ₆
CcmH	LRXXC	Réduction des cytéines de l'apoocytochrome	HelX	CycY	
			CeI2	CycL	CCMH
			CycH	CycH	
Système II : bactéries Gram-positive, cyanobactéries, chloroplastes					
<i>C. reinhardtii</i>					
	WXXXWXXWDPKET	Lie l'hème, interagit avec CCS1	<i>B. pertussis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>A. thaliana</i>
CcsA		Lie l'hème, interagit avec CCS1	CcsA	ResC	CcsA
CCS1		Lie l'apoprotéine, interagit avec CcsA thiorédoxine, réduit l'apoocytochrome	CcsB	ResB	CCS1
CCS2			CcsX	ResA	HCF164
CCS3					
CCS4					
CCS5					
CcdA	G-X5-S/TPC-X5-P and G-X7-S/TPC	transfère les électrons	DipZ (DsbD)	CcdA	CCDA
Système III : Mitochondries de champignons, d'invertébrés et de vertébrés					
CCHL	CPV, PS00821, PS00822	Hème lyase			
CGHL	CPV, PS00821, PS00822	Hème lyase			
Cyc2	motif de fixation du FAD	maintien du milieu réduit			

Tableau i1 : Protéines impliquées dans les trois systèmes de maturation des cytochromes de type c.

fois dans CC₁HL et trois fois dans CCHL. Ce motif C-P-V sert de site de liaison réversible de l'hème (Steiner *et al.*, 1996). Ce motif est aussi présent chez d'autres protéines liant l'hème, tel le facteur de transcription Hap1 ou l'hème oxygénase-2 (McCoubrey *et al.*, 1997; Zhang and Guarente, 1995). Le mode d'action des hème lyases n'est pas connu.

4.1.3. Caractérisation *in vitro* de l'activité hème lyase

Un système *in vitro* a été développé pour mesurer la formation d'holocytochromes *c* par une hème lyase (Tong and Margoliash, 1998). Ce système utilise des mitochondries sur-exprimant une hème lyase et de l'apocytochrome *c* synthétisé *in vitro*. Ainsi en présence de protéines mitochondriales de levure, covalente et d'un agent réducteur tel que le DTT, l'apocytochrome *c* peut être converti en holocytochrome *c*. En utilisant ce système, les auteurs ont pu montrer que l'addition d'un agent réducteur stimule la production d'holocytochrome *c*. Si des mitochondries issues d'une souche sans hème lyase sont utilisées, aucun holocytochrome *c* n'est formé. Des apocytochromes *c* ponctuellement mutés au niveau des cystéines du motif CXXCH de liaison de l'hème, ont aussi été utilisés. Si la première cystéine du motif est remplacée, de l'holocytochrome *c* peut quand même être formé. Si la deuxième cystéine est remplacée, on ne détecte que des traces d'holocytochrome *c*. Par contre si les deux cystéines sont absentes, l'holocytochrome *c* ne sera pas formé. De plus, l'holocytochrome *c* est un inhibiteur compétitif de ce système *in vitro* (Tong and Margoliash, 1998).

4.2. Le système I bactérien

Ce système de maturation des cytochromes de type *c* est utilisé par des α - et γ -protéobactéries comme *Rhodobacter capsulatus* (Kranz, 1989; Beckman *et al.*, 1992; Beckman and Kranz, 1993; Lang *et al.*, 1996), *Bradyrhizobium japonicum* (Ramseier *et al.*, 1991; Ritz *et al.*, 1993; Ritz *et al.*, 1995), *Paracoccus denitrificans* (Page and Ferguson, 1995; Page and Ferguson, 1997; Page *et al.*, 1997) ou *Escherichia coli* (Thöny-Meyer *et al.*, 1995), mais aussi par les mitochondries de quelques protozoaires (Lang *et al.*, 1997) ou de plantes (Kranz *et al.*, 1998). Des analyses génétiques et biochimiques ont permis d'identifier 8 à 9 gènes impliqués dans l'assemblage des cytochromes de type *c*. Les différents noms des gènes impliqués et la nomenclature sont présentés dans le Tableau i1 (Thöny-Meyer, 1997; Kranz *et al.*, 1998; Page *et al.*, 1998). Pour des raisons de simplicité, nous avons retenu la

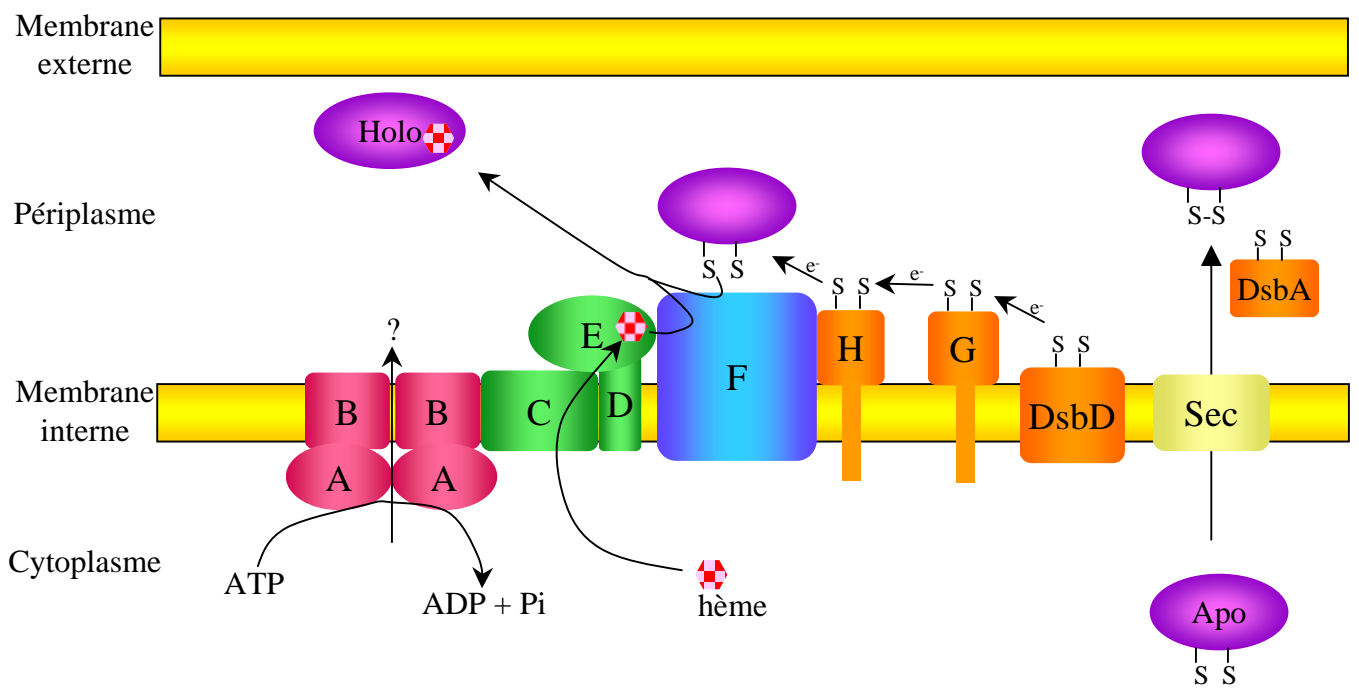


Figure i7 : Représentation schématique du système I pour la maturation des cytochromes de type *c* retrouvé chez les α - et γ -protéobactéries. Ce modèle est construit d'après les études chez *E. coli*. Les protéines A à H sont les protéines Ccm (Cytochrome c maturation). DsbA et DsbD sont des protéines, respectivement, oxydant des dithiols ou réduisant des disulfures. Ce système peut être divisé en deux voies fonctionnelles : une voie de livraison de l'hème et une voie de réduction de l'apocytochrome.

Sec : voie de sécrétion des protéines dans le périplasme, la séquence d'adressage étant clivée après l'exportation de la protéine

Apo : apocytochrome *c*

Holo : holocytochrome *c*

nomenclature *ccm* (pour cytochrome c maturation) (Cette nomenclature est explicitée en Annexe 1). Les gènes *ccmA* – *ccmH* sont organisés en un opéron chez *E. coli*, l'organisme modèle pour le système I, en deux opérons chez *B. japonicum* et en quatre opérons chez *R. capsulatus*. Le système I est modélisé sous la forme de deux voies fonctionnelles qui convergent au niveau de CcmF, l'hème lyase putative du système I (Figure i7) :

- une voie de livraison de l'hème comprenant CcmC, CcmD et CcmE,
 - une voie de réduction des cystéines de l'apocytochrome impliquant CcmG et CcmH.
- CcmA et CcmB forment un transporteur ABC dont le rôle n'est pas déterminé.

4.2.1. Le transporteur ABC

L'analyse des séquences peptidiques de CcmA et de CcmB suggère qu'elles sont respectivement la sous-unité liant l'ATP et le domaine transmembranaire d'un transporteur de type ABC (Ramseier *et al.*, 1991; Beckman *et al.*, 1992). Le substrat de ce transporteur est inconnu à l'heure actuelle. Dans des mutants $\Delta ccmA$ ou $\Delta ccmB$, l'apocytochrome est toujours exporté dans le périplasme, un substrat possible de ce transporteur pourrait être l'hème (Beckman *et al.*, 1992). Aucune donnée expérimentale ne confirme cependant cette hypothèse. Deux modèles ont été présentés pour le rôle et la composition de ce transporteur ABC.

- Dans le premier modèle, le transporteur est formé par CcmABCD avec un dimère de CcmA comme domaine liant l'ATP, CcmB, CcmC et CcmD formant les domaines transmembranaires (CcmB et CcmC comportent toutes les deux six domaines transmembranaires, CcmD un seul) (Page *et al.*, 1997; Goldman *et al.*, 1997). Trois expériences vont dans le sens de cette hypothèse. La première est une co-immunoprécipitation de CcmA avec CcmC-lacZ ou CcmD-lacZ en utilisant des anticorps anti-lacZ. Des tests de stabilité chez *R. capsulatus* ont montré que CcmA n'était pas stable dans des mutants *ccmB* ou *ccmC*. Enfin, un mutant *ccmAB* d'*E. coli* est incapable de transférer l'hème à CcmE.

- Le second modèle propose un transporteur ABC hétérodimérique (CcmAB)₂ qui transporte un substrat probablement nécessaire à la réduction de l'hème. Ainsi, l'hème serait transporté par CcmC et CcmD. Cette hypothèse est confirmée par le fait que la surexpression de CcmC dans des bactéries d'*E. coli* $\Delta ccmA$ ou $\Delta ccmB$ permet d'observer le transfert de l'hème sur CcmE (Schulz *et al.*, 1999). L'hème ne serait donc pas le substrat du transporteur ABC.

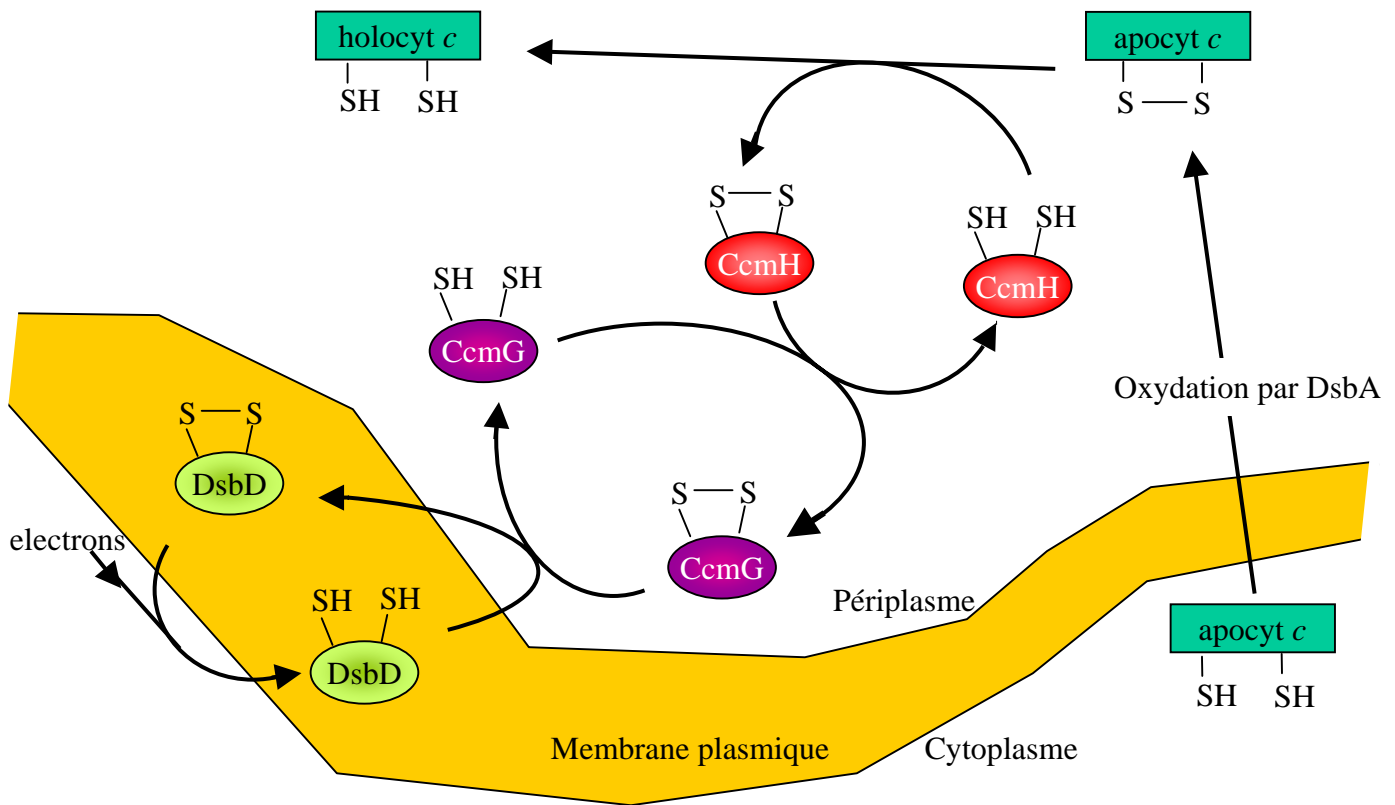


Figure i8 : Modèle de la voie de réduction des apocytochromes chez *E. coli*. Les électrons réduisant DsbD proviennent d'une thiorédoxine cytoplasmique. DsbD transfère les électrons à travers la membrane plasmique.

4.2.2. La voie de livraison de l'hème

CcmC joue un rôle important dans le transport de l'hème. En effet, cette protéine possède un domaine de liaison de l'hème : le domaine conservé WWD (motif riche en tryptophane) qui est entouré par des histidines essentielles (Gaballa *et al.*, 1998; Goldman *et al.*, 1998). Il a été montré que CcmC est le seul composant essentiel pour la liaison covalente de l'hème sur CcmE, un chaperon d'hème périplasmique. De plus, les acides aminés de CcmC orientés vers le périplasma sont essentiels pour l'interaction entre CcmC et CcmE. CcmC a été décrit comme une CcmE hème lyase (Ren and Thöny-Meyer, 2001). CcmD stabilise CcmE dans les membranes (Schulz *et al.*, 1999).

Il a été démontré que CcmE est un chaperon d'hème qui lie l'hème de manière transitoire mais covalente. Cette liaison est réalisée au niveau d'une histidine présente dans un des deux motifs conservés (Schulz *et al.*, 1998). Selon le modèle actuel, CcmE accepte l'hème de CcmC et le transfère à l'apocytochrome *c* avec l'aide de CcmFH, le complexe "hème lyase" bactérien (Thöny-Meyer, 2000; Ren *et al.*, 2002).

4.2.3. La voie de réduction

Les apocytochromes *c* sont synthétisés dans le cytoplasme puis sont exportés dans le périplasma. Après cet export, les cystéines du motif CXXCH sont oxydées par DsbA (Disulphide bond). Les protéines CcmG et CcmH sont impliquées dans la réduction des cystéines du motif CXXCH des apocytochromes *c* (Figure i8) (Fabianek *et al.*, 2000; Setterdahl *et al.*, 2000). Ces protéines transportent les électrons de la protéine DsbD vers les groupements thiols des cystéines de l'apocytochrome *c*. DsbD est une protéine transmembranaire qui a une activité de réduction et qui transfère les électrons d'une thiorédoxine matricielle vers le périplasma (Rietsch *et al.*, 1996). Il a été montré que DsbA, DsbB (la protéine qui oxyde DsbA) et DsbD étaient nécessaires à la synthèse des cytochromes de type *c* (Sambongi and Ferguson, 1994a; Sambongi and Ferguson, 1996); Metheringham *et al.*, 1996). Plusieurs protéines périplasmiques de type thiorédoxines-like (possédant un motif CXXC), dont CcmG, interagissent avec DsbD (Chung *et al.*, 2000).

CcmG possède plusieurs résidus autour du motif CXXC qui sont bien conservés lorsqu'on les aligne avec une thiorédoxine cytoplasmique d'*E. coli* Trx1 et DsbD. Ceci indique que CcmG est une thiorédoxine (Fabianek *et al.*, 2000). Un mutant d'*E.coli* possédant deux

sérines à la place des cystéines du motif CXXC produit des quantités fortement diminuées d'holocytochromes *c*. CcmG possède une forte spécificité de substrat. Elle est incapable de réduire l'insuline dans un test de réduction *in vitro* (Fabianek *et al.*, 1997; Monika *et al.*, 1997) et elle n'a pas d'influence sur l'activité de la phosphatase alcaline, une protéine qui nécessite la formation de deux ponts disulfures intramoléculaires pour être active (Fabianek *et al.*, 1997; Page and Ferguson, 1997).

CcmH est une protéine bipartite chez *E. coli*. Cette protéine est une fusion entre un domaine N-terminal correspondant à Ccl2 de *R. capsulatus* ou CycL de *B. japonicum* et un domaine C-terminal similaire à CycH de *R. capsulatus* ou *B. japonicum*, qui sont généralement trouvés chez les autres bactéries Gram⁻ (Fabianek *et al.*, 1999). Le domaine CycL, porte le motif CXXC. Une analyse fonctionnelle a montré que dans des conditions anaérobies (quand *E. coli* synthétise les cytochrome de type *c*) la deuxième cystéine du motif CXXC est la seule essentielle mais que les deux sont nécessaire en conditions aérobies (Fabianek *et al.*, 1999). Une approche *in vitro* a permis de mettre en évidence que la protéine Ccl2 de *R. capsulatus* est capable de réduire le domaine de liaison de l'hème de l'apocytochrome *c* (Monika *et al.*, 1997). Ce domaine CycL participe donc à la réduction du site de fixation de l'hème des apocytochromes *c* en transférant les électrons issus de CcmG (Fabianek *et al.*, 2000; Setterdahl *et al.*, 2000; Reid *et al.*, 2001). Le domaine CycH (CcmI) a une fonction hypothétique de chaperon d'apocytochrome *c*, elle présenterait l'apocytochrome pour la liaison de l'hème (Ritz *et al.*, 1993; Page and Ferguson, 1995); (Lang *et al.*, 1996). Ce domaine n'est pas nécessaire à la formation d'apocytochrome *c* chez *E. coli* (Fabianek *et al.*, 1999) mais l'est à la formation de cytochromes *c* chez *B. japonicum* et *P. denitrificans* (Ritz *et al.*, 1995; Gaballa *et al.*, 1996). Le domaine N-terminal de la protéine CycH de *Sinorhizobium meliloti* est capable de compléter l'accumulation de protoporphyrine IX observée dans un mutant *cycH*, suggérant que ce domaine est impliqué dans les dernières étapes de la synthèse de l'hème C (Cinege *et al.*, 2004). Le domaine C-terminal de cette protéine contient trois domaines TPR (TetraTricoPeptide) qui sont connus pour intervenir dans les interactions protéine-protéine, indiquant leur rôle possible de chaperon d'apocytochrome (Cinege *et al.*, 2004). La réduction de la production d'holocytochrome *c* due à une absence de CycH peut être complétée en sur-exprimant CcmFH (Deshmukh *et al.*, 2002).

4.2.4. CcmF, l'hème lyase putative

Les mutants *ccmF* ne possèdent pas d'holocytochromes *c* et accumulent de l'holoCcmE. Dans ces mutants, il est impossible de décrocher l'hème de CcmE suggérant que CcmF joue un rôle dans les dernières étapes de la maturation des cytochromes *c* (Schulz *et al.*, 1999). CcmF est une protéine intégrale de la membrane plasmique bactérienne, elle possède dix domaines transmembranaires prédits (Goldman *et al.*, 1998). Des expériences de co-immunoprécipitation chez *E. coli* ont montré que CcmF interagit avec CcmE et CcmH mais pas avec l'apocytochrome *c* (Ren *et al.*, 2002). Le mécanisme par lequel CcmF décroche l'hème de CcmE et le transfère sur l'apocytochrome n'est pas encore élucidé. Il est probable que CcmH soit responsable du recrutement de l'apocytochrome *c* par l'intermédiaire de son domaine C-terminal CcmI (Ren *et al.*, 2002).

4.2.5. L'opéron *nrf*

Chez *E. coli*, l'opéron *nrf* (Nitrite Reduction by Formate) est constitué de sept gènes dont les deux premiers, *nrfA* et *nrfB* codent pour NrfA, un cytochrome *c* périplasmique de 50 kDa (Darwin *et al.*, 1993) et NrfB, un cytochrome *c* de 18 kDa (Iobbi-Nivol *et al.*, 1994). Ces cytochromes *c* sont produits lors de cultures anaérobies d'*E. coli* en présence de nitrite ou de nitrate (Fujita and Sato, 1966). NrfC et NrfD sont similaires à des transporteurs d'électrons (Hussain *et al.*, 1994). NrfE et NrfF sont, respectivement, similaire à Ccl1 et Ccl2 de *R. capsulatus*, ou à CycK et CycL de *B. japonicum*, ou à CcmF et au domaine N-terminal de CcmH d'*E. coli*. Ces protéines sont essentielles pour la biosynthèse des cytochromes de type *c*. Elles ont une fonction potentielle d'hème lyase (Beckman *et al.*, 1992; Thöny-Meyer *et al.*, 1994; Kereszt *et al.*, 1995; Ritz *et al.*, 1995; Thöny-Meyer *et al.*, 1995). Les topologies prédites de NrfE et NrfF correspondent à celles de CcmF et CcmH et sont ainsi en agrément avec leur fonction potentielle. NrfG a des similarités avec CycH (environ 20% d'identité). Ceci indique que NrfEFG peuvent avoir un rôle dans l'assemblage de NrfA et de NrfB. Mais, des expériences ont montré qu'une souche bactérienne n'exprimant plus NrfEFG pouvait toujours synthétiser des cytochromes de type *c* induits par le nitrite (Grovc *et al.*, 1996). Les souches ne possédant pas NrfE ou NrfG ont un phénotype Nrf⁻, alors que les souches ne possédant pas NrfF ont un phénotype Nrf⁺. Ceci indique que NrfE et NrfG ont un rôle dans l'assemblage d'un complexe fonctionnel pour la réduction du nitrite qui est dépendante du formate (Grovc *et al.*, 1996).

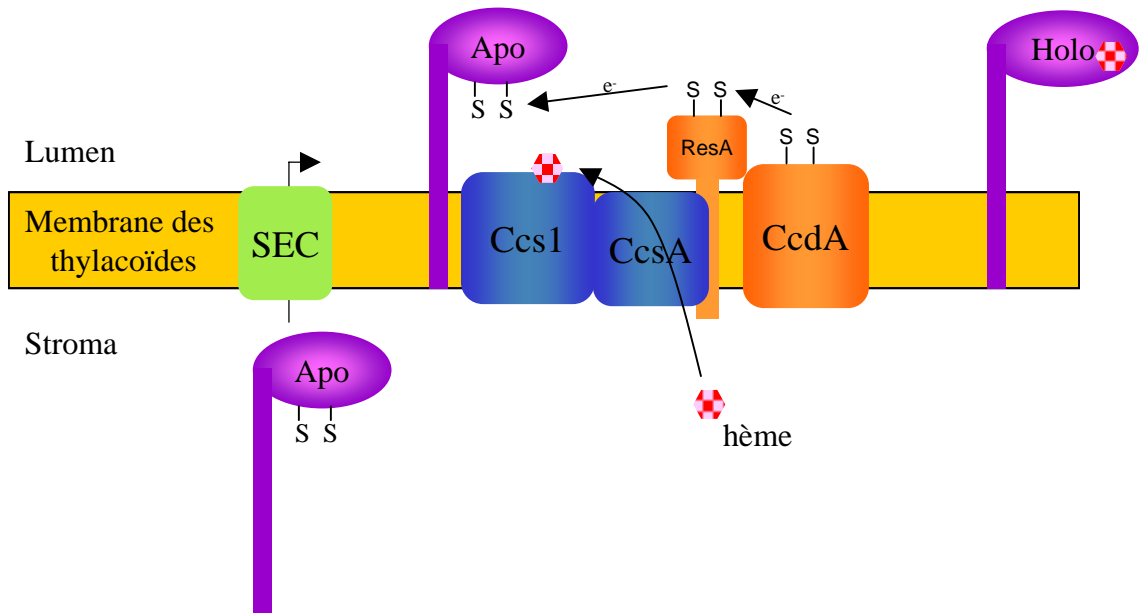


Figure i9 : Représentation schématique du système II pour la maturation des cytochromes de type *c* dans les chloroplastes, les bactéries Gram⁺, les cyanobactéries et les ϵ -protéobactéries. Comme pour le système I, le système II est composé de deux voies : une voie de livraison de l'hème et une voie de réduction des cystéines de l'apocytochrome.

SEC : système d'exportation des protéines périplasmique

Apo : Apocytochrome

Holo : Holo-cytochrome

4.3. Le système II

Le système II ressemble au système I mais aucun transporteur ABC n'a été décrit comme intervenant dans ce processus (Figure i9). Le système II est retrouvé chez certaines bactéries Gram⁻ (β - et ϵ -protéobactéries comme *Helicobacter pylori*), les bactéries Gram⁺ (*Bacillus subtilis*, *Bordetella pertussis*), les cyanobactéries et les chloroplastes (Nakamoto *et al.*, 2000; Kranz *et al.*, 2002).

Une analyse génétique de mutants déficients en cytochrome de type *c* au niveau du plaste de l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii* (le cytochrome *f* et le cytochrome *c₆*) montre que cinq gènes nucléaires (*CCSI-CCS5*, *C₂cytochrome c₆ synthesis*) et un gène plastidique *ccsA* sont impliqués dans la biogenèse de ces cytochromes de type *c* (Howe and Merchant, 1992; Xie and Merchant, 1996; Xie *et al.*, 1998; Nakamoto *et al.*, 2000).

La protéine produite par le plaste, CcsA, possède cinq hélices transmembranaires (Hamel *et al.*, 2003), un motif riche en tryptophane et des résidus histidine conservés qui sont semblables à ceux décrits pour CcmC et CcmF (Beckman *et al.*, 1992; Thöny-Meyer *et al.*, 1995; Goldman *et al.*, 1998; Ritz *et al.*, 1995). Seuls le motif riche en tryptophane et les histidines sont conservés entre CcsA, CcmC et CcmF. CcsA semble être plus proche phylogénétiquement de CcmC que de CcmF sur la base d'alignements de séquence et de prédictions de topologie. Ceci suggère que CcsA a un rôle possible dans la livraison de l'hème.

Le locus nucléaire *CCS1* code pour une protéine contenant trois domaines transmembranaires hypothétiques dans son domaine N-terminal et une région C-terminale hydrophile localisée dans le lumen des thylakoïdes (Xie *et al.*, 1998). Des mutants *ccs1* synthétisent des apocytochromes mais sont incapables de fixer l'hème pour produire des holocytochromes. Ccs1 n'est pas aussi conservée que CcsA mais elle n'existe que dans les organismes où CcsA est présente. Ceci suggère que Ccs1 joue un rôle dans la maturation des cytochromes de type *c* (Nakamoto *et al.*, 2000). Ccs1 et CcsA interagissent dans un complexe. Il a été montré que Ccs1 et CcsA sont détectés dans un complexe de 200 kDa, et que Ccs1 ne s'accumule pas à un niveau normal dans les mutants *ccsA* (Dreyfuss *et al.*, 2003; Hamel *et al.*, 2003).

Le système II possède des similarités avec le système I, une voie de réduction maintenant les cystéines de l'apocytochrome réduites existe probablement. Chez *B. subtilis* et *Mycobacterium spp.*, deux bactéries contenant des orthologues de CcsA et de Ccs1, un gène

codant pour une protéine thioredoxine-like, *CCDA*, est associé aux gènes *ccs* (Xie *et al.*, 1998). Des mutants de *CcdA* montrent un défaut en holocytochromes *c*. *CcdA* appartient à la même famille que *DsbD*. En effet, des similarités de séquence significatives entre ces deux protéines (Schiott *et al.*, 1997a; Schiott *et al.*, 1997b). Des orthologues de *CcdA* ont été trouvés chez des cyanobactéries et certaines espèces végétales (Nakamoto *et al.*, 2000; Page *et al.*, 2004).

Le mutant *hcf164* d'*A. thaliana* est incapable d'accumuler les sous-unités du complexe *b₆f*. *HCF164* code pour une protéine thioredoxine-like. Elle est localisée dans la membrane des thylacoïdes et son site actif est orienté vers le lumen. *HCF164* possède des similarités de séquence avec *CcsX* de *B. pertussis* et *CcmG* d'*E. coli*, deux protéines périplasmiques impliquées dans la maturation des cytochromes de type *c* (Lennartz *et al.*, 2001). Ainsi *HCF164* peut être considéré comme un homologue fonctionnel de *CcsX* pour le système II de maturation des cytochromes de type *c* dans les chloroplastes.

4.4. Un système *in vitro* pour la formation d'holocytochrome *c*

La formation d'holocytochrome *c₅₅₂* a pu être réalisée *in vitro* (Daltrop *et al.*, 2002). Le cytochrome *c₅₅₂* provient d'une bactérie thermophile *Hydrogenobacter thermophilus*. Ce cytochrome est capable de lier l'hème de manière covalente lorsqu'il est exprimé dans le cytoplasme d'*E. coli* (Sambongi and Ferguson, 1994b; Sinha and Ferguson, 1998). Cette caractéristique provient de la capacité de la protéine à adopter une conformation qui peut lier l'hème (Tomlinson and Ferguson, 2000; Wain *et al.*, 2001).

Lors de l'expérience *in vitro*, le cytochrome *c₅₅₂* a été traité avec du sulfate d'argent pour décrocher l'hème. L'apocytochrome ainsi obtenu est maintenu à l'état réduit par ajout de DTT. L'hème (Porphyrine-Fer) a été réduit avec du dithionite de sodium. L'apoprotéine et l'hème sont mélangés et incubés à 25°C à l'obscurité. La cinétique de formation d'holocytochrome *c* est suivie par spectrophotométrie à des longueurs d'onde caractéristiques de l'intermédiaire cytochrome de type *b* et du cytochrome *c₅₅₂*. Ainsi les auteurs ont démontré que lorsqu'ils sont mélangés dans des conditions réductrices, l'apocytochrome et l'hème forment tout d'abord un cytochrome de type *b* puis un cytochrome de type *c*. Ceci montre que les holocytochromes de type *c* peuvent se former *in vitro* sans l'intervention des protéines responsables de la maturation de ces cytochromes.

Ensuite, les auteurs ont testé leur système *in vitro* avec des cytochromes *c* qui sont maturés par deux systèmes différents, le cytochrome *c* de cœur de cheval (maturé par le

système III) et le cytochrome c_{550} de *Paracoccus denitrificans* (maturé par le système I). La formation d'holocytochromes c a été détectée pour les deux cytochromes testés dans les conditions *in vitro* identiques à celles décrites pour le cytochrome c_{552} d'*H. thermophilus*. A chaque fois, la formation d'holocytochrome c se fait avec un intermédiaire cytochrome de type b (Daltrop and Ferguson, 2003).

Ce système *in vitro* a permis de mettre en évidence la formation d'un pont disulfure entre les deux cystéines du motif CXXCH de l'apocytochrome lorsque ce dernier n'est pas placé dans un environnement réducteur (Daltrop and Ferguson, 2003). La démonstration de la formation *in vitro* de cytochromes de type c aura sûrement une incidence sur la compréhension des mécanismes de maturation des cytochromes de type c .

5. Le système I dans les mitochondries de plantes

5.1. Le génome mitochondrial

La taille des génomes mitochondriaux varie de moins de 6 kb chez *Plasmodium falciparum* à 16 kb pour les génomes mitochondriaux d'animaux (Anderson *et al.*, 1981; Bibb *et al.*, 1981) et jusqu'à plus de 500 kb pour les génomes mitochondriaux de plantes terrestres (Fauron *et al.*, 2004). Le plus grand génome mitochondrial de plante séquencé pour l'instant est celui d'*A. thaliana* dont la taille est de 366 924 bp (Unsold *et al.*, 1997). Il est à peu près trois fois plus petit que le génome de *Rickettsia prowazekii*, le plus proche ancêtre des mitochondries (Andersson *et al.*, 1998). Par contre, le génome mitochondrial d'*A. thaliana* ne code que pour un petit nombre de protéines (32) comparé à celui des protéines codées par le génome de *R. prowazekii* (834). Ce faible pourcentage de protéines codées est dû à la présence d'une forte proportion de séquences non codantes (>80%) (24% pour *R. prowazekii*) (Gray *et al.*, 1999). Les gènes présents sur le génome mitochondrial d'*A. thaliana* peuvent être classés en deux groupes, ceux codant pour des éléments du métabolisme mitochondrial (des composants des complexes respiratoires et des protéines impliquées dans la biogenèse des cytochromes de type c) et ceux impliqués dans la machinerie traductionnelle (protéines ribosomale, ARNr, ARNt) (Tableau i2).

Gène	Nombre de gènes						
	<i>A. t</i>	<i>M. p</i>	<i>P. w</i>	<i>C. c</i>	<i>R. a</i>	<i>S. c</i>	<i>H. s</i>
Métabolisme mitochondrial							
Complexes respiratoires							
Complex I	9	8	9	7	12	0	7
Complex II	0	2	0	3	3	0	0
Complex III	1	1	1	1	1	1	1
Complex IV	3	3	3	3	3	3	3
Complex V	5	4	4	3	5	3	2
Maturation des cytochromes <i>c</i>	5	5	0	0	4	0	0
Machinerie de traduction							
Protéines ribosomales	7	16	13	4	27	1	0
ARNr	3	3	3	2	3	2	2
ARNt	22	29	26	23	26	24	22

Tableau i2 : Comparaison du contenu de différents génomes mitochondriaux.

A. t : *Arabidopsis thaliana*; *M. p* : *Marchantia polymorpha*; *P. w* *Prototheca wickerhamii*; *C. c* *Chondrus crispus*;
S. c : *Saccharomyces cerevisiae*; *R. a* : *Reclinomonas americana*; *H. s* *Homo sapiens*

5.2. Les gènes *ccm* dans les génomes mitochondriaux

Les mitochondries résultent d'un seul événement d'endosymbiose d'une bactérie pourpre photosynthétique appartenant à la classe des α -protéobactéries (Gray and Doolittle, 1982). L'organisme le plus proche des mitochondries est *R. prowazekii*, un parasite intracellulaire obligatoire (Andersson *et al.*, 1998). Ainsi cette bactérie possède le génome le plus proche des génomes mitochondriaux. Le génome de *R. prowazekii* code pour cinq protéines Ccc (ABCEF). Comme chez *R. prowazekii*, les gènes *ccmD*, *ccmG* et *ccmH* ne se retrouvent pas dans les génomes mitochondriaux. En plus, *ccmE* est absent de tous les génomes mitochondriaux séquencés (Tableau i3). Le génome mitochondrial contenant le plus grand nombre de gènes *ccm* (*ccmABCF*) est celui d'un protiste, *Reclinomonas americana*, qui possède le génome mitochondrial le plus proche des génomes bactériens (Lang *et al.*, 1997). Une algue rouge primitive, *Cyanidoschyzon merolae* possède aussi *ccmABCF* sur son génome mitochondrial (Ohta *et al.*, 1998). Une autre algue rouge, *Chondrus crispus* ne contient aucun des gènes *ccm* (Leblanc *et al.*, 1995). Des situations intermédiaires sont retrouvées chez *Malawimonas jakobiformis*, *Naegleria gruberi* et *Chara vulgaris*. Les génomes mitochondriaux de *Paramecium aurelia* (Pritchard *et al.*, 1990) et de *Tetrahymena pyriformis* (Burger *et al.*, 2000) ont perdu l'ensemble des gènes *ccm* à l'exception de *ccmF*. D'autres protistes ne possèdent pas de gènes *ccm* mitochondriaux. Malgré les informations rassemblées par le programme de séquençage des génomes d'organelles (Lang *et al.*, 1999), rien n'est connu concernant le transfert des gènes *ccm* vers le génome nucléaire, et donc, rien n'est connu concernant la maturation des cytochromes de type *c* dans ces organismes.

Chez les algues vertes, les gènes *ccm* sont absents des génomes mitochondriaux séquencés. Par contre, les gènes *ccmBCF* persistent dans les génomes mitochondriaux de bryophytes et il y a des indications de transfert de gènes *ccm* dans le génome nucléaire des angiospermes. Ainsi, les génomes mitochondriaux d'algues vertes ont du perdre leur gènes *ccm*. Chez certaines angiospermes, la traduction des transcrits de certains gènes *ccm* est discutable. C'est le cas de CcmF_{N2} et de CcmC chez *Brassica napus* et *A. thaliana*. Dans ces deux espèces, le gène *ccmC* est transcrit et édité mais le transcrit se termine avant le codon Stop de la phase ouverte de lecture (P. Giegé et H. Handa, communication personnelle). La présence de la protéine doit donc être confirmée. Contrairement à ce qu'il a été décrit (Kubo *et al.*, 2000), le gène *ccmC* complet est présent dans le génome mitochondrial de *Beta vulgaris*.

Les génomes mitochondriaux des animaux et des champignons ne contiennent pas de gènes *ccm*. Ces organelles suivent le système III pour la biogenèse des cytochromes de type *c*. Le développement de ce système a probablement provoqué la perte des gènes *ccm*. Les mitochondries des algues vertes doivent utiliser le système III pour la maturation des cytochromes de type *c* car aucun gène *ccm* n'est présent dans leur génome. Un gène codant pour un homologue à l'hème lyase CCHL a d'ailleurs été identifié dans le génome nucléaire de *Chlamydomonas*. On ne sait toujours pas pourquoi le système I persiste dans les mitochondries des embryophytes.

5.3. Les gènes *ccm* dans les génomes mitochondriaux de plantes

5.3.1. CcmB et CcmC

L'étude des régions transcrites des génomes mitochondriaux et le séquençage systématique ont révélé la présence de gènes orthologues à *ccmB* et *ccmC* (qui sont impliqués dans la biogenèse des cytochromes de type *c* chez *E. coli* et *R. capsulatus*) dans les génomes mitochondriaux de l'hépatique *Marchantia polymorpha* (Oda *et al.*, 1992), de *Triticum aestivum* (Bonnard and Grienberger, 1995; Faivre-Nitschke *et al.*, 2001), d'*A. thaliana* (Unsold *et al.*, 1997) et d'autres plantes (Tableau i4). Les gènes mitochondriaux *ccmB* et *ccmC* codent pour des protéines très hydrophobes contenant chacune six domaines transmembranaires. Initialement, ces deux protéines ont été décrites comme les deux domaines transmembranaires d'un transporteur ABC responsable de l'exportation de l'hème vers le périplasme (Ramseier *et al.*, 1991; Beckman *et al.*, 1992). La question de l'implication de CcmC dans le transporteur ABC est discutée au paragraphe 4.2.1. Plusieurs arguments favorisent l'hypothèse de l'organisation A₂B₂ par rapport à A₂BC.

L'édition des ARN est une modification post-transcriptionnelle essentielle pour l'expression correcte des gènes mitochondriaux de plantes. Ce mécanisme permet la conservation des séquences protéiques (Covello and Gray, 1989; Gualberto *et al.*, 1989). Les gènes mitochondriaux *ccmB* et *ccmC* codent pour des protéines très hydrophobes. Le transcrit codant pour CcmB porte 42 sites d'édition de C en U chez le blé (Faivre-Nitschke *et al.*, 2001) et 32 chez *A. thaliana* (Giegé and Brennicke, 1999). Ainsi, les ARN édités codent pour des protéines possédant une plus forte homologie avec les protéines CcmB bactériennes. Le

Espèces	<i>cmB</i>	<i>cmC</i>	<i>cmF_N</i>	<i>cmF_{N1}</i>	<i>CcmF_{N2}</i>	<i>CcmF_c</i>	<i>cmF_{C1}</i>	<i>cmF_{C2}</i>	Références
<i>Marchantia polymorpha</i>	G	G	G	/	/	/	G	G	Oda et al., 1992
<i>Oenothera berteriana</i>	GTE	GTE	GTE	/	/	GTE	/	/	Schuster 1994; Jekabsons and Schuster, 1995; Schuster et al., 1993; Gruska et al., 1995
<i>Pisum sativum</i>	nd	GTE	nd	nd	nd	nd	nd	nd	Zhuo et al., 1999
<i>Solanum tuberosum</i>	(G)	nd	(G) ?	nd	nd	nd	nd	nd	AF095280, AF097743
<i>Lycopersicon esculentum</i>	GTE	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	Shikanai et al., 1996
<i>Daucus carota</i>	nd	nd	GTE	/	/	/	/	/	Schuster et al., 1993
<i>Beta vulgaris</i>	G	G	G	/	/	G	/	/	Kubo et al., 2000
<i>Arabidopsis thaliana</i>	GTE	GTE	/	GTE	GTE	GTE	/	/	Unsel et al., 1997; Giegé et al., 1999
<i>Brassica campestris</i>	nd	nd	nd	(G)	nd	nd	nd	nd	Singh et al., 1996
<i>Brassica napus</i>	GTE	GTE	/	GTE	GTE	GTE	/	/	Itani and Handa., 1998; Handa et al., 1996; Menassa et al., 1997; Handa 2003
<i>Triticum aestivum</i>	GTE	GTE	GTE	/	/	GTE	/	/	Faivre Nitschke et al., 2001; Bonnard and Grienenberger, 1995; Gonzalez et al., 1993; Giegé et al., 2004
<i>Oryza sativa</i>	GTE	GTE	GTE	/	/	GTE	/	/	Nakazono et al., 1996; Notsu et al., 2002

Tableau 14 : Les gènes *cm* dans les génomes mitochondriaux de plantes

Les espèces en bleus possèdent les génomes qui ont été complètement séquencés

En jaune sont indiqués les pseudo-gènes hypothétiques

G : gène

T : transcrit

E : édition

/ : gène absent

nd : non déterminé

transcrit correspondant à *ccmB* est aussi édité chez *Oenothera berteriana* (Schuster, 1994), la tomate (Shikanai *et al.*, 1996) et le colza (Itani and Handa, 1998).

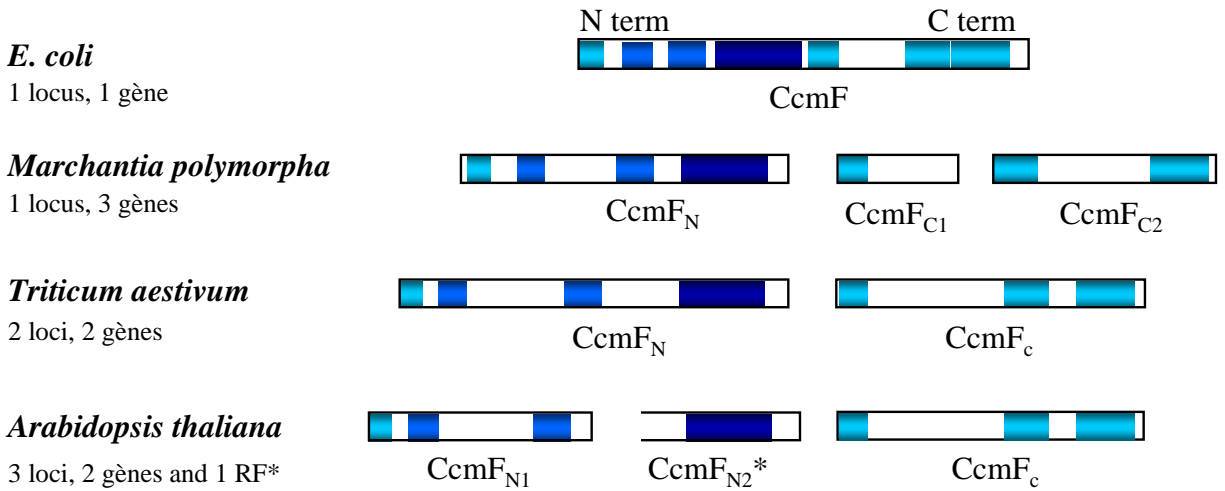
Le transcrit codant pour CcmC possède 36 sites d'édition de C en U chez le blé (Bonnard and Grienenberger, 1995) et 28 chez *A. thaliana* (Giegé and Brennicke, 1999). L'édition permet la conservation du motif riche en tryptophane (motif WWD).

5.3.2. CcmF

Des orthologues du gène *ccmF* d'*E. coli* ont été trouvés dans les génomes mitochondriaux complètement séquencés de *Marchantia polymorpha* (Oda *et al.*, 1992), *Brassica napus* (Handa, 2003), *A. thaliana* (Unselde *et al.*, 1997), *Oryza sativa* (Notsu *et al.*, 2002) et *Beta vulgaris* (Kubo *et al.*, 2000). D'autres ont été identifiés dans les génomes mitochondriaux de *Triticum aestivum* (Gonzalez *et al.*, 1993, Giegé *et al.*, 2004), *Brassica campestris* (Handa *et al.*, 1996; Menassa *et al.*, 1997) et *Oenothera* (Gruska *et al.*, 1995). Les orthologues végétaux de *ccmF* sont organisés selon trois schémas différents et sont divisés en deux ou trois gènes selon les espèces (Figure i10), chaque gène codant pour un peptide homologue à une région de la protéine bactérienne. Les génomes mitochondriaux d'*O. berteriana* et du blé codent pour deux phases ouvertes de lecture : *ccmF_N* et *ccmF_C* codent respectivement pour une protéine homologue au domaine N-terminal et C-terminal de la protéine bactérienne CcmF (Gonzalez *et al.*, 1993; Schuster, 1994). *CcmF_C* est divisé en deux phases ouvertes de lecture, *ccmF_{C1}* et *ccmF_{C2}* chez *M. polymorpha* (Oda *et al.*, 1992) alors que *ccmF_N* est divisé en une phase ouverte de lecture *ccmF_{N1}* et une phase de lecture *ccmF_{N2}* chez *A. thaliana* (Unselde *et al.*, 1997).

De nombreux sites d'édition de C en U sont retrouvés dans les différents transcrits correspondant à *ccmF* : 34 dans *ccmF_N* de blé (Gonzalez *et al.*, 1993), 27 dans *ccmF_C* de blé (Giegé *et al.*, 2004), et chez *A. thaliana*, 22 dans *ccmF_{N1}*, 12 dans *ccmF_{N2}* et 16 dans *ccmF_C*. Le transcrit de *AtccmF_C* est réduit de 27 codons par l'apparition d'un codon Stop lors de l'édition (Giegé *et al.*, 2004). L'édition augmente le pourcentage d'identité entre les protéines.

AtccmF_{N1} et *AtccmF_{N2}* sont exprimés et les protéines correspondantes sont des protéines intrinsèques de la membrane interne. Le domaine WWD ainsi que les histidines conservées sont orientés vers l'espace intermembranaire. *AtCcmF_{N1}* et *AtCcmF_{N2}* sont présents dans un complexe de 150 kDa (Rayapuram, 2003).



Domaines conservés

Motif WWD très conservé

Figure i10 : Comparaison des gènes mitochondriaux de plante codant pour des orthologues de CcmF d'*E. coli*. Plus le bleu est sombre, plus le degré de conservation est élevé. * indique la phase de lecture (aucun ATG identifié) contenant le motif WWD très conservé.

5.4. Les gènes *ccm* dans le génome nucléaire de plantes

8 gènes sont impliqués dans la maturation des cytochromes de type *c* chez *E. coli* et 9 chez *R. capsulatus*. Les génomes mitochondriaux des plantes ne codent que pour une partie de ces gènes. S'ils existent, les autres gènes codant pour des protéines impliquées dans ce processus sont sûrement localisés sur le génome nucléaire. Une autre possibilité est que la fonction correspondante soit assurée par une protéine non homologue aux protéines Ccm bactériennes.

Le transfert d'ADN mitochondrial vers le noyau a été fréquent lors de l'évolution. Par exemple, une copie de 620 kb du génome mitochondrial est insérée dans le chromosome 2 du génome nucléaire d'*A. thaliana*. La taille de l'ADN transféré est supérieure à celle du génome mitochondrial (366 kb), ceci est attribué à la duplication de larges segments (Lin *et al.*, 1999; Stupar *et al.*, 2001).

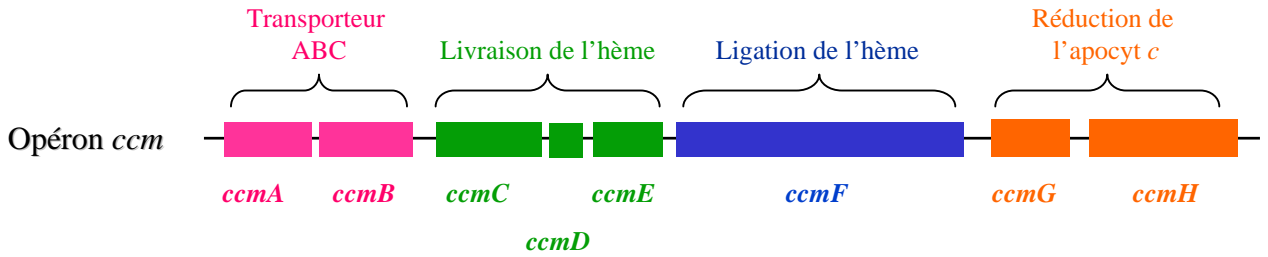
Le transfert des gènes de la mitochondrie vers le noyau chez les plantes est facilité par le fait qu'il n'y a pas de barrière de code génétique : les machineries de traduction protéique mitochondriale et cytoplasmique utilisent le même code génétique. Chez les animaux, les mitochondries utilisent un code génétique modifié. Ainsi le contenu génique mitochondrial ne peut plus s'échapper (Berg and Kurland, 2000; Gray, 2000). Il est essentiel que le transfert des gènes mitochondriaux de plantes ait lieu après transcription inverse de l'ARNm épissé et édité (Nugent and Palmer, 1991; Brennicke *et al.*, 1993). Dans le noyau, des recombinaisons permettent l'acquisition des promoteurs et des préséquences d'adressage (Henze and Martin, 2001). Ces deux étapes permettent qu'un messenger fonctionnel soit produit puis que la protéine traduite soit importée dans les mitochondries. Un exemple de transfert récent d'un gène mitochondrial vers le noyau par l'intermédiaire d'un intermédiaire ARN est celui de *cox2* (sous unité 2 du complexe IV) chez les légumineuses (Nugent and Palmer, 1991; Covello and Gray, 1992).

La Figure i11 montre l'organisation de l'opéron *ccm* chez *E. coli* et la répartition des gènes *ccm* d'*A. thaliana* sur les génomes nucléaire et mitochondrial.

5.4.1. AtCCMA

Le génome mitochondrial d'*A. thaliana* code pour AtCcmB, le domaine transmembranaire d'un transporteur ABC. Mais aucun gène pour un domaine liant l'ATP n'a

E. coli



A. thaliana

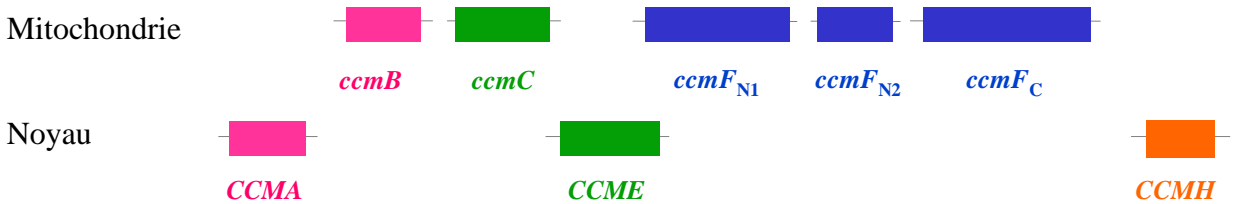


Figure i11 : Les gènes de maturation des cytochromes *c* : l'opéron *ccm* d'*E. coli* et les gènes *ccm* localisés sur les génomes nucléaire et mitochondrial d'*A. thaliana*. La fonction hypothétique des protéines codées par ces gènes est indiquée pour l'opéron d'*E. coli*.

été identifié sur ce génome mitochondrial. Le séquençage complet du génome nucléaire d'*A. thaliana* a permis l'identification de toutes les protéines possédant une activité de liaison de l'ATP (Sanchez-Fernandez *et al.*, 2001). Cet inventaire a permis l'identification d'un orthologue de *EcCcmA* sur le chromosome 1, appelé *AtCCMA* (Rayapuram, 2003). La protéine codée par ce gène est localisée sur la face matricielle de la membrane mitochondriale interne. *AtCCMA* est importée *in vitro* dans les mitochondries sans maturation apparente. *AtCCMA* est incapable de compléter un mutant $\Delta ccmA$ d'*E. coli* pour la formation d'holocytochromes *c*. *AtCCMA* est présente dans un complexe de la taille du complexe III (Rayapuram, 2003). Ainsi le transporteur ABC formé par *AtCcmB* et *AtCCMA* est le seul cas de transporteur ABC mitochondrial connu qui est codé par deux génomes différents.

5.4.2. *AtCCME*

Le séquençage du génome nucléaire d'*A. thaliana* a mis en évidence l'existence d'un gène homologue à *ccmE* sur le chromosome 3 (Sadowski *et al.*, 1996). *AtCCME* est une protéine périphérique de la membrane mitochondriale interne. Elle est orientée vers l'espace intermembranaire. Un mutant $\Delta ccmE$ d'*E. coli* est incapable de former de l'holocytochrome *c* quand il est complété par *AtCCME*. Par contre, *AtCCME* est capable de fixer l'hème de manière covalente lorsqu'elle est exprimée avec *EcCcmC*. *AtCCME* est sûrement incapable de transférer l'hème à *EcCcmF*. Le résidu histidine conservé est essentiel pour la liaison de l'hème (Spielewoy *et al.*, 2001). *AtCCME* est la première protéine Ccm codée par le génome nucléaire à avoir été identifiée et étudiée. Des plantes transgéniques surexprimant *AtCCME* n'ont pas de phénotype morphologique apparent, mais l'observation de coupes de feuilles au microscope électronique montre des mitochondries plus grandes et moins denses aux électrons que les mitochondries d'une plante sauvage. Ces plantes transgéniques montrent aussi une stimulation de l'expression de l'oxydase alternative mais cette observation semble dépendre du mode de culture (Spielewoy *et al.*, 2001; G. Vrain, communication personnelle). Chez ce mutant, une baisse de la quantité de cytochromes de type *c* mitochondriaux a été observée (G. Bonnard, communication personnelle).

5.4.3. *AtCCMH*

Un autre composant du système de maturation de cytochromes de type *c* a été identifié sur le chromosome 1 du génome nucléaire d'*A. thaliana*, il s'agit d'un orthologue de *EcCcmH*.

Chez les bactéries, CcmH est une thiol:disulfure oxydoréductase périplasmique ancrée dans la membrane plasmique par un domaine transmembranaire. On suppose que son rôle est de réduire les cystéines du motif CXXCH de l'apocytochrome pour permettre la liaison avec les groupements vinyls de l'hème. Les travaux présentés dans cette thèse concernent l'identification et la caractérisation de cette protéine chez *A. thaliana*.

5.5. Les gènes *ccm* non identifiés chez les plantes

5.5.1. AtCCMD

Des recherches par homologies de séquences n'ont pas permis d'identifier de gène candidat pouvant coder pour un orthologue de CcmD. Chez *E. coli*, CcmD joue un rôle dans la stabilité du chaperon d'hème CcmE et facilite le transfert d'hème de CcmC vers CcmE. C'est une petite protéine hydrophobe de 8 kDa. Aucun motif spécifique à CcmD n'a pu être mis en évidence en comparant différentes protéines bactériennes.

5.5.2. AtCCMG

CcmG et CcmH contiennent le motif CXXC et sont supposés transférer les électrons de DsbD vers l'apocytochrome *c* (Fabianek *et al.*, 2000; Setterdahl *et al.*, 2000; Reid *et al.*, 2001). *AtCCMH* a été identifié sur le génome nucléaire, mais aucune séquence homologue à CcmG n'a été trouvée chez *A. thaliana*. CcmG possède un site actif WCPTC très proche de celui des thiorédoxines (WCGPC). CcmG possède un repliement proche de celui des thiorédoxines avec deux insertions dans le repliement thiorédoxine (Edeling *et al.*, 2002). Une autre caractéristique des protéines CcmG est le motif GVXGXPE situé dans la partie C-terminale de la protéine mais qui se retrouve très proche du motif WCXXC dans le repliement de la protéine (Edeling *et al.*, 2002). Chez *A. thaliana*, plus d'une centaine de gènes codent pour des thiorédoxines ou des thiorédoxines-like. La recherche bioinformatique d'un homologue à CcmG est décrite au chapitre 5 des Résultats.

Il est envisageable que les mitochondries végétales n'utilisent pas une cascade de réduction semblable à celle des bactéries. Pour l'instant *AtCCMH* est le seul composant de la voie de réduction à avoir été identifié. Aucun homologue à DsbD ou CcmG n'est connu dans les mitochondries de plantes. *AtCCMH* est peut-être réduite par un mécanisme faisant intervenir un système différent de DsbD - CcmG.

5.5.3. Le domaine C-terminal de CcmH

Le domaine C-terminal d'EcCcmH possède une fonction de chaperon d'apocytochrome. Chez *R. capsulatus* et *B. japonicum* cette fonction est assurée par la protéine CycH. Cette protéine n'est pas indispensable pour la maturation des cytochromes *c* chez *E. coli* (Fabianek *et al.*, 1999) ou chez *B. japonicum* (Ritz *et al.*, 1995). Trois domaines TPR (tetratricopeptide repeats) ont été identifiés dans la protéine CycH de *Sinorhizobium meliloti* (Cinege *et al.*, 2004). La recherche bioinformatique d'un orthologue de *cycH* dans le génome d'*A. thaliana* s'est montrée infructueuse. Cette recherche est décrite au chapitre 5 des Résultats.

Il est possible que ces protéines aient été sélectivement éliminées lors de l'évolution car leur fonction n'était plus nécessaire ou parce qu'elles ont été remplacées par des protéines déjà présentes possédant une fonction similaire. Enfin, dans les cellules végétales cohabitent deux systèmes de biogenèse des cytochromes *c* qui sont presque semblables, le système I dans les mitochondries et le système II dans les chloroplastes. Comme il existe un très grand nombre de protéines adressées dans ces deux compartiments, il est envisageable que des éléments de la voie de maturation des cytochromes de type *c* soient adressés aux deux compartiments où ils auraient une fonction identique. Dans les chloroplastes, une thiorédoxine HCF164 ressemblant à CcmG et à CcsX est impliquée dans l'assemblage du complexe *b₆f* (Lennartz *et al.*, 2001). De même, l'assemblage du complexe *b₆f* chloroplastique nécessite une protéine appelée CcdA (Page *et al.*, 2004). Cette protéine transmembranaire est un transporteur d'électron homologue à DsbD. Il ne semble pas que HCF164 ou CcdA soient aussi localisées au niveau des mitochondries.

6. Les thiols/disulfure oxydoréductases

De nombreuses protéines contiennent des cystéines qui portent un groupement thiol (SH). Deux groupements thiols peuvent réagir et former un pont disulfure (S-S). Les ponts disulfures sont très importants pour le repliement des protéines. En effet, les ponts disulfures intramoléculaires permettent de stabiliser une structure tertiaire et les ponts disulfures intermoléculaires permettent à deux sous-unités d'être associées de manière covalente. Ainsi le contrôle de la formation de ces ponts disulfures est très important pour la cellule. En effet, l'état d'oxydoréduction (redox) des résidus cystéines peut affecter la structure et la fonction

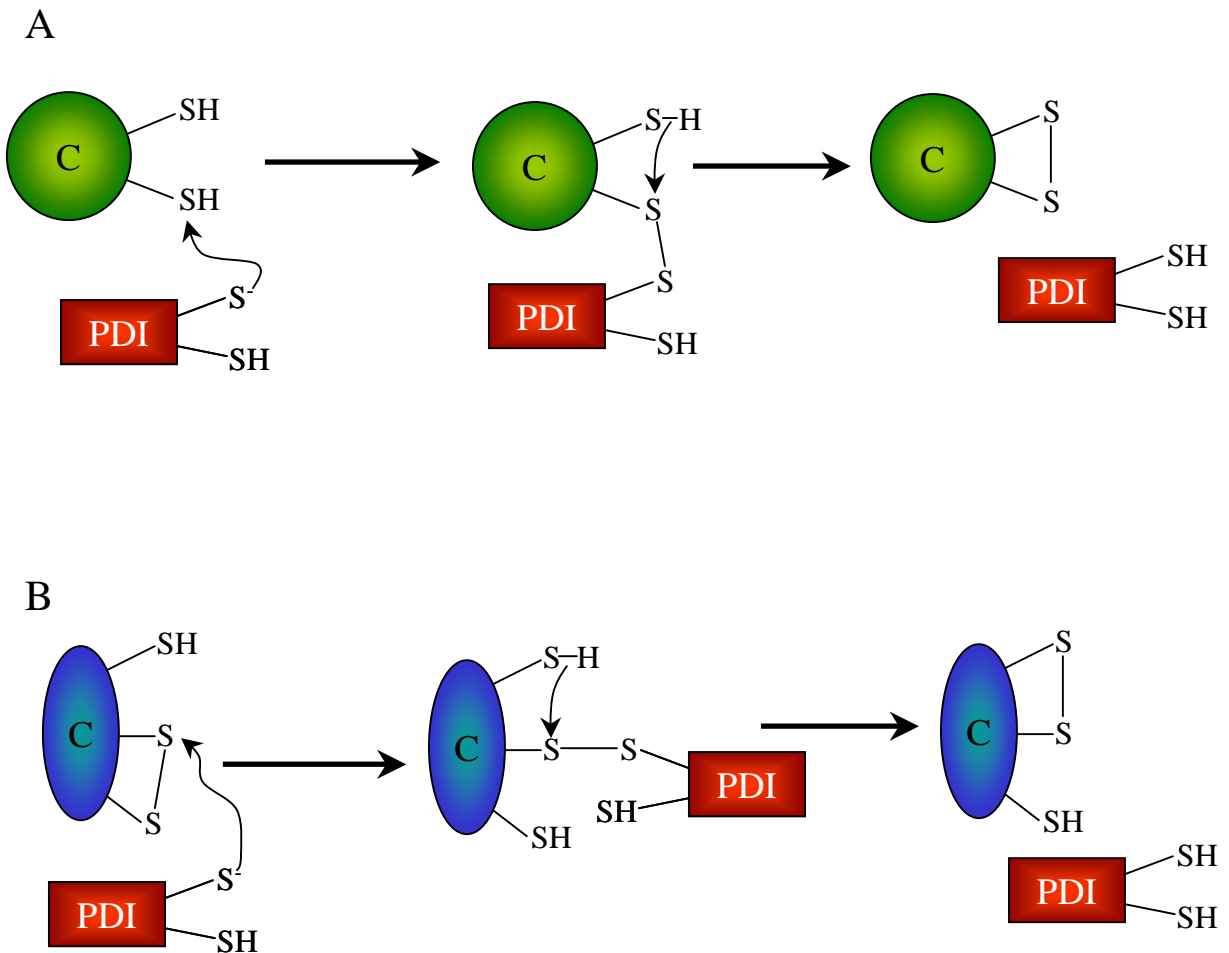


Figure i12 : Mode d'action des protéines PDI (protéine disulfide isomerase).

A : mécanisme d'oxydation

B : mécanisme d'isomérisation

Dans les deux cas il y a d'abord une attaque nucléophile de la première cystéine de la protéine PDI sur une cystéine de la protéine cible (C). Une deuxième attaque nucléophile est réalisée par une cystéine de la protéine cible, ce qui a pour but de réduire la protéine PDI.

des protéines. Les protéines capables de créer un pont disulfure (oxydation de deux thiols), de le réduire ou de l'isomériser font partie de la famille des thiols/disulfure oxydoréductases, la superfamille des thiorédoxines (Ferrari and Soling, 1999). Ces protéines possèdent un ou plusieurs sites actifs CXXC.

6.1. Formation et isomérisation des ponts disulfures

6.1.1. Les protéines isomérase de disulfure

La formation d'un pont disulfure est le résultat d'une oxydation (ou d'une perte d'électrons). Les protéines possédant des ponts disulfures sont essentiellement présentes dans le milieu extracellulaire qui est très oxydant. Ainsi, des ponts disulfures stabilisateurs sont présents dans les protéines extracellulaires ou localisées à la surface de la cellule. Les ponts disulfures sont créés dans le réticulum endoplasmique, après la synthèse de ces protéines et avant leur exportation. Les protéines responsables de cette oxydation des thiols sont les protéines PDI (protein disulfide isomerase). L'activité de ces protéines dépend du potentiel redox du milieu où elles se trouvent. Dans le réticulum endoplasmique, le potentiel redox dépend du rapport glutathion réduit/glutathion oxydé qui est d'environ 2 (Hwang *et al.*, 1992). Dans ces conditions, les protéines PDI catalysent préférentiellement l'oxydation des dithiols. Les sites actifs des protéines PDI sont très réactifs (500 fois plus que la forme disulfure du glutathion). Pour la formation des ponts disulfures, la forme oxydée du site actif (pont disulfure) de la protéine PDI est nécessaire (Figure i12). Cette forme disulfure est régénérée par réaction avec le glutathion (Walker and Gilbert, 1995).

La formation d'un pont disulfure est un phénomène précoce dans le repliement des protéines. Souvent des erreurs apparaissent : les cystéines ne sont pas appariées à leur partenaire correct et ne permettent pas le bon repliement de la protéine. Pour corriger ces erreurs, les protéines PDI peuvent modifier l'organisation des ponts disulfures intracellulaires grâce à leur activité isomérase. Pour cela, la forme réduite du site actif (dithiols) est nécessaire. Le mécanisme d'isomérisation (Figure i12) présente une première étape pendant laquelle un thiol de la protéine PDI attaque le pont disulfure de la protéine substrat, formant ainsi un disulfure mixte intermédiaire. Dans la deuxième étape, c'est un thiol additionnel de la protéine substrat qui attaque le disulfure intermédiaire, libérant ainsi la protéine PDI dans son état redox initial et la protéine substrat isomérisée au niveau du pont disulfure (Darby and Creighton, 1995).

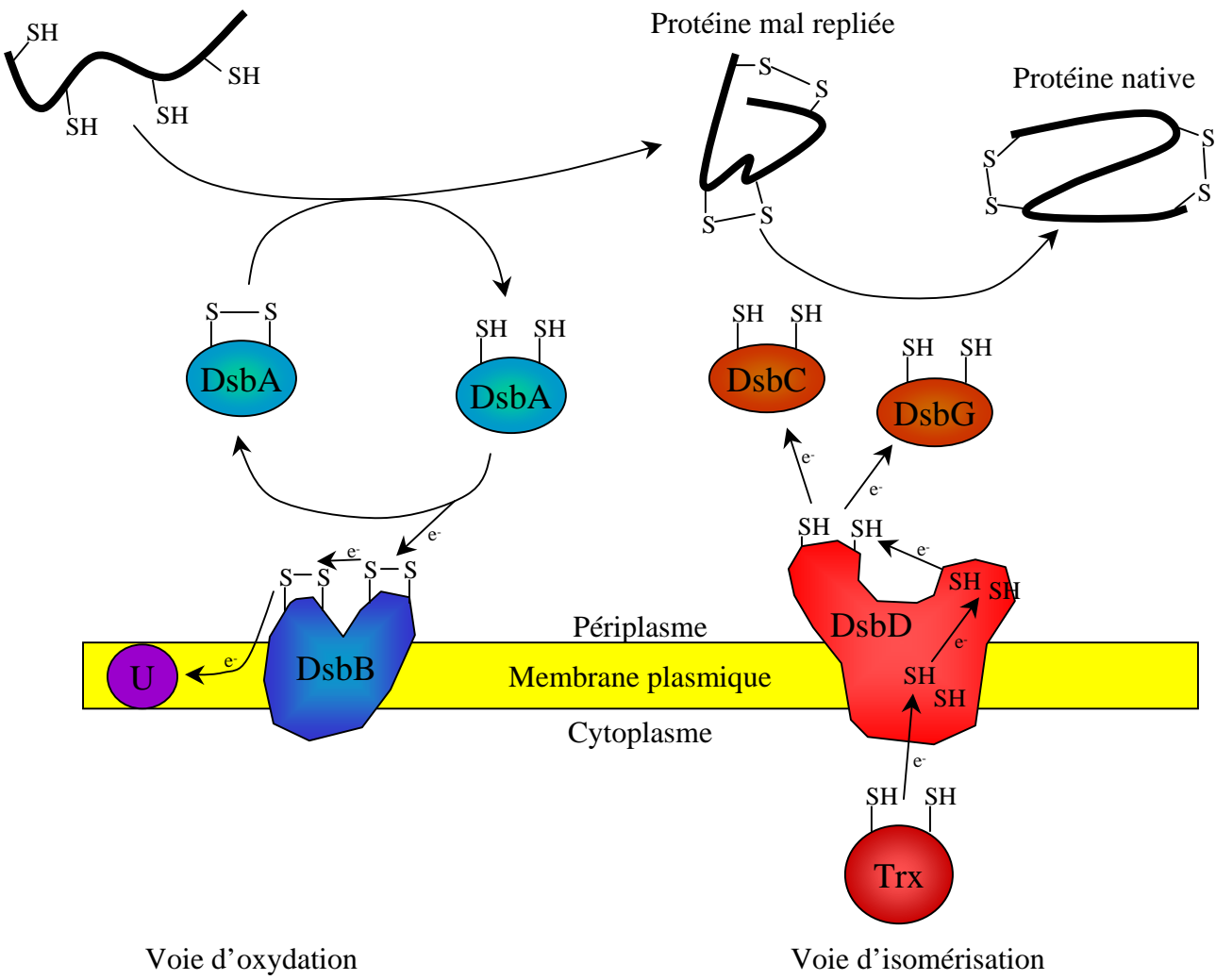


Figure i13 : Modèle du système d'oxydation et d'isomérisation présent dans le périplasm d'*E. coli*.
 U : ubiquinone
 Trx : thiorédoxine

6.1.2. Le système d'oxydation/isomérisation du périplasma bactérien

De nombreuses protéines du périplasma bactérien possèdent des ponts disulfures. Pendant longtemps, on a pensé que ces ponts disulfures se formaient spontanément. Des approches génétiques ont permis de mettre en évidence l'existence d'une protéine responsable de la formation des ponts disulfures au niveau du périplasma (Bardwell *et al.*, 1991; Kamitani *et al.*, 1992). Cette petite protéine périplasmique (21 kDa), appelée DsbA (disulfide bond), est la protéine la plus oxydante que l'on connaisse. Son potentiel redox est très élevé, -120 mV (Zapun *et al.*, 1993). DsbA se fixe sur les protéines venant d'être exportées dans le périplasma de manière hydrophobe (Couprie *et al.*, 2000) et catalyse la formation de ponts disulfures entre deux cystéines (Figure i13). DsbA est ensuite réoxydée par une protéine de la membrane interne DsbB. La réoxydation de DsbB fait intervenir la chaîne respiratoire et l'ubiquinone (Bader *et al.*, 1998; Kobayashi and Ito, 1999).

Comme les protéines PDI, DsbA fait de nombreuses erreurs dans sa catalyse des ponts disulfures. Un système d'isomérisation des ponts disulfures est présent dans le périplasma bactérien. Ce système fait intervenir deux isomérases, DsbC (Missiakas *et al.*, 1994; Rietsch *et al.*, 1996) et DsbG (Andersen *et al.*, 1997). Ces deux protéines, sous leur forme réduite, catalysent l'isomérisation des ponts disulfures (Figure i13). Les électrons permettant de réduire DsbC et DsbG proviennent de DsbD qui est une protéine membranaire contenant huit domaines transmembranaires et deux domaines périplasmiques (Chung *et al.*, 2000). DsbD est réduit par une thiorédoxine cytoplasmique. Elle transfère les électrons à travers la membrane plasmique et réduit DsbC, DsbG ou d'autres protéines périplasmiques (CcmG, aussi appelée DsbE par exemple).

6.2. Réduction des ponts disulfures

La réduction est un gain d'électrons. Pour le couple dithiol/disulfure, la réduction est le passage du pont disulfure en dithiol. Cette opération est réalisée par des systèmes réducteurs donneurs d'électrons. Les ponts disulfures peuvent être réduits *in vitro* par des agents réducteurs tel que le DTT ou le β -mercaptoéthanol. La réduction des ponts disulfure *in vivo* est catalysée par deux systèmes : le système thiorédoxine ou le système glutathion/glutarédoxine.

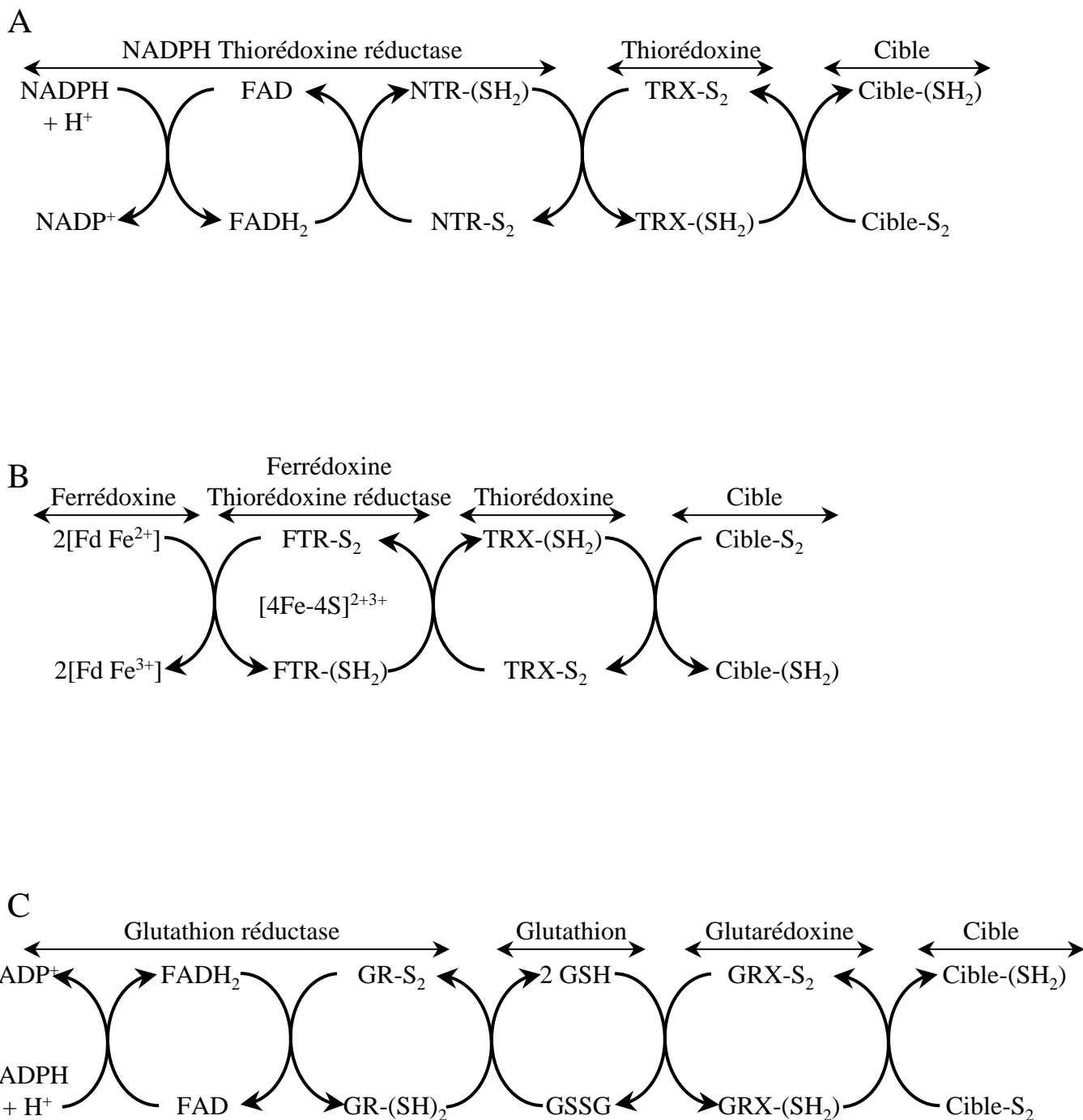


Figure i14 : Mécanismes de réduction des ponts disulfures par les systèmes.

A : thioredoxine NADPH-dépendant (NTR : Thioredoxine Réductase NADPH-dépendante, TRX : Thioredoxine)

B : thioredoxine ferrédoxine-dépendant (FTR : Thioredoxine Réductase Ferrédoxine-dépendante, TRX : Thioredoxine)

C : glutarédoxine (GR : Glutarédoxine réductase, GRX : Glutarédoxine)

FAD, Ferrédoxine (Fd) : cofacteurs transporteurs d'électrons

S₂ : forme oxydée (pont disulfure)

SH₂ : forme réduite (dithiol)

6.2.1. Le système thiorédoxine

Les thiorédoxines catalysent la réduction des ponts disulfures avec une exceptionnelle efficacité, 10 000 fois mieux que le DTT, le meilleur réducteur chimique dans les mêmes conditions de pH (Holmgren, 1979). Une fois oxydées, selon l'organisme ou la localisation cellulaire, elles sont réduites soit par une thiorédoxine réductase NADPH-dépendante (NTR), soit par une thiorédoxine réductase ferrédoxine-dépendante (FTR) (Figure i14) (Holmgren, 1985).

Les thiorédoxines sont des protéines acides ($pI \approx 5$) de faible poids moléculaire ($PM \approx 12$ kDa) qui présentent un site actif caractéristique W-C-G/P-P-C. Les deux cystéines du site actif alternent un état oxydé (pont disulfure) et un état réduit (dithiol) ce qui permet la réduction des ponts disulfures des protéines cibles. De nombreux types de thiorédoxines peuvent être distingués, notamment chez les plantes, sur la base de leur séquence primaire et de la position des introns dans le gène (Meyer *et al.*, 2002; Sahrawy *et al.*, 1996). De nombreuses structures 3D de thiorédoxines ont été réalisées par cristallographie (Holmgren *et al.*, 1975; Saarinen *et al.*, 1995; Weichsel *et al.*, 1996; Capitani *et al.*, 2000) et RMN (Dyson *et al.*, 1990; Forman-Kay *et al.*, 1992; Jeng *et al.*, 1994; Mittard *et al.*, 1997; Lancelin *et al.*, 2000; Nicastro *et al.*, 2000). Toutes les thiorédoxines possèdent un repliement appelé "repliement thiorédoxine" : un cœur constitué de feuillets β entouré d'hélices α , le site actif étant localisé dans une boucle à la surface de la protéine.

Le mode d'action des thiorédoxines a lieu en deux temps (Figure i15) : la première cystéine du site actif de la thiorédoxine casse le pont disulfure de la protéine cible, réduit une cystéine et forme un pont disulfure avec la seconde cystéine de la protéine cible, donnant lieu à un complexe mixte intermédiaire instable. Ce pont disulfure intermoléculaire est cassé par la seconde protéine du site actif, libérant ainsi la protéine cible réduite et la thiorédoxine oxydée (Chivers and Raines, 1997).

Les principales fonctions des thiorédoxines reposent sur leur activité oxydoréductrice qui joue deux rôles principaux dans la cellule : en tant que donneur d'électron pour de nombreuses enzymes réductrices d'une part, en tant que modificateurs conformationnels d'autre part. Le génome d'*A. thaliana* possède 26 gènes codant pour des thiorédoxines. Ces thiorédoxines sont localisées dans le cytosol, les chloroplastes ou dans les mitochondries.

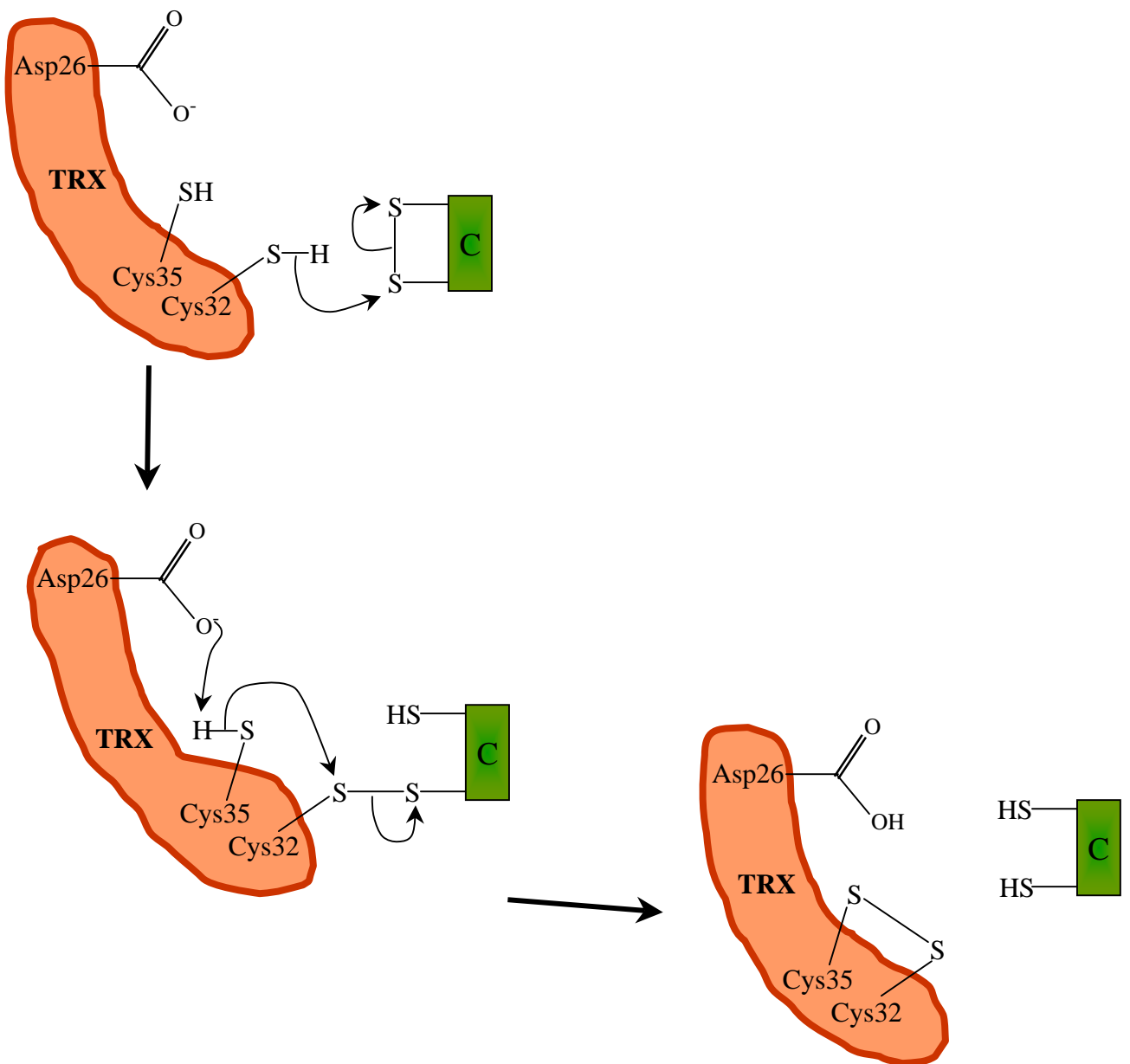


Figure i15 : Mécanisme réactionnel des thiorédoxines, exemple de la thiorédoxine d'*E. coli*. Une première attaque nucléophile par la cystéine32 du site actif de la thiorédoxine (TRX) conduit à la formation d'un complexe disulfure mixte intermédiaire avec la protéine cible (C). Une seconde attaque nucléophile de la cystéine35 du site actif libère la protéine cible réduite, la thiorédoxine est oxydée. Le résidu Aspartate26 est supposé déprotoner le groupement thiol de la cystéine35, et faciliter ainsi son attaque nucléophile de la cystéine32 impliquée dans le disulfure mixte intermédiaire (d'après Chivers et Raines, 1997).

Les premières thiorédoxines cytosoliques découvertes dans les plantes furent dénommées thiorédoxines *h* (pour hétérotrophiques) en raison de leur absence des tissus photosynthétiques (Wolosiuk *et al.*, 1979). Tous les végétaux semblent posséder des thiorédoxines *h* (Jacquot *et al.*, 1997). Le génome d'*A. thaliana* contient *AtNTRA* et *AtNTRB* deux gènes codant pour des thiorédoxines réductases NADPH-dépendantes (Jacquot *et al.*, 1994) qui réduisent les thiorédoxines cytosoliques. Huit gènes codant pour des thiorédoxines *h* ont été identifiés chez *A. thaliana* (*AtTRX-h1-5*, *AtTRX-h7-9*) (Meyer *et al.*, 2002; Rivera-Madrid *et al.*, 1995). Ces thiorédoxines *h* peuvent être divisées en trois sous-groupes (Gelhaye *et al.*, 2004). Les thiorédoxines *h* du sous-groupe 1 (*AtTRX-h1345*) sont supposées être des protéines cytosoliques mais elles diffèrent par leur pattern d'expression (Reichheld *et al.*, 2002). Elles sont très abondantes dans le phloème, suggérant un rôle dans la régulation du redox dans les tissus vasculaires. Les thiorédoxines *h* du sous-groupe 2 (*AtTRX-h278*) possèdent une extension N-terminale qui semble les adresser aux mitochondries (Marcus *et al.*, 1991). De plus, une isoforme de peuplier d'*AtTRX-h78* est localisé dans les mitochondries (E. Gelhaye, communication personnelle). Les thiorédoxines *h* du sous-groupe 3 (*AtTRX-h9* et deux thiorédoxines avec un motif CXXS) possèdent aussi une extension N-terminale par rapport aux thiorédoxines *h* du sous groupe 1. Des expériences de complémentation ont montré qu'un isoforme de peuplier de ces thiorédoxines était réduit par une glutarédoxine, indiquant une nouvelle voie de réduction des thiorédoxines *h* (Gelhaye *et al.*, 2003). Les thiorédoxines *h* sont impliquées dans divers processus. Le plus documenté est leur rôle dans la mobilisation des réserves des graines (Wong *et al.*, 2002). Les thiorédoxines *h* sont aussi impliquées dans la protection contre les stress oxydatifs, surtout pendant la dessiccation et la germination (Serrato and Cejudo, 2003). Elles peuvent aussi être impliquées dans le phénomène d'incompatibilité (Bower *et al.*, 1996; Cabrillac *et al.*, 2001).

Dans les chloroplastes, un système constitué d'une ferrédoxine-thiorédoxine réductase (FTR) et de thiorédoxines de type *f* ou *m* est présent et directement régulé par la lumière. L'appellation thiorédoxines *f* vient de la capacité qu'ont ces protéines à activer la fructose-1,6-biphosphatase. Elles sont codées par le génome nucléaire (deux gènes chez *A. thaliana*) et paraissent provenir d'un ancêtre eucaryote commun (Hartman *et al.*, 1990). Les thiorédoxines *m* ressemblent par leur séquence aux thiorédoxines procaryotiques (Hartman *et al.*, 1990). Elles ont été dénommées ainsi en raison de leur capacité à activer le NADP-malate déshydrogénase. Elles sont aussi codées par le génome nucléaire (quatre gènes chez *A. thaliana*). Les thiorédoxines *f* et *m* possèdent une extension N-terminale responsable de leur

adressage chloroplastique. La plupart des cibles des thiorédoxines chloroplastiques sont des enzymes liées au métabolisme carboné et plus particulièrement au cycle de Calvin (Ruelland and Miginiac-Maslow, 1999; Schurmann and Jacquot, 2000).

L'analyse du génome d'*A. thaliana* a permis de révéler deux nouveaux types de thiorédoxines hypothétiquement chloroplastiques. Un gène code pour une thiorédoxine de type procaryotique, appelée thiorédoxine *x*, qui possède une extension N-terminale susceptible de l'adresser aux chloroplastes (Mestres-Ortega and Meyer, 1999). Deux autres gènes homologues codent pour des thiorédoxines de type procaryote, appelées thiorédoxines *ch2-1* et *ch2-2*, et qui possèdent une préséquence d'adressage chloroplastique (Meyer *et al.*, 2002).

Des activités thiorédoxine et thiorédoxine réductase ont été détectées dans les mitochondries de plantes (Bodenstein-Lang *et al.*, 1989; Marcus *et al.*, 1991; Konrad *et al.*, 1996; Banze and Follmann, 2000). Des thiorédoxines *h* sont présentes dans les mitochondries (voir ci-dessus). Un système NRT-TRX comprenant AtNTRA et AtTRXo-1 a été identifié dans les mitochondries d'*A. thaliana* (Laloi *et al.*, 2001). La thiorédoxine AtTRX-o1 qui est localisée dans la matrice mitochondriale, définit avec AtTRX-o2, qui est une thiorédoxine dont la localisation cellulaire n'est pas définie, une nouvelle classe de thiorédoxines spécifique aux plantes. De plus, les gènes des deux thiorédoxines réductases NADPH-dépendante, *AtNTRA* et *AtNTRB* codent chacune pour deux formes de protéines, une cytoplasmique et une mitochondriale. AtNTRA semble être la forme cytoplasmique majoritaire et AtNTRB la forme mitochondriale majoritaire (J-P Reichheld, communication personnelle). AtTRX-o1 et AtNTRA sont actives dans un système *in vitro* (Laloi *et al.*, 2001). Récemment, les cibles des thiorédoxines dans les mitochondries ont été recherchées en utilisant une approche protéomique. Un grand nombre de protéines (au moins 50) impliquées dans 12 processus sont ainsi potentiellement réduites par des thiorédoxines mitochondriales (Balmer *et al.*, 2004).

6.2.2. Le système glutathion/glutarédoxine

Les glutarédoxines font partie de la superfamille des thiorédoxines en raison de leur activité disulfure réductase, de la présence d'un site actif CXXC exposé à la surface de la protéine. Leur structure tertiaire a été déterminée par RMN et elle est proche de celle des thiorédoxines (Eklund *et al.*, 1984; Sodano *et al.*, 1991; Sun *et al.*, 1998; Xia *et al.*, 2001). Les glutarédoxines possèdent une structure simplifiée par rapport aux thiorédoxines (un brin β et

une hélice α en moins) : elles sont plus petites (PM \approx 10 kDa), ont un site de fixation du glutathion ainsi qu'un site actif C-P-Y/F-C.

Le mode d'action des glutarédoxines est similaire à celui des thiorédoxines. La glutarédoxine oxydée est ensuite réduite par le glutathion, lui-même étant réduit par une flavoenzyme NADPH-dépendante, la glutathion réductase (Figure 114).

Le glutathion est un tripeptide L- γ -glutamyl-L-cystéinyl-glycine. C'est le principal composé thiolé des cellules animales et végétales (Meister and Anderson, 1983). Le glutathion existe sous forme libre réduite (GSH), sous forme disulfure oxydée (GSSG) ou sous forme de disulfures mixtes (GSSR) formés lors de la S-thiolation des protéines. La déthiolation peut être catalysée par les thiorédoxines ou les protéines PDI, mais les glutarédoxines semblent être les déthiolases les plus efficaces (Jung and Thomas, 1996). La S-thiolation pourrait avoir un rôle antioxydant en prévenant l'oxydation irréversible des groupements thiols (Thomas *et al.*, 1995; Cotgreave and Gerdes, 1998).

Le glutathion possède des caractéristiques (abondant, ubiquitaire, stable, groupement thiol très réactif, potentiel redox de -240 mV) qui font qu'il participe à de très nombreuses fonctions cellulaires faisant intervenir le contrôle du redox (Sies, 1999). Ainsi, il a en particulier un rôle antioxydant :

- en interagissant avec les espèces réactives d'oxygène
- en tant que donneur d'électron pour des enzymes antioxydantes telles que les glutathion peroxydases
- par son implication dans les mécanismes de thiolation
- chez les plantes, en intervenant dans le cycle ascorbate/glutathion (Noctor and Foyer, 1998).

Le glutathion est aussi impliqué dans le contrôle redox de l'expression de certains gènes du développement ou du cycle cellulaire (Sies, 1999). Chez les plantes et chez certains champignons, le glutathion peut former des phytochélatines (γ -Glu-Cys)₂₋₁₁-Gly, suite à une polymérisation catalysée par une phytochélatine synthase (Clemens *et al.*, 1999; Ha *et al.*, 1999; Vatamaniuk *et al.*, 1999). Les phytochélatines ont une forte activité pour lier les métaux lourds tels le cadmium, le cuivre et l'argent (Cobbett, 2000). Les complexes métal-phytochélatines sont ensuite transportés dans la vacuole où ils ne présentent plus de danger pour la cellule.

6.3. Cas des mitochondries végétales

Les mitochondries sont le lieu de production d'un grand nombre d'espèces réactives d'oxygène. Ces organites possèdent des espèces antioxydantes. En plus du système NTR-TRX mentionné plus haut (Laloi *et al.*, 2001), on trouve du glutathion dans les mitochondries. Une glutathion réductase est aussi localisée dans les mitochondries (Creissen *et al.*, 1995).

Récemment, une sulfhydryl oxydase a été identifiée dans les mitochondries d'*A. thaliana* (Levitan *et al.*, 2004). Cette protéine est homologue aux protéines de la famille Erv1/Alr qui sont essentielles pour la biogenèse des mitochondries et pour l'assemblage des centres fer/soufre. Cette protéine a été localisée au niveau de la membrane mitochondriale externe (résultat non publié). Ainsi, il est probable qu'il y ait une protéine ayant une activité d'oxydation des thiols dans l'espace intermembranaire.

7. Présentation du travail de thèse

L'objectif de cette thèse était d'initier l'étude de la voie de réduction de la maturation des cytochromes de type *c* dans les mitochondries d'*A. thaliana* et plus précisément d'identifier et de caractériser AtCCMH, la protéine dont le rôle prédit est de réduire les apocytochromes. Les recherches sur la maturation des cytochromes *c* mitochondriaux de plantes ont été initiées par la découverte, sur le génome mitochondrial du blé, de phases ouvertes de lecture codant pour des protéines Ccm : CcmB (Faivre-Nitschke *et al.*, 2001), CcmC (Bonnard and Grienberger, 1995) et CcmF_N (Gonzalez *et al.*, 1993). Des homologues à ces gènes ont été trouvés dans les génomes mitochondriaux d'autres plantes et en particulier d'*A. thaliana*. Cette plante a été choisie comme modèle d'étude car son génome est complètement séquencé (Arabidopsis Genome Initiative, 2000), ce qui permet la recherche d'autres gènes *ccm* localisés dans le génome nucléaire. Ainsi deux nouvelles protéines Ccm ont été identifiées : AtCCME, un chaperon d'hème (Spielewoy *et al.*, 2001) et AtCCMA, un domaine liant l'ATP d'un transporteur ABC (Rayapuram, 2003). Ainsi, chez *A. thaliana*, cinq gènes mitochondriaux (*CcmB*, *CcmC*, *CcmF_{N1}*, *CcmF_{N2}* et *CcmF_C*) et deux gènes nucléaires (*CCMA* et *CCME*) sont connus pour être impliqués dans la maturation des cytochromes de type *c*. Ils codent pour des protéines impliquées dans le transporteur ABC, la voie de livraison de l'hème et l'hème lyase putative. Aucune protéine de la voie de réduction n'était identifiée au début de ma thèse.

Cette voie de réduction a été étudiée en deux temps. Un orthologue de CcmH a été identifié et caractérisé. Puis, AtCCMG a été recherchée par homologie de séquence avec les protéines bactériennes. Le travail réalisé lors de cette thèse est présenté en cinq chapitres.

Chapitre I : Identification d'AtCCMH

Ce chapitre décrit comment *AtCCMH* a été identifié. Puis les travaux ayant permis de définir la structure du gène et de son messager ainsi que l'expression spatiale d'*AtCCMH* sont présentés. Enfin la dernière partie de ce chapitre concerne l'identification bioinformatique des homologues végétaux d'*AtCCMH* ainsi qu'une étude *in silico* de la structure d'*AtCCMH*.

Chapitre II : Localisation cellulaire et topologie d'AtCCMH

Dans ce chapitre sont présentés les résultats obtenus pour déterminer la localisation sous-cellulaire, la localisation sous-mitochondriale et la topologie d'*AtCCMH*. Toutes trois ont été déterminées en utilisant des techniques d'immunodétection sur des fractionnements cellulaires, d'importation *in vitro* et de localisation *in vivo* par expression transitoire d'une protéine fusionnée à la GFP. *AtCCMH* semble être importée par un mécanisme inédit dans les mitochondries, la caractérisation partielle de ce mécanisme est décrite.

Chapitre III : Caractérisation fonctionnelle d'AtCCMH

Ce chapitre présente les résultats obtenus lors de l'étude fonctionnelle d'*AtCCMH*. Cette étude a été réalisée en trois temps. Tout d'abord, la complémentation d'un mutant *ccmH* d'*E. coli* par *AtCCMH* a été testée, elle a été suivie par l'analyse d'un mutant d'insertion dans *AtCCMH*. Enfin la fonctionnalité du motif CXXC d'*AtCCMH* a été testée par une approche de tests d'oxydoréduction *in vitro*.

Chapitre IV : Interactions entre AtCCMH et d'autres protéines

AtCCMH est un membre d'un processus qui fait intervenir plusieurs protéines. Des partenaires d'*AtCCMH* ont été recherchés par Far-Western, co-immunoprécipitation, pontage chimique *in vitro* et gels Bleus-Natifs. Les résultats obtenus sont présentés dans ce chapitre.

Chapitre V : Recherche bioinformatique d'autres protéines CCM

Dans ce chapitre est présenté la recherche bioinformatique d'orthologues de CcmG et au domaine C-terminal de CcmH, deux protéines Ccm bactériennes non identifiées chez les plantes. CcmG est une thiorédoxine qui est impliquée dans la voie de réduction et le domaine C-terminal d'*EcCcmH* est un chaperon d'apocytochrome.

Matériels et Méthodes

Matériels et méthodes

1. Matériels et outils informatiques

1.1. Matériel végétal

Les plants d'*Arabidopsis thaliana* écotype Columbia sont cultivés en serres à 25°C avec une photopériode de 16 h de jour et 8 h de nuit.

Les cultures de plantules d'*A. thaliana in vitro* sont réalisées sur du milieu solide MS x1 (Duchefa), 5 g/L de glucose, 8 g/L d'agar en boîtes de Pétri. Ces boîtes sont placées dans une logette avec 16 h de jour à 22°C et 8 h de nuit à 20°C comme photopériode.

Des cellules d'*A. thaliana* sont cultivées dans du milieu Gamborg's B5 (Duchefa G0210) contenant 20 g/L de saccharose et 1 mg/L de 2,4 D à pH 5,7. Les cultures sont placées sur un agitateur rotatif (125 rpm, 25°C). Les cellules sont repiquées stérilement dans du milieu frais toutes les semaines. Des cultures âgées de 5 jours sont utilisées pour les expérimentations.

Des tubercules de *Solanum tuberosum var Bintje* fournies directement par un producteur local et des têtes de *Brassica oleracea* (Chou-fleur) achetées au supermarché ont été utilisés comme matériel de départ pour l'isolement de mitochondries.

1.2. Souches de bactéries

3 souches d'*Escherichia coli* ont été utilisées :

XL1-Blue : *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI^qZΔM15 Tn10 (Tet^r)]*

BL21 : F- *ompT gal [dcm] [lon]hsdS_B(r_B⁻m_B⁻)*; une souche D'*E. coli* B avec DE3, un prophage de type λ portant le gène codant pour la T7 RNA polymérase.

EC06 : C'est une souche d'*E. coli* K-12 MC1061 (*araD139 Δ (ara-leu)7697 Δ (lac)X74 galU galK hsdR2(r_K⁻, m_K⁺) strA mcrA mcrB1*) dans laquelle l'opéron *ccm* est délété d'un fragment *Bam*HI contenant *ccmA-H* (Thöny-Meyer *et al.*, 1995).

1.3. Vecteurs de clonage

pBluescript[®]SK(-/+)

Le plasmide pBluescript est un dérivé de pUC19 (Yanish-Perron *et al.*, 1985). En plus de l'origine de répllication bactérienne, il possède une origine de répllication d'un phage filamenteux. Les – et + indiquent l'orientation du brin d'ADN qui est synthétisé lors de l'infection par un phage helper. Il contient le gène de la β -lactamase qui apporte une résistance à l'ampicilline aux bactéries transformées par ce vecteur. La cassette de clonage est située, en phase, au niveau de l'extrémité 5' du gène de la β -galactosidase. Ce dernier est placé sous le contrôle d'un promoteur inductible par l'IPTG. Cette organisation permet de réaliser l' α -complémentation, système de sélection des colonies ayant inséré un fragment d'ADN dans la cassette de clonage. En présence d'IPTG, la β -galactosidase est exprimée et est capable d'hydrolyser le X-gal (un analogue de son substrat naturel le β -galactose) rajouté dans le milieu de culture. Cette hydrolyse libère un produit bleu qui colore les colonies bactériennes. L'insertion d'un fragment d'ADN dans la cassette de clonage interrompt le gène de la β -galactosidase qui n'est plus produite. Ainsi en présence d'X-gal, les colonies resteront blanches. En plus, ce vecteur possède les promoteurs T3 et T7, située de part et d'autre de la cassette de clonage. Ces promoteurs permettent la synthèse de transcrits *in vitro* en présence de l'ARN polymérase correspondante.

pBluescript[®]SK-T

Ce vecteur est dérivé de pBluescript[®]SK. Des sites *Xcm*I ont été insérés dans la cassette de clonage. Après digestion par cette enzyme de restriction, deux extrémités contenant un T

sortant en 3' sont générées. Ce vecteur est utilisé pour le clonage direct des produits de PCR synthétisés par la *Taq* ADN polymérase et possédant un A sortant en 3'.

QiaXpress (pQE)

Les plasmides de la série pQE sont des vecteurs d'expression dérivés du pDS56/RBSII et du pDS781/RBSII-DHF_{RS} (Stüber *et al.*, 1990). Ce plasmide contient :

- un élément promoteur-opérateur optimisé comprenant le promoteur T5 qui est reconnu par l'ARN polymérase d'*E. coli* ainsi que deux séquences opératrices lac qui augmentent la fixation du répresseur lac et permettent une répression efficace du promoteur T5. Cette répression est annihilée en présence d'IPTG.
- un site de fixation du ribosome synthétique, RBSII pour augmenter les taux de traduction
- une séquence codant pour une étiquette 6xHis
- deux terminateurs de transcription forts pour éviter la translecture
- le gène de la β -lactamase conférant la résistance à l'ampicilline

pACYC184

Le pACYC184 est un vecteur de clonage d'*E. coli*, à faible nombre de copies. Il contient l'origine de réplication p15A. Ainsi, ce vecteur peut co-exister avec d'autres plasmides tels ceux du groupe de compatibilité ColE1. Le pACYC184 porte les gènes apportant la résistance à la tétracycline et au chloramphénicol.

PCK-GFP

Ce vecteur dérivé du pUC a été construit (Menand *et al.*, 1998) pour fusionner au gène de la GFP (Green Fluorescent Protein) des séquences codant pour une séquence d'adressage putative ou pour une protéine. Pour une meilleure expression transitoire de la protéine de fusion dans les plantes, il possède deux promoteurs 35S et une région activatrice de traduction. Deux sites de restriction (*Nco*I et *Bam*HI) permettent l'insertion de la séquence étudiée en amont et en phase avec le gène rapporteur. Celui-ci a été modifié pour s'adapter à l'usage des codons d'*A. thaliana*. En plus, une mutation (S65T) augmente la fluorescence de la protéine. Le vecteur possède également le gène de résistance à l'ampicilline.

1.4. Oligonucléotides

Les oligonucléotides synthétiques ont été fournis par Eurogentec, Sigma, GibcoBRL et Invitrogen. Les températures d'hybridation ont été calculées grâce au logiciel 'oligo calculator' (<http://www.pitt.edu/~rsup/OligoCalc.html>)

Les séquences de tous les oligonucléotides utilisés lors de ces travaux sont données en Annexe 2.

1.5. Outils informatiques

Les comparaisons de séquences, alignements de séquences, analyses de restriction ou d'hydrophobicité ont été réalisées à l'aide du logiciel MacVector 7.1.1 (Oxford Molecular Group).

Les principaux sites utilisés pour les recherches dans les bases de données et les alignements de séquences sont :

NCBI : <http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/>

Base de données d'Arabidopsis, TAIR : <http://www.arabidopsis.org/index.jsp>

MIPS : <http://mips.gsf.de/proj/thal/db/index.html>

Prosite : <http://us.expasy.org/prosite/>

Les logiciels de prédictions d'adressage aux organelles :

MitoP : <http://www.mips.biochem.mpg.de/cgi-bin/proj/medgen/mitofilter>

Predotar : <http://www.inra.fr/predotar/index.html>

Psort : <http://psort.nibb.ac.jp/>

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

Le portail bioinformatique où se trouvent les liens vers les logiciels utilisés pour les analyses de séquences :

<http://www.bioinformatics.vg>

2. Méthodes

Les méthodes classiques de la biologie moléculaire ont été réalisées selon les protocoles décrits par Sambrook (Sambrook *et al.*, 1989).

2.1. Purification et fractionnement de mitochondries

2.1.1. Purification de mitochondries de tubercules de pomme de terre ou de têtes de chou-fleur

La purification de mitochondries à partir de tubercules de pommes de terre suit un protocole dérivé de ceux utilisés par Neuburger (Neuburger *et al.*, 1982) et Struglics (Struglics *et al.*, 1993). Toutes les étapes sont réalisées à 4°C. Les tubercules de pomme de terre sont pelés, lavés et broyés dans un extracteur de jus (Moulinex). Deux volumes du jus obtenu (environ 600 mL à partir d'un kg de tubercules de pomme de terre) sont mélangés avec un volume de tampon d'extraction. Le pH est maintenu à 7,5 par addition de phosphate de potassium 1 M. La solution est laissée au repos quelques minutes pour que l'amidon sédimente, puis elle est filtrée à travers un tissu de Nylon (maille : 120 µm). Le filtrat est soumis à deux cycles de centrifugations différentielles : basse vitesse, 10 min à 2000 g et haute vitesse, 20 min à 16000 g. Entre les deux cycles de centrifugations différentielles, le culot est remis en suspension dans du tampon de lavage. Le culot de mitochondries brutes obtenu après la deuxième centrifugation à 16000 g est remis en suspension dans du tampon de lavage à l'aide d'un homogénéisateur de Dounce puis chargé sur 30 mL de Percoll 28% dans du tampon de lavage, dans un tube à centrifugation. Pendant la centrifugation (1 h 30 à 37000 g), un gradient de Percoll se forme et les mitochondries intactes sont séparées des membranes des amyloplastes et des mitochondries cassés. Les mitochondries purifiées sont prélevées au milieu du gradient, diluées dix fois dans du tampon lavage et centrifugées 15 min à 16500 g pour éliminer le Percoll (cette opération est réalisée deux fois).

Tampon d'extraction : 0,9 M saccharose, 90 mM phosphate de potassium pH 7,5, 6 mM EDTA, 0,6% BSA, 6 mM DTT

Tampon de lavage : 0,3 M saccharose, 30 mM phosphate de potassium pH 7,5, 1 mM EDTA, 0,1% BSA

Ce protocole est aussi utilisé pour la purification de mitochondries à partir de têtes de chou-fleur. La seule différence est qu'après le gradient de Percoll, les mitochondries purifiées doivent être diluées dans un plus grand volume de tampon de lavage (60x au lieu de 10x).

2.1.2. Fractionnement sous-cellulaire d'*Arabidopsis thaliana*

Ce fractionnement suit un protocole décrit par Sakamoto (Sakamoto *et al.*, 2000). Une culture de cellules d'*Arabidopsis thaliana* est filtrée à travers un filtre de nylon de 100 µm de maille. Les cellules retenues sur le filtre sont reprises dans du tampon enzyme contenant 0,5% (p/v) cellulase RS, 0,05% (p/v) pectolyase Y-23 pendant 3 h à 25°C sous agitation à 45 rpm. Ce traitement permet la dégradation de la paroi. La suspension de protoplastes obtenue est centrifugée 10 min à 800 g et le culot de protoplastes est lavé deux fois dans le tampon enzyme. Les protoplastes sont remis en suspension dans du tampon d'extraction puis cassés par trois passages à travers un filtre de nylon de 30 µm de maille. Une première centrifugation de 5 min à 100 g permet d'éliminer les noyaux et débris cellulaires. On effectue ensuite deux cycles de centrifugations différentielles : 5 min à 3000 g et 10 min à 16000 g. Entre les deux cycles, le culot est remis en suspension dans du tampon de lavage. Après la centrifugation à 3000 g, le culot contient une fraction enrichie en chloroplastes, qui sont purifiés sur un gradient discontinu à 40% et 80% de Percoll. Les chloroplastes purifiés sont récoltés à l'interface 40%-80% et lavés dans du tampon de lavage. Le surnageant de la première centrifugation à 16000 g est conservé comme témoin de la fraction cytosolique. Le culot de la deuxième centrifugation à 16000 g, enrichi en mitochondries, est repris dans un petit volume de tampon de lavage, chargé sur un gradient de Percoll discontinu (18%-23%-40%) et centrifugé 15 min à 20000 g. Les mitochondries purifiées sont récupérées à l'interface 18%-23% et lavées dans du tampon de lavage.

Tampon enzyme : 0,4 M mannitol, 3,5 mM MES-KOH pH 5,7

Tampon d'extraction : 0,4 M saccharose, 30 mM phosphate de potassium pH 7,5, 2 mM EDTA, 0,1% BSA, 2 mM DTT

Tampon de lavage : 0,3 M saccharose, 30 mM phosphate de potassium pH 7,5, 1 mM EDTA, 0,1% BSA

2.1.3. Purification de mitoplastes

Ce fractionnement, décrit par Werhahn (Werhahn *et al.*, 2001) permet de purifier la membrane externe et les mitoplastes, structures sphériques correspondant à des mitochondries gonflées dont la membrane externe a éclaté. Le culot obtenu après les centrifugations différentielles, enrichi en mitochondries (cf matériels & méthodes 2.1.2) est repris dans une solution hypotonique à une concentration en protéine de 1 mg/mL et la suspension obtenue est homogénéisée pendant 10 min à 4°C à l'aide d'un homogénéisateur de Dounce. La suspension est chargée sur un gradient discontinu de saccharose (60%-32%-15%) et centrifugée à 50000 g (rotor TST40, Kontron) pendant 1 h à 4°C. Les mitoplastes purifiés sont prélevés à l'interface des couches à 32% et 60% en saccharose, dilués lentement avec du tampon de lavage de manière à ramener la concentration en saccharose à 10%, puis lavés dans le tampon de lavage.

La bande blanche située à l'interface 15%-32%, enrichie en membrane externe, est prélevée. Le pourcentage en saccharose est ajusté à 50% à l'aide d'un réfractomètre. Cette fraction constitue la couche inférieure d'un gradient de saccharose discontinu (50%-32%-0%). Ce gradient est centrifugé 3 h à 250000 g (rotor SW50, Beckman) à 4°C. Après flottation, la membrane externe purifiée est prélevée à l'interface 0%-32%, diluée 4x avec la solution hypotonique et centrifugée 1 h à 100000 g (rotor TLA100, Beckman) à 4°C. Le culot de membrane est repris dans du PBS x1.

Solution hypotonique : 5 mM phosphate de potassium pH 7,4, 2 mM PMSF

Tampon de lavage : 0,3 M saccharose, 10 mM MOPS/KOH pH 7,2, 1 mM EDTA

PBS x1 : 80 mM Na₂HPO₄, 20 mM NaH₂PO₄ pH 7,5, 100 mM NaCl

2.1.4. Fractionnement des mitoplastes d'*Arabidopsis thaliana*

Ce fractionnement est réalisé d'après Spielwoy (Spielwoy *et al.*, 2001). Les mitoplastes sont dilués à 3 mg/mL de protéines dans du PBS x1 en présence de PMSF 2 mM. Ils sont soumis à trois cycles de congélation (azote liquide) / décongélation (37°C) suivis de trois sonications (appareil "Sonic Vibra Cells", 300 W). Cette solution est centrifugée 30 min à 100000 g à 4°C. Le culot est lavé, puis repris dans du PBS x1, c'est la fraction membranaire. Le surnageant, précipité au TCA et repris dans du PBS x1, constitue la fraction soluble.

2.1.5. Solubilisation des protéines extrinsèques

Les protéines extrinsèques peuvent être détachées des membranes à pH basique (Fujiki *et al.*, 1982). Les protéines membranaires (1 mg/mL) sont incubées dans du carbonate de sodium 0,1 M pH 11,5 en présence de PMSF 2 mM pendant 30 min à 4°C. La solution est centrifugée 10 min à 100000 g à 4°C. Le culot de membranes contenant les protéines membranaires intrinsèques est repris dans du PBS x1. Le surnageant est précipité au TCA et repris dans du PBS x1, il contient les protéines extrinsèques.

2.2. Méthodes concernant l'ADN

2.2.1. Extraction d'ADN à partir de plantes

Cette extraction est basée sur la méthode de Dellaporta (Dellaporta *et al.*, 1983). Un disque foliaire de 8 mm de diamètre est broyé dans un tube avec un piston. Le broyat est repris dans 150 µL de tampon d'extraction, le tout est incubé 5 min à 65°C. Les protéines sont précipitées, avec le SDS du tampon d'extraction, en ajoutant 33 µL d'acétate de potassium 5 M. Après incubation 5 min sur la glace, le mélange est centrifugé 10 min à 15000 g. L'ADN du surnageant est extrait au phénol/chloroforme (1/1) puis précipité à l'éthanol.

Tampon d'extraction : 100 mM Tris-HCl pH 8,0, 50 mM EDTA, 0,5 M NaCl, 10 mM β-mercaptoéthanol, 1% (p/v) SDS

2.2.2. Electrophorèse sur gel d'agarose

Cette technique permet de séparer des molécules d'ADN selon leur taille. Du tampon de charge A est additionné à la solution d'ADN, qui est ensuite chargée sur un gel d'agarose (0,7 à 2%, selon la résolution désirée) dans lequel a été incorporé du bromure d'éthidium 0,5 µg/mL. L'électrophorèse est effectuée dans du tampon TBE à 100 V. L'ADN, coloré par le bromure d'éthidium intercalé entre les plateaux de bases, est visualisé sous ultraviolets.

Tampon de charge A : 50% (v/v) glycérol, 0,1 M EDTA, 0,1% (p/v) SDS, 0,05% (p/v) bleu de bromophénol, 0,05% (p/v) xylène cyanol

Tampon TBE : 90 mM Tris-HCl pH 8,0, 90 mM acide borique, 2 mM EDTA

2.2.3. Purification des fragments d'ADN issus de gels d'agarose

Des fragments de gel d'agarose contenant l'ADN d'intérêt peuvent être découpés sous UV. L'ADN est ensuite extrait à l'aide du kit Concert[®] (Gibco BRL). L'agarose est solubilisé dans du perchlorate de sodium puis l'ADN est retenu par une membrane de silice. L'agarose et le tampon d'électrophorèse résiduels sont éliminés lors d'un lavage avec un tampon contenant de l'éthanol. L'ADN est finalement élué de la membrane par de l'eau stérile ou du TE.

TE : 30 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA

2.2.4. Digestion de l'ADN par des enzymes de restriction

La digestion d'ADN par une enzyme de restriction se fait selon les indications du fournisseur de l'enzyme. Une réaction de digestion contient 1-2 µg d'ADN, 1/10^{ème} de volume du tampon de restriction 10x approprié et 1 unité de l'enzyme de restriction. La réaction est placée 2 h à 37°C. Si une deuxième digestion par une enzyme utilisant un autre tampon de restriction doit être réalisée, l'ADN de la première réaction de digestion est extrait par un traitement au phénol/chloroforme 1/1 (v/v) puis précipité à l'éthanol.

2.2.5. Ligation de deux fragments d'ADN

Deux fragments d'ADN, digérés avec des enzymes de restriction donnant des extrémités cohésives, peuvent être reliés grâce à l'ADN ligase du bactériophage T4. La quantité d'ADN nécessaire est calculée selon la formule suivante (pour un fragment 1 plus petit que le fragment 2, excès molaire du plus petit fragment : 5 x) :

quantité de fragment 1 (en ng) = 5 x quantité de fragment 2 (en ng) x (taille du fragment 1 / taille du fragment 2)

La réaction est réalisée dans du tampon ligation avec 3 unités de T4 ADN ligase, 15 h à 15°C. L'ADN est ensuite précipité à l'éthanol, repris dans un petit volume d'eau et une

fraction (généralement $1/10^{\text{ème}}$) de cet ADN est utilisé pour transformer des bactéries compétentes. Une fraction de la réaction de ligation ($1/10^{\text{ème}}$) peut aussi être directement utilisée lors de la transformation.

Tampon ligation : 30 mM Tris-HCl pH 7,8, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP

2.2.6. Transformation

Des bactéries électro-compétentes sont préparées par lavage de bactéries en phase exponentielles de croissance avec de l'eau stérile à 4°C. Elles sont conservées à -80°C dans du glycérol 10%.

Une fraction de ligation précipitée est mélangée avec 40 µL de bactéries électro-compétentes et le tout est transféré dans une cuve à électroporation. Lors de la décharge électrique (Capacité 25 µF, 2,5 kV, 200 Ω, Biorad Gene Pulser), des pores transitoires sont formés dans la paroi bactérienne et, ainsi, l'ADN peut pénétrer dans la bactérie. Les bactéries transformées sont diluées dans 1 mL de Milieu LB contenant 0,2 % (p/v) de glucose et incubées 30 min à 37°C. Cette incubation permet aux bactéries de reconstituer leur paroi et d'exprimer le gène de résistance présent sur le plasmide. Les bactéries sont ensuite étalées sur une boîte LB-Agar contenant l'antibiotique approprié. La boîte est placée 15 h à 37°C. Si le plasmide contient le marqueur pour l' α -complémentation, 40 µL de X-Gal 2 % (p/v) dans du diméthylformamide et 20 µL d'IPTG 0,1 M sont ajoutés au milieu avant d'étaler les bactéries.

LB (Lennox L broth, Sigma) : 5 g/L tryptone, 10 g/L yeast extract, 5 g/L NaCl

2.2.7. Préparation d'ADN plasmidique

Mini-préparation

Une culture bactérienne de 1,5 mL, cultivée pendant 15 h à 37°C, est centrifugée 5 min à 5000 g pour sédimenter les bactéries. Le culot est repris dans un volume de solution isotonique (solution I), puis les bactéries sont lysées par un traitement alcalin avec deux volumes de solution II. Ce traitement dénature l'ADN chromosomique et les protéines. Le lysat est neutralisé avec une grande concentration de sels (un volume et demi de solution III).

Après centrifugation, l'ADN plasmidique solubilisé est extrait avec un volume de phénol/chloroforme 1/1 (v/v) puis précipité avec deux volumes d'éthanol 100%. Un traitement à la ribonucléase A est réalisé pour éliminer les ARN contaminants.

Solution I : 50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA

Solution II : 0,2 M NaOH, 1% SDS

Solution III : 5 M acétate de potassium

Midi-préparation

Les midi-préparations d'ADN sont réalisées avec le kit Jetstar (Genomed) à partir de culture bactérienne de 50 mL (cultivées 15h à 37°C). Les bactéries sont lysées par une méthode dérivée de la lyse alcaline/SDS. Après neutralisation, le lysat est chargé sur une colonne (résine échangeuse d'anions) et l'ADN plasmidique est retenu sur la matrice. La colonne est lavée pour se débarrasser des ARN et des impuretés. L'ADN plasmidique est élué puis précipité à l'isopropanol.

2.2.8. Séquençage d'ADN

Le séquençage de l'ADN a été réalisé par P. HAMMANN et M. ALIOUA (service de séquençage de l'IBMP) avec un appareil 'Applied Biosystems 373 DNA sequencer' (Perkin Elmer). La méthode utilisée est basée sur la technique de Sanger (Sanger *et al.*, 1977).

2.2.9. Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR)

Cet technique permet d'amplifier un fragment d'ADN, déterminé par le choix des amorces, de manière exponentielle par des cycles répétés de dénaturation-hybridation-élongation. Un milieu réactionnel de 50 µL comprend :

- 5 pmol de chaque amorce
- 1,5 – 2,5 µM MgCl₂
- 5 µL de tampon PCR 10x (GibcoBRL)
- 200 µM de dNTP
- 1 U de Taq polymérase (n'ayant pas d'activité 5'-3'exonucléase)

- 1-100 ng de la matrice (ADN plasmidique, fragment d'ADN) à amplifier.

La température d'hybridation est choisie dans une plage de 4°C en dessous de la température de fusion des amorces. Pour limiter les réactions aspécifiques, une PCR 'Hot-Start' est réalisée : l'enzyme et les amorces sont rajoutées après la dénaturation initiale.

La PCR sur colonies bactériennes permet de tester rapidement les clones transformés avec le fragment d'ADN d'intérêt. Les bactéries sont prélevées avec un cure-dent qui est trempé dans le milieu réactionnel de PCR puis déposé dans un tube stérile contenant du milieu LB afin d'ensemencer une culture pour préparer l'ADN plasmidique des clones positifs.

Tampon PCR 10x : 200 mM Tris-HCl pH 8,4, 500 mM KCl

2.3. Méthodes concernant les ARN

2.3.1. Extraction des ARN d'*Arabidopsis thaliana*

L'extraction des ARN se fait selon la méthode décrite par Goodall (Goodall *et al.*, 1990). Les ARN sont extraits à partir d'organes aériens âgés d'un mois ou de racines âgées de deux mois. Ces organes sont broyés au mortier dans de l'azote liquide. Un gramme de la poudre obtenue est repris dans 3 mL de tampon d'extraction. On ajoute 0,2 mL d'acétate de sodium 3 M pH 4,8, puis 3 mL de phénol saturé en eau et 0,6 mL de chloroforme/alcool isoamylique (24/1). La solution est agitée vigoureusement puis placée 15 min dans la glace. Après centrifugation 30 min à 15000 g, la phase aqueuse est récupérée et d'autres extractions au phénol/chloroforme (1:1) sont réalisées jusqu'à ce que l'interface soit propre. Les acides nucléiques sont précipités par addition d'un volume d'isopropanol (1 h à -20°C) à la phase aqueuse. Après une centrifugation de 30 min à 15000 g le culot d'ARN est lavé à l'éthanol 70% et séché rapidement à l'air et repris dans de l'eau distillée stérile. La quantité d'ARN est déterminée en mesurant l'absorbance à 260 nm, une unité de DO₂₆₀ correspond à 50 µg/mL d'ARN.

Tampon d'extraction : 4 M guanidine thiocyanate, 25 mM citrate de sodium pH 7,0, 0,5% sarcosylate de sodium, 0,1 mM β-mercapto-éthanol

2.3.2. Gel d'agarose dénaturant pour ARN

Il faut dénaturer les molécules d'ARN pour pouvoir les séparer selon leur taille. Les ARN sont déstructurés par un traitement à 65°C pendant 5 min dans deux volumes de tampon de dénaturation. Ces ARN dénaturés sont ensuite chargés (avec du tampon de charge) sur un gel d'agarose 1,2 % contenant 5% (v/v) de formaldéhyde préparé dans du tampon MOPS. La migration est réalisée à 100 V dans du tampon MOPS.

Tampon de dénaturation : tampon MOPS, 70% (v/v) formamide, 20% (v/v) formaldéhyde

Tampon de charge ARN : 50% (v/v) glycérol, 0,5 µg/mL bromure d'éthidium, 0,4% (p/v) bleu de bromophénol

Tampon MOPS : 20 mM MOPS pH 7,0, 5 mM acétate de sodium, 1 mM EDTA

2.3.3. Synthèse d'une sonde radioactive

Une sonde radioactive est synthétisée grâce au kit DECAprime II (Ambion). A partir d'un produit de PCR, le marquage est réalisé par le fragment de Klenow, qui utilise des décamères comme amorces et synthétise un fragment d'ADN complémentaire à sa matrice (un brin du fragment de PCR). Il incorpore du α -[³²P]dCTP, présent dans le mélange réactionnel, au fragment néosynthétisé. Le marquage de la sonde aura donc lieu sur toute la longueur de celle-ci.

2.3.4. Northern blot et hybridation

Après séparation des ARN sur gel dénaturant, ils sont transférés sur une membrane de nylon Hybond N (Amersham) par capillarité pendant 15 h dans du tampon MOPS. Des liaisons covalentes entre les ARN et la membrane sont réalisées par traitement aux ultraviolets avec un UV-Stratalinker 2400 (1200 Joules, Stratagene).

La membrane est préhybridée dans du tampon d'hybridation 1 h à 65°C dans un four à hybridation. La sonde est ensuite ajoutée au tampon d'hybridation et l'incubation continue pendant 15 h. La membrane est ensuite lavée avec du tampon lavage contenant du 1x SSC 15 min à 65°C puis avec du tampon de lavage contenant du 0,1x SSC 15 min à 65°C. Pour

révéler le marquage, la membrane est exposée soit à une plaque PhosphorImager, soit à un film photosensible.

Tampon d'hybridation : 5x SSC, 0,1% (p/v) SDS, 5% (v/v) Liquid Block (Amersham)

10x SSC : 150 mM citrate de sodium pH 7,0, 1,5 M NaCl

Tampon lavage : 0,1x – 1x SSC, 0,1% (p/v) SDS

2.3.5. Transcription inverse

Cette technique permet de synthétiser l'ADNc correspondant à un ARN grâce à une transcriptase inverse ou ADN polymérase ARN dépendante. L'ARN (5 µg) est dénaturé 5 min à 65°C en présence de 5 pmol d'amorce (oligo-dT pour l'amplification des ARN contenant une queue poly(A), hexamères aléatoires pour l'amplification de tous les ARN ou amorce séquence-spécifique pour l'amplification d'un ARN particulier). La réaction s'effectue dans du tampon RT, en présence de dNTP 0,4 mM, DTT 10 mM, et de 10 U de Transcriptase inverse SUPERScript II (Invitrogen) pendant 2 h à 37°C. 1/10^{ème} de cette réaction est utilisé pour une réaction de PCR.

Tampon RT x5 : 250 mM Tris-HCl pH 8,3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 50 mM DTT

2.3.6. RACE en 5'

La RACE ('rapid amplification of cDNA ends') permet de déterminer les extrémités d'un ADNc. Cette expérience a été réalisé avec le kit 5' RACE de GibcoBRL. Un ADNc spécifique à l'ARNm du gène d'intérêt est synthétisé par transcription inverse. Une queue poly(C) est ajoutée en 3' de cet ADNc par la terminal nucléotidyl transferase, puis une PCR est réalisée en utilisant une amorce poly(G)-adaptateur (l'adaptateur permet l'ajout de sites de clonages en 3' du poly-C) et une amorce spécifique au gène. Une seconde PCR en utilisant une amorce s'hybridant sur l'adaptateur. Le produit de cette PCR est ensuite cloné puis séquencé.

2.4. Méthodes concernant les protéines

2.4.1. Quantification des protéines

La concentration d'une solution de protéine est estimée en utilisant la méthode de Bradford (Bradford, 1976). Le réactif de Bradford, qui contient du bleu de Coomassie, a une couleur brune à cause du pH bas de cette solution. Le pKa du bleu de Coomassie change lorsqu'il se fixe sur une protéine, et le colorant devient bleu. La concentration en protéine d'une solution est estimée en mesurant son absorbance à 595 nm, en présence du réactif de Bradford (100 µL d'échantillon + 1 mL de réactif), et en comparant la valeur obtenue à une courbe standard obtenue avec des concentrations connues de BSA.

Réactif de Bradford : 0,01% (p/v) bleu de Coomassie G-250, 4,7% (v/v) éthanol, 8,5% (v/v) acide orthophosphorique

2.4.2. Concentration des protéines

Précipitation au TCA

Cette précipitation de protéines est réalisée avec une solution d'acide trichloracétique (TCA, 10% final) pendant 1 h sur la glace. Après centrifugation 15 min à 15000 g à 4°C, le culot est lavé avec de l'acétone 80%, puis séché à l'air. Les protéines sont reprises dans du PBS x1.

Concentration (centrifugal filter devices, Amicon corporation)

Le principe de ces concentrateurs est l'ultrafiltration sélective. Ces concentrateurs ont une taille limite de maille (5 ou 10 kDa, selon le modèle) et les molécules de taille supérieure à cette taille limite sont retenues par la membrane hydrophobe tandis que les petites molécules telles les sels traversent la membrane. Ainsi, ces concentrateurs peuvent être utilisés pour concentrer une solution protéique ou pour changer le tampon d'une solution. Les échantillons

sont chargés dans le concentrateur et celui-ci est centrifugé à 2000 g jusqu'à ce que la concentration désirée est atteinte.

2.4.3. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide

Electrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)

Les gels utilisés en SDS-PAGE sont composés de deux parties : un gel de concentration et un gel de séparation. Les gels de séparation utilisés sont soit des gels à concentration uniforme (12%, 15%, 20%) ou des gels gradients (10-17% ou 12-20%). Un volume de tampon de charge P x2 est ajouté aux échantillons et le tout est chauffé 5 min à 100°C. Le β -mercaptoéthanol va réduire les ponts disulfure et le SDS va dénaturer les protéines et, en se fixant sur les chaînes peptidiques, attribuer une charge nette négative qui va être fonction de la taille de la protéine. Ainsi les protéines sont séparées selon leur masse moléculaire. La migration est réalisée dans du tampon Laemmli (Laemmli, 1970) sous un ampérage constant de 25 mA.

Gel de concentration : 5% acrylamide/bisacrylamide 37,5/1, 0,125 M Tris-HCl pH 6,8, 0,1% (p/v) SDS, 0,1% (v/v) APS, 0,01% (v/v) TEMED

Gel de séparation à x% : x% acrylamide/bisacrylamide 37,5/1, 0,375 M Tris-HCl pH 8,8, 0,1% (p/v) SDS, 0,1% (v/v) APS, 0,008% (v/v) TEMED

Tampon de charge P x2 : 100 mM Tris-HCl pH 6,8, 2% (p/v) SDS, 10% (v/v) glycérol, 3% (v/v) β -mercaptoéthanol, 0,1% (p/v) bleu de bromophénol

Tampon Laemmli : 25 mM Tris-HCl pH 8,3, 250 mM glycine, 0,1% (p/v) SDS

Electrophorèse bidimensionnelle (IEF-SDS-PAGE)

Cette méthode permet de séparer des protéines selon leur pI puis d'après leur poids moléculaire. Les protéines sont précipitées 15 h avec de l'acétone 100%. Après centrifugation 10 min à 15000 g, le culot est lavé avec de l'acétone 80%, séché à l'air puis repris dans du tampon de réhydratation (300 μ L pour les gels de 17 cm, 150 μ L pour les gels de 7 cm).

La première dimension est réalisée dans des bandelettes à gradient de pH (ReadyStrip™ IPG, Biorad). Ces bandelettes sont composées d'un gel déshydraté fixé sur un support solide. Le gel est réhydraté de manière active (8-10 h à 50 V) avec la solution protéique. Puis la migration des protéines est réalisée, selon les instructions du fournisseur, en trois étapes : conditionnement à 250 V pendant 1 h, montée en voltage pendant 2 à 5 h jusqu'au voltage maximum (8000 V pour les bandelettes de 7 cm, 10000 V pour les bandelettes de 17 cm) puis fin de focalisation au voltage maximum pendant 1 h. Pendant la migration, l'ampérage est maintenu constant à 50 µA/bandelette.

La bandelette est ensuite réduite dans du tampon de réduction (15 min à 20°C) et alkylée dans du tampon d'alkylation (15 min à 20°C) puis elle est déposée sur un gel de séparation SDS-PAGE. De l'agarose 1% permet de sceller la bandelette sur le gel de concentration. La migration est réalisée selon les conditions habituelles pour un SDS-PAGE.

Tampon de réhydratation : 8 M urée, 2% (p/v) CHAPS, 0,5% (p/v) ampholytes Bio-Lyte® 3/10 ou 7/10 (Biorad), 0,001% bleu de bromophénol

Tampon de réduction : 6 M urée, 2% (p/v) SDS, 0,375 M Tris-HCl pH 8,8, 20% (p/v) glycérol, 2% (p/v) DTT

Tampon d'alkylation : 6 M urée, 2% (p/v) SDS, 0,375 M Tris-HCl pH 8,8, 20% (p/v) glycérol, 2,5% iodoacétamide, 0,001% bleu de bromophénol

Electrophorèse en condition native (BN-PAGE)

Cette technique d'électrophorèse bidimensionnelle permet de séparer des complexes selon leur taille en conditions natives lors de la première dimension puis les sous-unités de ces complexes sont séparées lors de la seconde dimension, un SDS-PAGE classique. Le BN-PAGE est réalisé en suivant un protocole décrit par Jansch (Jansch *et al.*, 1996) pour étudier les complexes protéiques mitochondriaux. La mobilité électrophorétique est conférée aux protéines par le bleu de Coomassie qui est chargé négativement.

- Solubilisation des complexes membranaires mitochondriaux

Pour leur analyse, les complexes protéiques doivent être débarrassés des lipides les entourant pour pouvoir être séparés par électrophorèse. Des membranes mitochondriales (cf

2.1.4) sont solubilisées en utilisant un détergent doux, le n-dodécylmaltoside (avec un rapport détergent/ protéine 3/1 (g/g)) dans un tampon de solubilisation, 30 min à 4°C. Les complexes protéiques solubilisés sont séparés par centrifugation 30 min à 100000 g à 4°C (rotor TLA-100, Beckman).

Tampon de solubilisation : 1,5 M acide aminocaproïque, 100 mM BisTris pH 7,0, 1 mM EDTA

- 1^{ère} dimension

Le mélange acrylamide/bisacrylamide contient 48% d'acrylamide et 1,5% de bisacrylamide avec une concentration totale de monomères de 49,5% et un pourcentage d'agents liants par rapport au total de monomères de 3%. L'électrophorèse en 1^{ère} dimension en condition native se fait dans un gel gradient 5-16%. Le gel de concentration est fait de 4% d'acrylamide.

Les complexes solubilisés sont mélangés avec du bleu Serva G (solution stock à 5% dans 500 mM d'acide aminocaproïque) pour avoir un rapport détergent/colorant de 4/1. La migration se déroule à 4°C, 1 h à 100 V puis 4-5 h à 500 V dans des tampons cathode et anode. Les deux premiers tiers se déroulent avec du tampon cathode additionné de 0,02% de bleu Serva G.

Gel de concentration : 4% mélange d'acrylamide, 6 mM BisTris pH 7,0, 52 mM acide aminocaproïque, 0,08% (p/v) APS, 0,08% (v/v) TEMED

Gel de séparation : 5-16% mélange d'acrylamide, 6 mM BisTris pH 7,0, 215 mM acide aminocaproïque, 0,4% (p/v), 0,4% (v/v) TEMED

Tampon anode 10x : 500 mM BisTris pH 7,0

Tampon cathode 10x : 500 mM tricine, 150 mM BisTris pH 7,0

- 2^e dimension

Une piste de gel obtenue lors de la migration en conditions natives est découpée puis incubée 1 h dans du tampon de dénaturation. Le fragment de gel est inclus dans le gel de concentration d'un SDS-PAGE classique et l'électrophorèse se déroule comme décrit ci-dessus.

Tampon de dénaturation : 1% (p/v) SDS, 1% (v/v) β -mercaptoéthanol, 50 mM Tris-HCl pH 6,8

2.4.4. Détection des protéines

Coloration au bleu de Coomassie

Après migration, les protéines séparées sur gel de polyacrylamide peuvent être fixées et colorées avec une solution de coloration. L'excès de colorant est éliminé dans un mélange Ethanol 20% (v/v)/Acide acétique 10% (v/v).

Solution de coloration : 0,125% (p/v) bleu de Coomassie, 10% (v/v) acide acétique, 25% (v/v) éthanol

Coloration au bleu colloïdal

Cette méthode dérivée du protocole de Neuhoff (Neuhoff *et al.*, 1988) est plus sensible que la coloration au bleu de Coomassie. Le gel de polyacrylamide est fixé, après migration, 1 h dans du TCA 12% (v/v). Après élimination du TCA, le gel est coloré avec la solution G250 sous légère agitation. Le temps de coloration (12 h \rightarrow une semaine) dépend de la sensibilité désirée, la solution G250 est remplacée toutes les 24 h. Après coloration, le gel est rincé avec une solution de méthanol 25% (v/v) pour nettoyer la surface du gel.

Solution G250 : 3% (v/v) acide orthophosphorique 85%, 6% (p/v) sulfate d'ammonium, 0,1% G250 stock.

G250 stock : Cette préparation est une suspension obtenue par dissolution d'une pélite de bleu de Coomassie dissoute dans 50% (v/v) éthanol, 10% (v/v) acide acétique. La pélite de bleu de Coomassie se prépare de la manière suivante : 10 g de bleu de Coomassie G250 sont repris dans 250 mL d'acide acétique 7,5% (v/v) à 70°C, puis du sulfate d'ammonium est rajouté jusqu'à ce que la solution devienne claire. La solution est refroidie à 20°C et le surnageant est éliminé.

2.4.5. Surexpression de protéines dans *E. coli*

L'ADNc codant pour une protéine d'intérêt (ou un fragment de cette protéine) est introduit dans un vecteur d'expression (pQE60). Le vecteur obtenu est utilisé pour transformer une souche d'expression (BL21). Le clone obtenu est mis en préculture dans 10 mL de milieu LB liquide additionné d'ampicilline et de kanamycine et incubé sous agitation 15 h à 37°C

Une culture de 500 mL de milieu LB, contenant 1% (p/v) de glucose et les antibiotiques appropriés, est démarrée avec les 10 mL de préculture. Lorsque la DO_{600} de la culture atteint 0,6, l'expression de la protéine est induite par ajout d'IPTG (1 mM final). Après 3 h la culture est centrifugée 10 min à 5000 g et le culot est conservé.

2.4.6. Purification de polypeptides sur colonne d'affinité Ni-NTA

Les protéines surexprimées avec un vecteur d'expression de type pQE possèdent une étiquette poly-histidine. La purification de protéines contenant ce type d'étiquette se fait sur une colonne de Nickel (Ni-NTA-agarose, Qiagen) qui fixe les histidines par liaison de coordination. La rupture de cette association peut se faire de deux manières différentes, soit en condition dénaturantes (élution en baissant le pH ce qui déstabilise l'interaction nickel-histidine), soit en condition native (la protéine est éluée en rajoutant de fortes concentrations d'un analogue de l'histidine, l'imidazole).

Purification en conditions dénaturantes

Les bactéries provenant d'une culture de 500 mL sont remises en suspension dans du tampon B (5 mL de tampon par gramme de culot) et éclatées dans une bombe de désintégration de cellules (BARR Instrument). La suspension de bactéries est placée dans un cylindre en acier dans lequel on introduit de l'azote jusqu'à obtenir une pression de 100 bars. Les bactéries éclatent à leur retour à la pression atmosphérique. La solution obtenue est centrifugée à 15000 g et le surnageant est incubé avec la matrice (Ni-NTA-agarose, Qiagen, 1 mL de matrice Ni-NTA 50% pour 4 mL de lysat) 1 h à température ambiante en l'agitant sur un bascule. La matrice est retenue dans une colonne puis lavée avec 20 volumes de tampon C. L'association nickel-histidine est rompue à pH acide au cours des 4 éluions avec du tampon

D (2,5 volumes de matrice) et des 4 éluions avec du tampon E (2,5 volumes de matrice). Les différentes fractions obtenues sont analysées par SDS-PAGE.

Tampon B : 8 M urée, 0,1 M NaH₂PO₄, 0,01 M Tris-HCl pH 8,0

Tampon C : 8 M urée, 0,1 M NaH₂PO₄, 0,01 M Tris-HCl pH 6,3

Tampon D : 8 M urée, 0,1 M NaH₂PO₄, 0,01 M Tris-HCl pH 5,9

Tampon E : 8 M urée, 0,1 M NaH₂PO₄, 0,01 M Tris-HCl pH 4,5

Purification en conditions natives

Le culot de bactéries est repris dans du tampon de lyse (5 mL par gramme de culot). La suspension est soniquée 6x 10 s (appareil "Sonic Vibra Cells", 300 W) puis centrifugée 20 min à 10000 g. Le surnageant est incubé avec la matrice (1 mL de matrice pour 4 mL de lysat) 1 h à température ambiante sur une bascule. Après rétention de la matrice sur une colonne, 4 lavages sont réalisés (4x 8 volumes de matrice de tampon de lavage). La protéine est éluée avec du tampon d'éluion (4x 2 volume de matrice).

Tampon de lyse : 50 mM NaH₂PO₄, pH 8,0, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, 1 g/L lysozyme

Tampon de lavage : 50 mM NaH₂PO₄, pH 8,0, 300 mM NaCl, 30 mM imidazole

Tampon d'éluion : 50 mM NaH₂PO₄, pH 8,0, 300 mM NaCl, 250 mM imidazole

2.5. Méthodes immunologiques

Les anticorps utilisés lors de ces travaux sont présentés en Annexe 3.

2.5.1. Obtention d'anticorps

L'immunisation de lapins en vue d'obtenir des anticorps polyclonaux a été réalisée par B. Jessel à l'animalerie de l'IBMP-IBMC. Le polypeptide purifié a été injecté à deux lapins (8 injections de 100 µg de protéine dans de l'adjuvant de Freund (complet pour la première

injection et incomplet pour les suivantes), une injection toutes les deux semaines). A partir de la quatrième injection, des saignées sont réalisées en alternance avec les injections. Après la dernière injection, les lapins sont saignés à blanc.

2.5.2. Purification des anticorps

Les anticorps spécifiques ont été purifiés sur colonne d'affinité. La colonne est constituée d'une matrice de Sepharose-CNBr sur laquelle est fixé le peptide antigène. La matrice est activée par de l'HCl 0,1 M. Puis 1 mg de polypeptide purifié, repris dans 700 µL de tampon de couplage, est couplé à la matrice 1 h à température ambiante puis 15 h à 4°C. Les fonctions cyanogènes de la matrice réagissent avec les amines primaires du polypeptide de manière à former des liaisons covalentes. Après lavage dans 5 mL de tampon de couplage, les sites restés libres sont bloqués par addition de Tris-HCl 1 M pH 8,0 pendant 2 h à température ambiante. La matrice est ensuite retenue sur une colonne puis lavée avec 3 mL de tampon S1 puis 3 mL de tampon S2 pour éliminer les polypeptides non couplés.

Le sérum à purifier (2 mL), dilué 10 fois dans le tampon L1, est centrifugé à 10000 g pendant 10 min puis le surnageant est chargé sur la colonne. La matrice est lavée avec 20 mL de tampon L1.

Les anticorps sont élués à pH acide (2 mL de tampon E1, neutralisation avec 0,5 mL de Tris-HCl 1 M pH 8,0) puis à pH basique (2 mL de tampon E2, neutralisation avec 0,5 mL de Tris-HCl 2 M pH 7,5). Les pH extrêmes fragilisent l'interaction antigène-anticorps et permettent ainsi l'éluion des anticorps. Les éluions sont dialysées contre du PBS x1. Les anticorps purifiés sont conservés dans du glycérol 50%, 0,1% BSA.

Tampon de couplage : 0,1 M NaHCO₃, 0,5 M NaCl pH 8,3

Tampon S1 : 0,1 M acétate de sodium, 0,5 M NaCl pH 4,0

Tampon S2 : 0,1 M Tris-HCl, 0,5 M NaCl pH 8,0

Tampon L1 : 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,3 M NaCl

Tampon L2 : 10 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,3 M NaCl

Tampon E1 : 100 mM glycine pH 2,5, 0,3 M NaCl

Tampon E2 : 100 mM tri éthylamine pH 11,5, 0,3 M NaCl

2.5.3. Transfert des protéines sur membrane de PVDF

Cette technique permet de transférer les protéines d'un gel de polyacrylamide sur membrane microporeuse de 0,45 µm de PVDF (Immobilon P, Millipore). La membrane est mouillée avec du méthanol 100% puis rincée dans du tampon de transfert. Un sandwich est formé avec, de l'anode vers la cathode, un Scotch Brite[®], deux feuilles de papier filtre Whatman[®] 3 MM, la membrane, le gel, deux autres feuilles Whatman[®] 3 MM et un Scotch Brite[®]. L'électrotransfert est réalisé en milieu liquide dans un container (tank transfer system, Biorad) sous un ampérage constant de 250 mA pendant 45 min dans du tampon de transfert. Après le transfert, la membrane peut être colorée avec une solution de bleu de Coomassie pour visualiser les protéines.

Tampon de transfert : 50 mM Tris base, 50 mM acide borique.

Solution de coloration : 0,1% (p/v) bleu de Coomassie R250, 50% (v/v) méthanol, 7% (v/v) acide acétique

Solution de décoloration : 50% (v/v) méthanol, 7% (v/v) acide acétique

2.5.4. Immunodétection

La membrane est incubée dans du tampon bloquant 1 h à température ambiante sous agitation pour saturer les sites de fixation aspécifiques. Puis, la membrane est incubée avec l'anticorps primaire (de lapin ou de souris) 15 h à 4°C sous agitation dans du tampon anticorps. Après 3 lavages avec une solution de PBS-T pour éliminer les anticorps non-attachés, la membrane est incubée avec l'anticorps secondaire (anticorps de chèvre anti-lapin ou anti-souris, couplés à la peroxydase de raifort) 1 h à température ambiante sous agitation. Après 3 lavages, la révélation est réalisée grâce au kit ECL ("Enhanced Chemical Luminescence") Western Blotting detection system (Amersham) d'après les indications du fournisseur.

Dans certains cas, les membranes peuvent être réutilisées. Pour cela, les anticorps sont décrochés par incubation dans une solution contenant du Tris-HCl 1 M pH 6,8, du SDS 2% et du β mercapto-éthanol 0,7%, 30 min à 50°C. Les membranes sont lavées avec du PBS-T.

PBS-T : 80 mM Na₂HPO₄, 20 mM NaH₂PO₄ pH 7,5, 100 mM NaCl, 0,2% (v/v) Tween-20

Tampon bloquant : 5% (p/v) lait écrémé en poudre dans du PBS-T

Tampon anticorps : 2% (p/v) lait écrémé en poudre dans du PBS-T

2.5.5. Far-Western

Cette technique permet de mettre en évidence des interactions entre une protéine purifiée et des protéines transférées sur une membrane. Des protéines mitochondriales sont séparées par SDS-PAGE puis transférées sur une membrane de PVDF. La membrane est lavée deux fois 15 min avec du tampon de renaturation (pour éliminer le SDS) puis incubée 15 h dans ce même tampon pour renaturer les protéines transférées. La membrane est saturée dans du tampon de renaturation contenant 5% (p/v) de lait écrémé pendant 1 h. La membrane est ensuite incubée avec la protéine purifiée (10 µg/mL) dans du tampon de renaturation contenant 2% (p/v) de lait écrémé pendant 15 h à 4°C. Après trois lavages avec du tampon de renaturation, une immunodétection est réalisée avec des anticorps dirigés contre la protéine purifiée.

Tampon de renaturation : 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 75 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, 0,1% NP40.

2.5.6. Immunoprécipitation

Des mitochondries fraîchement purifiées ou récoltées après importation *in vitro*, sont solubilisées et dénaturées pendant 5 min dans du Tris-HCl 0,1 M pH 8,4, 3% (p/v) SDS. Après centrifugation 10 min à 12000 g, le surnageant est dilué dans du tampon TNET. 10 à 50 µL d'anticorps sont ajoutés et le mélange est incubé 15 h à 4°C. Ensuite, 5 mg de protéine-A Sepharose (Sigma), gonflée dans du TNET sont ajoutés pour précipiter les complexes antigène/anticorps. La protéine A est un polypeptide de 42 kDa, présent dans la paroi de *Staphylococcus aureus*, qui se fixe sur les domaines constants des anticorps. Après incubation 1 h à 4°C, les complexes antigènes-anticorps piégés par la protéine-A sont sédimentés par centrifugation à 2000 g et lavés 3x avec du tampon TNET. L'analyse de l'immunoprécipitation se fait par SDS-PAGE.

Tampon TNET : 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% (v/v) Triton X100

2.5.7. Co-immunoprécipitation

Cette technique permet de montrer l'interaction entre deux protéines pour lesquelles des anticorps sont disponibles. 500 µg de protéines membranaires sont solubilisées dans du tampon de solubilisation pendant 1 h à 4°C. Après centrifugation 20 min à 15000 g à 4°C, le surnageant est incubé avec un peu d'anticorps dirigés contre une des deux protéines d'intérêt pendant 1,5 h à 4°C sous agitation. 5 mg de protéine-A Sepharose, gonflée et lavée avec le tampon HNMG, sont ajoutés au mélange membrane/ anticorps et la solution est incubée 1,5 h à 4°C sous agitation. La Sepharose est sédimentée par centrifugation 2 min à 15000 g puis lavée 3x avec le tampon de solubilisation et 1x avec du PBS. Les protéines associées avec le complexe anticorps-protéine-A Sepharose sont traitées avec du tampon de charge P x2 pendant 20 min à température ambiante. Après migration sur SDS-PAGE, transfert sur membrane de PVDF, les protéines sont testées avec des anticorps dirigés contre la 2^e protéine d'intérêt.

Tampon de solubilisation : 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,5 mM PMSF, 1% (p/v) n-dodécylmaltoside

Tampon HNMG : 20 mM HEPES pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1% (p/v) n-dodécylmaltoside, 10% (v/v) glycérol

2.6. Import *in vitro*

2.6.1. Synthèse *in vitro* d'une protéine radioactive

La synthèse d'une protéine marquée avec de la méthionine ³⁵S est réalisée dans un système de transcription/traduction couplé (TNT, Promega) utilisant du lysat de réticulocytes de lapin. Le milieu réactionnel (50 µL) contient 1 µg d'ADN plasmidique, 28 U de RNasin (Amersham Pharmacia Biotech), 20 µM d'un mélange d'acides aminés sans méthionine et 40 µCi [³⁵S]Met (1 Ci/mmol). La réaction est réalisée 2 h à 30°C. L'extrait est utilisé directement dans les expériences d'import.

2.6.2. Tests d'import *in vitro*

Test d'importation de base

Pour chaque test d'importation on utilise 150 μg d'équivalent protéine de mitochondries de pomme de terre ou de chou-fleur reprises dans 200 μL de tampon d'import en présence d'ATP 100 μM , d'ADP 20 μM , de malate 1 mM et de NADH 100 μM auquel on ajoute 4 μL de produit de traduction. Après une incubation de 30 min à 25°C sous agitation, les mitochondries sont déposées sur un coussin de saccharose à 27% et centrifugées 10 min à 12000 g. Le culot obtenu contient les protéines mitochondriales qui sont analysées par SDS-PAGE. Le gel est coloré, séché sous vide puis exposé à une plaque de PhosphorImager ou à un film photosensible.

Tampon import : 1 mM phosphate de potassium pH 7,5, 0,25 M mannitol, 20 mM HEPES, 80 mM KCl, 100 μM DTT

Coussin de saccharose 27% : 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 27% (p/v) saccharose, 1 mM EDTA, 100 mM K_2HPO_4 , 1 mg/mL BSA

Traitement à la protéinase K

Le traitement à la protéinase K 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ est réalisé après l'incubation à 25°C pendant 30 min sur la glace. La réaction est stoppée par addition de PMSF (2 mM). Les mitochondries sont ensuite déposées sur le coussin de saccharose.

Import en absence de potentiel transmembranaire

La valinomycine et le CCCP dissipent le potentiel transmembranaire de la membrane interne en permettant la diffusion de protons (CCCP) ou d'ion potassium (valinomycine) dans la matrice. Les conditions d'import sont identiques au test d'importation de base. La valinomycine (50 pM) ou le CCCP (50 μM) sont ajoutés aux mitochondries 5 min avant le produit de traduction.

Traitement des mitochondries au Triton X100

Ce traitement s'effectue après le test d'importation et le passage des mitochondries à travers le coussin de saccharose : le culot de mitochondries est repris dans 5 μL de PBS x1 et 1 μL de 10% Triton X100 permet de détruire les systèmes membranaires mitochondriaux. Après ce traitement, l'extrait est traité à la protéinase K comme décrit ci-dessus.

Import en absence d'ATP à l'extérieur

Pour réaliser ces conditions expérimentales, il faut dégrader l'ATP présent à l'extérieur des mitochondries et bloquer l'export d'ATP synthétisé dans les mitochondries avant de réaliser les tests d'importation. Le produit de traduction est donc traité pendant 5 min à 30°C par 10 U/mL d'apyrase qui dégrade l'ATP et l'ADP en AMP. Par ailleurs, les mitochondries sont traitées 5 min sur la glace avec 50 $\mu\text{g/mL}$ d'atractyloside, qui bloque l'Adénine Nucléotide Translocase (ANT), dans du tampon import et du malate 1mM. Puis du NADH 100 μM et 10 U/mL d'apyrase, sont rajoutés et le milieu est incubé 5 min à 30°C. Les mitochondries sont placées 3 min à 25°C avant de poursuivre le test d'importation.

Import en absence d'ATP matriciel

Lors de ce test d'importation, la matrice mitochondriale est préalablement épuisée en ATP. Les mitochondries reprises dans du tampon de lavage sans BSA (2.1.1), sont traitées pendant 5 min à 37°C avec 10 U/mL d'apyrase et 12,5 $\mu\text{g/mL}$ d'oligomycine, qui bloque l'ATP synthase. On bloque ensuite l'ANT comme décrit ci-dessus. Les mitochondries sont purifiées à travers un coussin de saccharose 27% pour éliminer l'apyrase et reprises dans du tampon d'import en présence d'oligomycine 50 μM et d'atractyloside 20 mM. Après 3 min à 25°C le test d'importation se poursuit comme lors du test de base c'est à dire en présence d'ATP et d'ADP à l'extérieur des mitochondries.

2.7. Importation *in vivo*

L'étude de l'adressage de protéine *in vivo* a été réalisée par des expériences d'expression transitoire de protéines fusionnées à une protéine rapportrice, l'eGFP (enhanced Green Fluorescent Protein). Les constructions d'ADN sont introduites dans le matériel végétal par biolistique.

2.7.1. Matériel végétal

Deux sortes de matériel végétal ont été utilisés : des cellules de *Nicotiana tabacum* var. BY2 ou des feuilles de *Nicotiana benthamiana*.

Les cellules proviennent de suspension cellulaires cultivées dans du milieu BY2 à 25°C à l'obscurité sous agitation (110 rpm). Pour les bombardements, les cellules sont utilisées 4 jours après repiquage. 4-5 h avant le bombardement les cellules (10 mL de culture) sont filtrées sur papier Whatmann 3 MM. Le papier-filtre est déposé dans une boîte de Pétri sur milieu solide plasmolysant (hypertonique). Les boîtes sont conservées à 25°C à l'obscurité jusqu'au bombardement.

Dans le cas des feuilles, celles-ci sont placées sur le milieu solide plasmolysant 4-5 h avant le bombardement.

Milieu BY2 : Gamborg B5 (3,29 g/L), 250 mg/L NH₄NO₃, 92 mg/L CaHPO₄, 20 g/L saccharose, 736 mg/L CaCl₂.2H₂O, pH 5,7

Milieu solide plasmolysant : milieu BY2, 26,8 g/L mannitol, 26,8 g/L sorbitol, 0,8 g/L agar

2.7.2. Préparation des particules

Pour 5 bombardements, 10 µg d'ADN plasmidique sont additionnés de 40 µL d'une suspension de billes de tungstène (diamètre moyen : 1 µm) à 30 mg/mL dans du glycérol 50% (v/v). L'ensemble est agité énergiquement (vortex) puis on ajoute 40 µL de CaCl₂ 2,5 M et 16 µL de spermidine 0,1 M et on place le tout sous forte agitation pendant 30 min à 4°C. Les particules sont ensuite lavées 3x avec de l'éthanol absolu froid puis elles sont reprises dans 30 µL d'éthanol absolu.

Pour marquer les mitochondries, de l'ADN plasmidique codant pour la RFP (Red Fluorescent Protein) fusionnée à la préséquence d'adressage mitochondriale de la protéine COXIV (sous-unité IV de la cytochrome oxydase) (Vermel *et al.*, 2002) est ajouté sur les particules.

2.7.3. Bombardement des cellules

La boîte contenant les cellules ou la feuille est placée à 11 cm du canon dans une chambre sous vide (0,9 bar). 6 μ L de particules entourées d'ADN sont déposés dans la seringue et projetés sur la boîte par libération d'hélium à 7 bars pendant 25 ms. Les boîtes sont ensuite remises à 25°C puis, 5 h plus tard les filtres ou les feuilles sont transférés sur milieu solide isotonique (milieu BY2-agar 0,8 g/L).

2.7.4. Observation au microscope confocal

Le lendemain du bombardement, les filtres ou les feuilles sont observés avec une loupe sous éclairage UV pour déterminer les zones transformées. Les cellules sont prélevées avec une pipette ou un fragment de feuille est découpé puis l'échantillon est déposé entre lame et lamelle. L'observation est réalisée avec un microscope confocal à épifluorescence Zeiss Axiovert 100M lié au logiciel d'acquisition d'images Zeiss LSM 510.

Fluorochrome	Excitation maximale	Emission maximale
eGFP	489 nm	508 nm
RFP	558 nm	583 nm
chlorophylle	450 nm	660 nm

Afin d'exciter et d'observer spécifiquement ces composés, le microscope possède un laser Argon et deux lasers Hélium Néon (HeNe) et des filtres AOTF permettant de sélectionner les différents lasers et de régler leur intensité. Un miroir dichroïque reflète le faisceau d'excitation et laisse passer le faisceau d'émission, enfin un filtre d'arrêt contrôle les longueurs d'ondes émises par l'objet. Les caractéristiques des jeux de filtres utilisés sont présentés ci-dessous :

Pour visualiser	Laser	Excitation	Emission	Miroir dichroïque
eGFP	Argon	488 nm	505-545 nm	488 nm
RFP	HeNe	543 nm	≥ 560 nm	543 nm
Chlorophylle	Argon	488 nm	≥ 650 nm	488 nm

Les images réalisées avec ces différents jeux de filtre ont été prises au grossissement 63x avec une caméra Sony Power HAD 3CCD liée au logiciel Biocom Visiol@b™200.

2.8. Complémentation d'un mutant d'*E. coli*

2.8.1. Transformation d'*E. coli* par choc thermique

Des bactéries compétentes pour choc thermique sont préparées en lavant des bactéries en phase exponentielle de croissance avec de CaCl₂ 0,1 M froid pendant 1 h sur la glace. Elles sont conservées à -80°C dans du CaCl₂ 0,1 M, glycérol 20% (v/v).

Le vecteur à transformer (1 ng) est incubé avec 40 µL de bactéries compétentes à 42°C pendant 1 min. Ce choc thermique permet l'entrée de l'ADN dans les bactéries. Les bactéries transformées sont diluées dans 1 mL de milieu LB contenant 0,2% (p/v) de glucose et incubées à 37°C pendant 30 min. Les bactéries sont ensuite étalées sur un boîte LB-Agar contenant l'antibiotique approprié et mises en culture 15 h à 37°C.

2.8.2. Complémentation

La souche mutante d'*E. coli* est transformée avec le plasmide contenant la construction à tester et le plasmide portant le cytochrome *c₅₅₀* de *B. japonicum* (le gène rapporteur) par choc thermique. Une préculture de 20 mL est utilisée pour inoculer une culture de 500 mL de milieu MS contenant les antibiotiques appropriés dans une bouteille remplie à ras bord pour réaliser la complémentation dans des conditions anaérobiques. La bouteille est incubée à 37°C sans agitation jusqu'à une DO_{550 nm} de 0,4 (environ 12 h) puis de l'arabinose est ajouté à une concentration finale de 0,4% (p/v) pour induire l'expression du cytochrome *c₅₅₀*. La culture est incubée 15 h à 37°C sans agitation puis les bactéries sont récoltées par centrifugation.

Milieu MS : 4,5 g/L KH_2PO_4 , 10,5 g/L K_2HPO_4 , 1 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,5 g/L citrate de sodium, 0,1 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,75 mg/L sélénite de sodium, 2,4 mg/L molybdate de sodium, 1 g/L tryptone, 0,5 g/L yeast extract, 0,5 g/L NaCl, 40 mM fumarate de sodium, 5 mM nitrite de potassium, 5 mL/L glycérol.

2.8.3. Préparation d'un extrait périplasmique bactérien

L'extrait périplasmique est préparé avec de la polymyxine B qui crée des pores dans la membrane externe des bactéries. Le culot de bactérie est lavé avec du tampon de lavage puis pesé. 2 mL de tampon de lavage contenant 1 mg/mL de sulfate de polymyxine B (Sigma) sont rajoutés par gramme de culot bactérien. La suspension est incubée 1 h à 4°C sous agitation légère puis centrifugée 20 min à 12000 g. Le surnageant est considéré comme extrait périplasmique.

Tampon de lavage : 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 500 mM NaCl, 10 mM EDTA

2.8.4. Coloration d'hème

L'hème fixé de manière covalente sur une protéine possède une activité peroxydase, le principe de la coloration d'hème est un test d'activité peroxydase. Un gel de polyacrylamide dans lequel les fractions à tester ont été séparées est incubé 10 min dans une solution de TCA 10% (v/v) immédiatement après la migration. Après deux lavages avec de l'eau distillée, le gel est mis en présence de la solution d'O-dianisidine et est incubé sur une bascule à l'obscurité. Un précipité vert apparaît là où il y a un hème fixé de manière covalente sur une protéine après un certain temps (2 min à 1 heure). Lorsque la coloration est assez intense, la réaction est stoppée par des lavages avec de l'eau distillée.

Solution d'O-dianisidine : 50 mM tri-sodium citrate pH 4,4, 0,7% (v/v) H_2O_2 , 1 mg/mL O-dianisidine

2.8.5. Isolement de sphéroplastes

Les sphéroplastes sont des bactéries dépourvues de membrane externe, ils sont isolés à partir d'une culture bactérienne de 5 mL âgée de 15 h. Cette culture est lavée 2x dans du

tampon de lavage. Après centrifugation à 5000 g, le culot de bactéries est repris dans 1,25 mL de Tris-HCl 0,1 M pH 8,0 puis 1,25 mL de tampon osmotique est ajouté. Un traitement au lysozyme est réalisé : ajout de 20 µg de lysozyme, incubation 5 min à 4°C, addition covalente 200 µM. La suspension est incubée 1 h à température ambiante. Après centrifugation 10 min à 10000 g, le culot de sphéroplastés est repris dans un peu de Tris-HCl 0,1 M pH 8,0.

Tampon de lavage : 0,1 M Tris-HCl pH 8,0, 30 mM NaCl

Tampon osmotique : 0,1 M Tris-HCl pH 8,0, 40% (p/v) saccharose

2.8.6. Préparation des protéines membranaires bactériennes

Une culture bactérienne de 500 mL âgée de 15 h est centrifugée 10 min à 5000 g à 4°C. Le culot est lavé avec du Tris-HCl 50 mM pH 7,5 puis pesé. Pour 1 g de culot, ajouter 3 mL de tampon d'extraction additionné de 0,1 mg/mL de RNase A et de 0,1 mg/mL de manière covalente I puis casser les cellules à travers une cellule de la presse de French (American Instruments) deux fois à 1200 psi. La suspension est centrifugée 30 min à 15000 g à 4°C puis le surnageant est centrifugé 1 h à 100000 g à 4°C. Le culot est repris dans du tampon d'extraction.

Tampon d'extraction : 0,1 M Tris-HCl pH 8,0, 1 mM PMSF

2.9. Tests d'activité redox *in vitro*

2.9.1. Réduction d'une protéine marquée au DTNB

L'acide dithio-nitrobenzoïque (DTNB) est un réactif chimique qui possède un pont disulfure. Ce pont peut être attaqué par une fonction thiol libre qui fixera de manière covalente une molécule d'acide thionitrobenzoïque (incolore) et libérera la deuxième (colorée en jaune $\lambda_{\max} = 412 \text{ nm}$).

Une protéine (30 µM) est réduite avec 10 mM de DTT pendant 10 min à température ambiante dans un volume réactionnel de 500 µL. Le DTT est lavé par ultrafiltration (cf 2.4.2) avec 2x 30 volumes de TE. Le marquage des thiols se fait en traitant la protéine réduite avec 1

mM de DTNB pendant 30 min à température ambiante. Le DTNB non fixé est lavé par ultrafiltration avec 2x 30 volumes de TE.

Différents systèmes de réduction peuvent ensuite être testés en suivant la cinétique de libération d'acide thionitrobenzoïque à 412 nm. Le témoin de réduction totale est réalisé en traitant la protéine marquée avec 10 mM de DTT.

TE : 30 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA

2.9.2. Réduction d'insuline

La réduction de l'insuline par le DTT est une réaction très lente. L'ajout d'une thiorédoxine permet d'accélérer fortement cette réaction. Dans une cuvette à spectrophotomètre, on fait réagir 0,33 mM de DTT sur 0,13 mM d'insuline dans du tampon de réduction. La réaction est suivie à 650 nm car lorsque l'insuline est réduite, un précipité blanchâtre de chaîne β apparaît. Il faut laisser l'insuline se solubiliser (réaction facilitée par l'EDTA présent dans le milieu réactionnel), la DO_{650} décroît. Quand la DO_{650} est stabilisée, on rajoute 5 μ mol de thiorédoxine à tester et on réalise une cinétique jusqu'à l'obtention d'un plateau (environ 1 h).

Tampon de réduction : 0,1 M phosphate de potassium pH 7,0, 2 mM EDTA

2.10. Techniques microscopiques

2.10.1. Observation de graines décolorées

Des graines sont isolées à partir de siliques issues de plantes âgées de 2 mois (1 mois en culture *in vitro* et 1 mois en culture en terre). Ces graines sont fixées au glutaraldéhyde 2% puis décolorées dans la solution de Hoyer (Meinke, 1994). Après ce traitement, les tissus deviennent transparents et les embryons peuvent être observés par transparence avec un microscope optique à épifluorescence Nikon E800, les observations ont été réalisées en contraste interférentiel différentiel (DIC). Les images ont été prises avec une caméra couleur triCCD Nikon DXM1200 et le logiciel d'acquisition Kikon-ACT. Les observations ont été réalisées par M. Erhardt du service commun de microscopie de l'IBMP.

Solution de Hoyer : 2,5 g gomme arabique, 100 g hydrate de chloral, 5 mL glycérol, 30 mL eau distillée.

2.10.2. Observation des embryons au microscope électronique

Des siliques de plantes âgées de 2 mois sont disséquées sous une loupe binoculaire puis, après avoir isolé les graines, celles-ci sont percées avec une pince fine et par légère pression sur l'extrémité non percée de la graine, l'embryon est expulsé de la graine. Une goutte d'eau est déposée sur l'embryon et celui-ci est aspiré avec une pipette et déposé dans une solution de glutaraldéhyde 2% pour le fixer pendant 2 h. Puis de l'acide picrique saturé est ajouté jusqu'à une dilution au 1/10^{ème}. Les embryons sont incubés dans cette solution 18 h à température ambiante puis 15 h à 4°C. Après trois lavages de 15 min avec de l'eau distillée, les embryons sont incubés avec une solution de tétr oxyde d'osmium 0,5% pendant 2 h. Ce traitement permet de colorer les lipides. Le tétr oxyde d'osmium est éliminé lors de quatre lavages avec de l'eau distillée. Les embryons sont ensuite fixés à l'acétate d'uranyle 2% pendant 15 h à 4°C. Ce traitement permet de colorer les protéines. Après quatre lavages à l'eau bidistillée, les échantillons sont déshydratés avec différents bains d'éthanol 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 100% et 100%.

Les embryons sont ensuite inclus dans une résine Epon 812 (Electron Microscopy Science). Cette résine n'est soluble que dans l'oxyde de propylène. L'éthanol est éliminé des échantillons par lavage avec de l'oxyde de propylène pendant 20 min, puis avec une solution oxyde de propylène/Epon (1/1) et enfin avec l'Epon pendant 15 h. Les échantillons sont placés dans un moule en forme de barrette puis l'Epon est polymérisé par incubation à 60°C pendant 60 h. Après polymérisation, les barrettes contenant les échantillons sont coupées avec un ultramicrotome (Reichert-Jung Ultracut E) à une épaisseur de 90 µm.

Les observations ont été réalisées avec un microscope électronique à transmission Hitachi H600 avec une tension de 75000 V. Les images sont acquises grâce à une caméra CCD Advantage HR (Hamamatsu) et au logiciel AMT (Advanced Microscopy Techniques).

La préparation des échantillons et les observations ont été réalisées par M. Erhardt.

A stylized, bold, black letter 'R' with a grey shadow effect. The top of the 'R' has a gear-like or sunburst pattern.

résultats –
Discussion

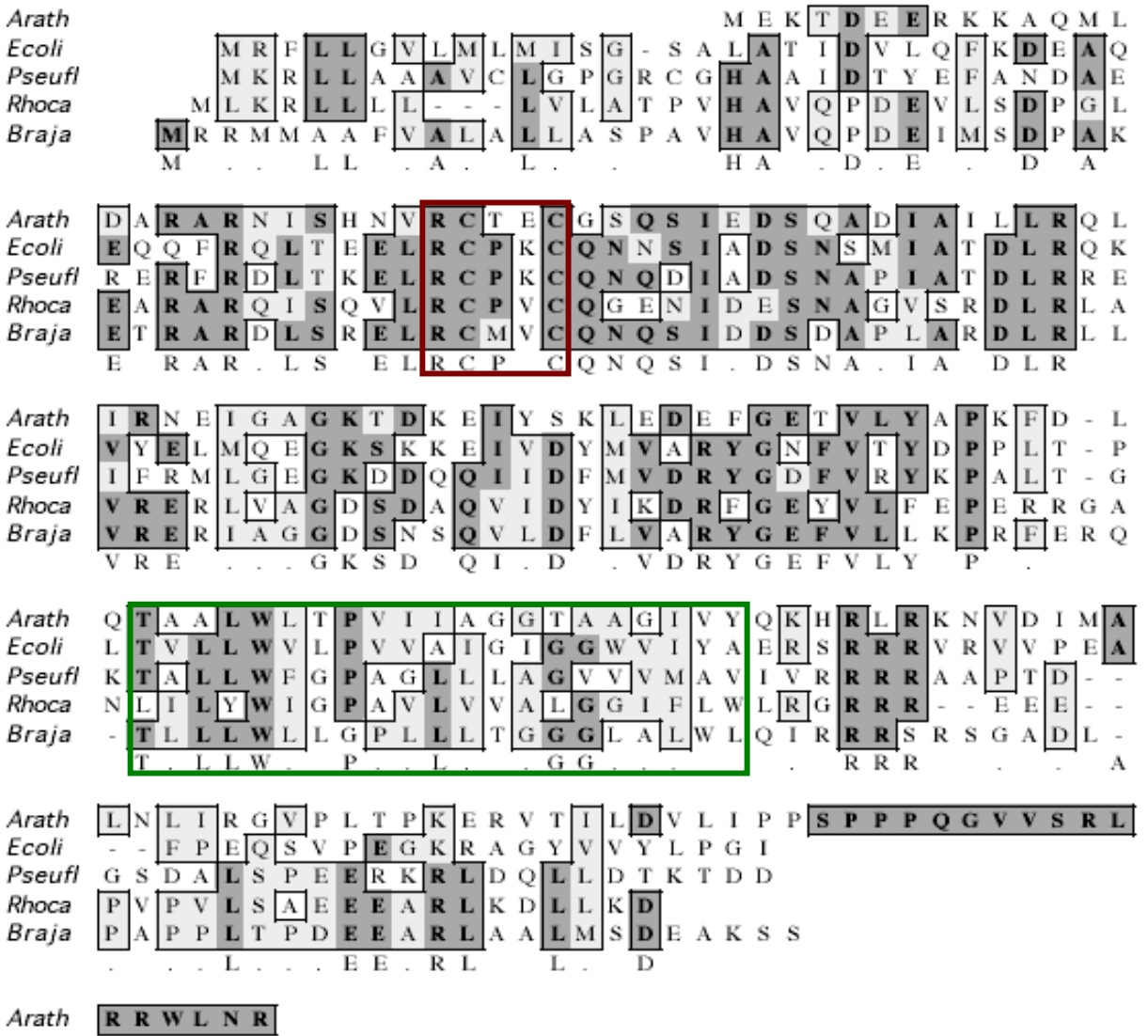


Figure r1.1 : Comparaison des séquences protéiques de différentes protéines CcmH bactériennes avec AtCCMH (Arath). Les acides aminés identiques dans plus de deux séquences sont indiqués en gris sombre, et les acides aminés similaires dans plus de deux séquences sont indiqués en gris clair. Le motif RCXXC est entouré d'un cadre rouge, le domaine hydrophobe est entouré d'un cadre vert.

Ecoli : *Escherichia coli* CcmH partie N-terminale (M1-I155)

Pseufl : *Pseudomonas fluorescens* CcmH

Rhoca : *Rhodobacter capsulatus* Ccl2

Braja : *Bradyrhizobium japonicum* Cycl

Résultats – Discussion

1. Identification d'AtCCMH

1.1. Identification *in silico* d'AtCCMH

Escherichia coli, l'un des organismes modèles pour le système I de maturation des cytochromes de type *c*, possède une protéine CcmH de 39 kDa. Cette protéine présente deux domaines qui ont des fonctions distinctes : le domaine N-terminal joue un rôle dans la réduction des apocytochromes et porte le motif RCXXC, le domaine C-terminal agit comme un chaperon d'apocytochrome. Chez d'autres bactéries telles que *B. japonicum*, un autre organisme modèle pour le système I, les deux fonctions d'EcCcmH sont portées par deux protéines différentes. En effet, la fonction de réduction est assurée par la protéine CycL alors que le chaperon d'apocytochrome est une protéine appelée CycH. Dans les deux cas de figure, la fonction réductrice apportée par CycL ou le domaine N-terminal d'EcCcmH est indispensable à la formation d'holocytochromes *c* alors que la fonction de chaperon d'apocytochromes n'est pas essentielle à la formation d'holocytochrome *c*.

Nous avons d'abord tenté d'identifier un homologue d'EcCcmH (CcmH bipartite) chez *A. thaliana* par comparaison de séquences (BLAST). Malheureusement, aucun candidat n'a pu être retenu. Des BLAST ont alors été réalisés en testant la séquence protéine de BjCycL contre différentes banques de données (NCBI, TAIR). Par cette voie, nous avons pu identifier un gène nucléaire d'*A. thaliana* qui code pour une protéine de 159 acides aminés présentant 25% d'identité avec BjCycL (Figure r1.1). Ce gène est situé sur le chromosome 1 (At1g15220). Aucune séquence d'ADNc correspondant à ce gène n'était disponible. Mais deux introns interrompant l'ORF étaient prédits. La séquence complète du génome d'*A. thaliana* (Arabidopsis Genome Initiative, 2000) a montré qu'il s'agissait d'un gène unique. Ce gène a été nommé *AtCCMH* pour *A. thaliana CCMH*.

La protéine codée par *AtCCMH* possède 25% d'identité avec BjCycL, 20% avec la protéine Ccl2 de *R. capsulatus*, 20% avec la protéine CcmH de *Pseudomonas fluorescens* mais aussi 22% avec le domaine N-terminal d'EcCCMH (M1-I155). *AtCCMH* possède des caractéristiques communes avec les protéines CcmH bactériennes : un motif RCXXC conservé dans le domaine N-terminal ainsi qu'un domaine hydrophobe conservé. L'alignement des séquences peptidiques d'*AtCCMH* avec ses homologues bactériens fait apparaître des variations entre les protéines bactériennes et la protéine végétale *AtCCMH*. Les

ADN, structure prédite du gène

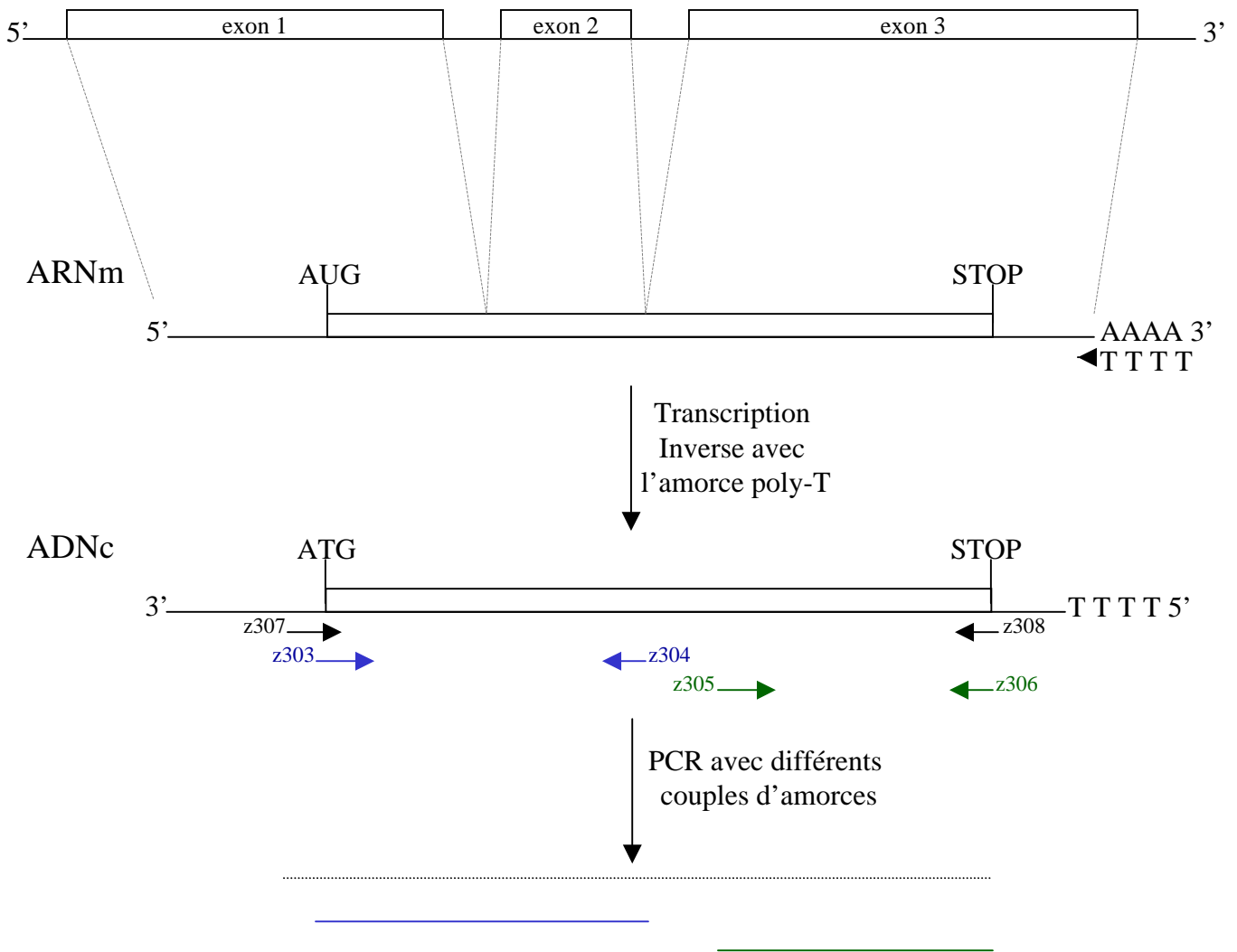


Figure r1.2 : Schéma de l'ARNm et du cDNA correspondant à *AtCCMH*, ainsi que des fragments résultants des PCR avec les amorces indiquées. Le fragment en pointillé n'a pas pu être amplifié, les fragments bleu et vert ont été obtenus.

protéines procaryotes possèdent une extension N-terminale qui est décrite comme un peptide d'adressage au périplasma. *AtCCMH* possède, elle, une extension C-terminale de 17 acides aminés par rapport à ses homologues bactériens.

1.2. Clonage d'un ADNc et structure d'*AtCCMH*

Aucun ADNc correspondant à *AtCCMH* n'était disponible dans les bases de données. Le clonage d'un ADNc a été réalisé pour déterminer si *AtCCMH* était bien exprimé.

1.2.1. 1^{er} Clonage par RT-PCR

Un ADNc correspondant à la séquence codante d'*AtCCMH* a été cloné par RT-PCR. Des ARN totaux de parties aériennes de plantes d'*A. thaliana* âgées de quatre semaines ont été préparés et des ADNc ont été synthétisés par transcription inverse en utilisant des amorces poly-T. Un ADNc spécifique à *AtCCMH* serait amplifié par PCR en utilisant les amorces z307 et z308 situées aux extrémités de la séquence codante et s'hybridant, respectivement au niveau du codon ATG ou du codon Stop. Chaque amorce contient un site de reconnaissance d'une enzyme de restriction pour cloner le fragment amplifié par PCR. Aucun fragment d'une taille correspondant à *AtCCMH* n'a pu être amplifié avec ce couple d'amorces. Par contre, en utilisant la même réaction de synthèse d'ADNc, des fragments spécifiques à *AtCCMH* de plus petite taille (Figure r1.2) ont pu être amplifiés par PCR. Ceci montre bien l'expression du gène *AtCCMH*. L'ADNc synthétisé lors de la réaction de transcription inverse doit être incomplet, ceci expliquerait l'impossibilité d'amplifier la séquence codante complète.

1.2.2. 5'-RACE

Nous avons cherché à déterminer l'extrémité 5' du transcrite correspondant à *AtCCMH* par 5'-RACE. Cette expérience a pour but de définir le premier ATG d'*AtCCMH*. En effet, le codon initiateur annoté dans les banques de données permet la synthèse d'une protéine plus courte que ses homologues bactériennes. *AtCCMH* est supposée être une protéine mitochondriale. Or, les protéines adressées aux organelles possèdent généralement une extension N-terminale qui leur sert de séquence d'adressage. La réalisation d'une 5'-RACE permettra de préciser quel est le codon initiateur de la traduction d'*AtCCMH* et ainsi de vérifier si l'annotation des banques de données n'a pas omis une extension N-terminale.

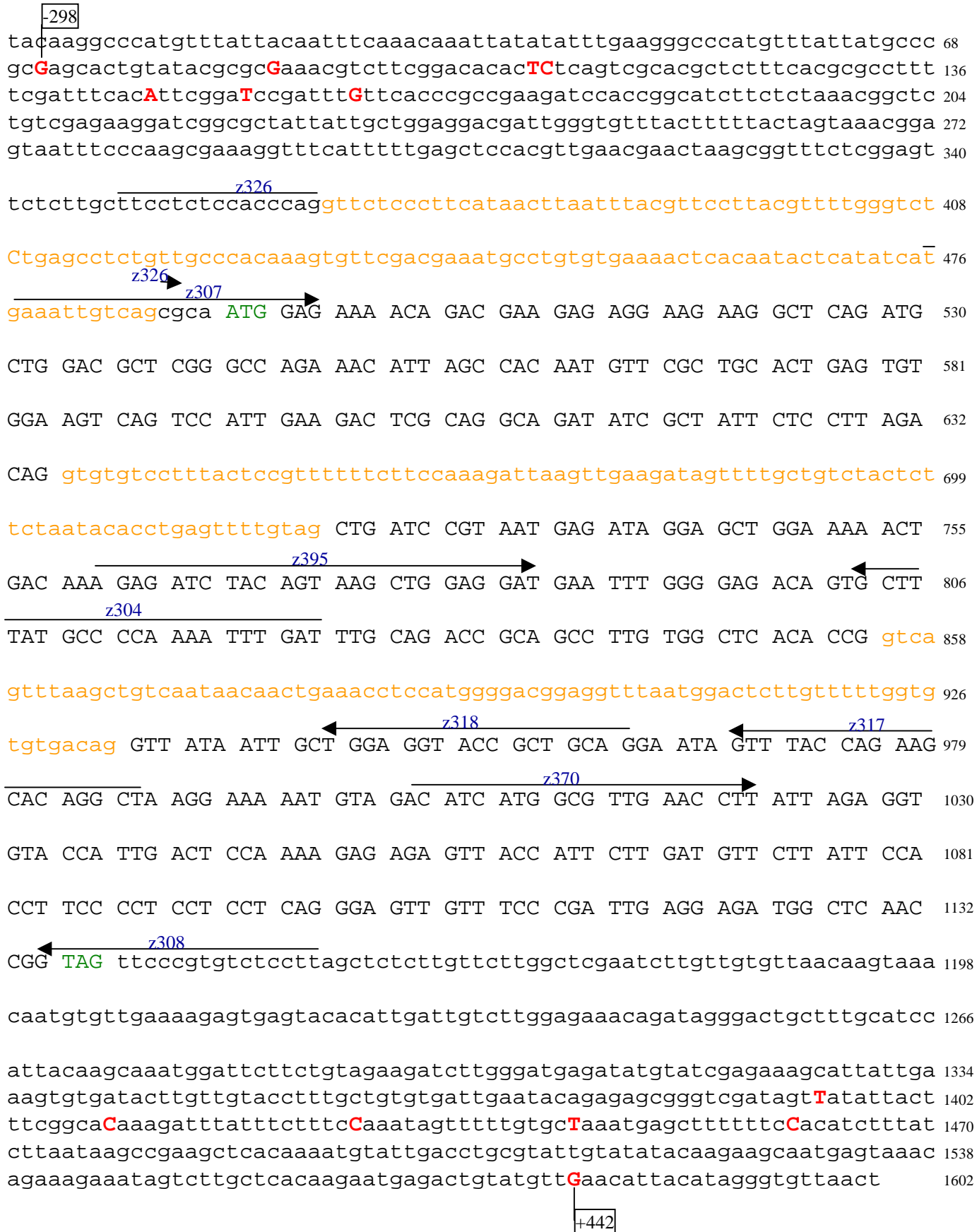


Figure r1.3 : Partie de la séquence génomique du chromosome 1 d'*A. thaliana* contenant *AtCCMH*. Les codons ATG et TGA sont indiqués en vert, les introns en orange et les extrémités 5' et 3' obtenues par 5' et 3'-RACE en rouge et en majuscules. Les amorces utilisées sont indiquées par des flèches au dessus de la séquence. La numérotation commence aléatoirement au premier nucléotide présenté. Les extrémité 5' et 3' les plus éloignées détectées sont indiquées (-298 par rapport à l'ATG pour l'extrémité 5' et +442 par rapport au TGA pour l'extrémité 3').

La 5' RACE a été réalisée avec le kit 5'-RACE System (GibcoBRL). Un ADNc est synthétisé en hybridant une amorce complémentaire spécifique d'*AtCCMH* (z317, localisée entre les nucléotides +388 et +417 par rapport à l'ATG) aux ARN totaux de parties aériennes d'*A. thaliana*. Une séquence poly-C est ajoutée en 3' de cet ADNc par la «terminal désoxynucleotide transférase». Puis une PCR est réalisée en utilisant une amorce directe poly-G contenant une séquence adaptatrice (avec des sites de reconnaissance pour des endonucléases de restriction) et une deuxième amorce complémentaire spécifique à *AtCCMH* (z318, localisée entre les nucléotides +288 et +305 par rapport à l'ATG). Lors de cette première PCR, quatre produits de 300, 430, 600 et 800 pb environ ont été obtenus. Ces produits ont été purifiés individuellement et ont servi de matrice pour une deuxième PCR. Cette PCR a été réalisée en utilisant une amorce directe s'hybridant sur l'adaptateur et une troisième amorce complémentaire spécifique à *AtCCMH* (z304, localisée entre les nucléotides +226 et +246 par rapport à l'ATG). Les produits de 300, 430 et 800 pb n'ont pas permis d'amplification secondaire lors de cette PCR. Par contre, le produit de 600 pb a servi de matrice pour la synthèse d'un fragment d'environ 500 bp. Ce fragment a été cloné dans le vecteur pSK-T. Sept clones ont été obtenus et séquencés. Les extrémités 5' des ADNc ainsi clonés sont situées à 196, 207, 215, 222, 260, 261, 281 nucléotides en amont du codon ATG (Figure r1.3). De plus, la comparaison des séquences de l'ADN et de ces ADNc montre la présence d'un intron supplémentaire dans la région 5' non codante du gène *AtCCMH*. Le site d'épissage de cet intron de 124 nucléotides est localisé 4 nucléotides en amont de l'ATG prédit. Cet ATG est le premier codon initiateur de la traduction possible car un codon TGA est présent en phase devant cet ATG sur le transcrit. La traduction initiée par cet ATG donnera la protéine *AtCCMH* qui est prédite dans les banques de données. Aucun autre ATG n'est présent dans cette région 5' non traduite.

1.2.3. 2^{ème} clonage par RT-PCR

La présence de l'intron supplémentaire décrit ci-dessus explique l'impossibilité d'amplifier par RT-PCR un fragment correspondant à la séquence codante d'*AtCCMH*. En effet seuls dix nucléotides (sur un total de 22) en 3' de l'amorce directe utilisée peuvent s'hybrider à l'ADNc. Une nouvelle amorce (z326) a été définie pour le clonage de l'ADNc, la séquence de cette amorce tenant compte de l'épissage de l'intron. La RT-PCR, réalisée avec cette amorce, a permis l'amplification d'un fragment de 527 nucléotides correspondant à

AtCCMH. Ce fragment a été cloné dans le vecteur pSK et séquencé. L'épissage des deux autres introns prédits a été vérifié. La construction ainsi obtenue a été appelée pEM7.

1.2.4. 3' RACE

L'extrémité 3' de l'ARNm correspondant à *AtCCMH* a été déterminée par des expériences de 3'-RACE. Pour cela, des ADNc ont été synthétisés par transcription inverse en utilisant une amorce non spécifique poly-T (p123) et des ARN totaux de parties aériennes d'*A. thaliana*. Cette amorce possède une séquence adaptatrice en 5'. Une première PCR a été réalisée avec une amorce directe spécifique d'*AtCCMH* (z395, localisée entre les nucléotides +183 et +207 par rapport à l'ATG) et une amorce complémentaire à la séquence adaptatrice (p118). Aucun produit d'amplification n'est détecté dans cette réaction. Le milieu réactionnel de cette première PCR est utilisé comme matrice dans une deuxième réaction de PCR, qui est effectuée en utilisant l'amorce s'hybridant sur la séquence adaptatrice (p118) et une amorce directe spécifique à *AtCCMH* (z370, localisée entre les nucléotides +344 et +363 par rapport à l'ATG). Dans ces conditions de PCR, un seul produit d'environ 500 pb est obtenu. Ce produit est cloné directement dans un vecteur-T. Plusieurs clones ont été obtenus et ont été séquencés. Pour les quatre clones séquencés, quatre sites de polyadénylation (extrémité 3') de l'ADNc correspondant à *AtCCMH* ont été obtenus, respectivement à 257, 290, 306 et 322 nucléotides du codon Stop (Figure r1.3).

1.2.5. Bilan des travaux concernant la structure d'*AtCCMH*

Contrairement à ce qui était annoté dans les bases de données, *AtCCMH* ne possède pas deux mais trois introns. En effet, dans tous les clones analysés lors des expériences de 5'-RACE, un intron supplémentaire est épissé. Cet intron est localisé dans la partie 5' non codante du gène. Nous avons essayé de déterminer les extrémités exactes de l'ADNc correspondant à *AtCCMH* par 5'- et 3'-RACE. En juin 2004, deux ADNc complets correspondant à *AtCCMH* ont été décrits dans les bases de données. Le premier (GenBank AY050392) a une extrémité 5' située 298 nucléotides avant l'ATG et une extrémité 3' située 272 nucléotides après le codon Stop. Le deuxième (GenBank AY085498, un ADNc complet Ceres) possède une extrémité 5' à 281 nucléotides de l'ATG et une extrémité 3' à 442 nucléotides du codon Stop. Par contre, l'intron situé dans la partie 5' non codante du gène n'est pas épissé (2% des ADNc produits par Ceres contiennent des introns non épissés). Nous

avons donc obtenu 8 extrémités 5' différentes situées entre -298 et -197 (par rapport à l'ATG) et 6 extrémités 3' distinctes situées entre +257 et +442 (par rapport au Stop).

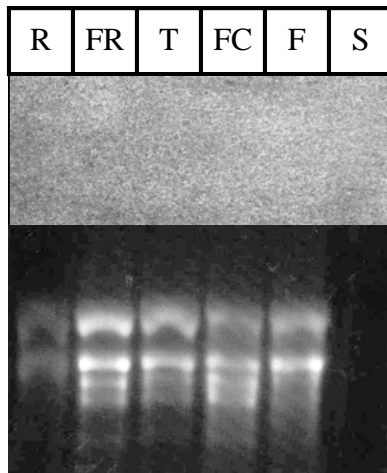
La variabilité des extrémités 5' peut s'expliquer par le fait que les clones d'ADNc obtenus peuvent résulter d'une transcription inverse incomplète ou bien que les ARN utilisés étaient légèrement dégradés. De plus, parmi les extrémités 5' identifiées, certaines sont précédées sur l'ADN génomique par des séquences riches en C. Or la technique de 5'-RACE repose sur l'ajout de C en 5' de l'ADNc suivi de PCRs avec une amorce poly-G. Cette amorce poly-G a donc bien pu s'hybrider à ces séquences génomiques riches en C, les clones issus de ces hybridations étant alors des artéfacts. Ce pourrait être le cas pour les extrémités situées à -81 et à -197 (par rapport à l'ATG).

La transcription d'*AtCCMH* est réalisée par l'ARN polymérase II. Cette polymérase se fixe sur l'ADN au niveau d'une boîte TATA située entre 20 et 30 nucléotides en amont du site d'initiation de la transcription. Plusieurs boîtes TATA hypothétiques sont présentes dans la région en amont des extrémités 5' identifiées. La première, entre -333 et -327 (par rapport à l'ATG), serait utilisée pour un démarrage de la transcription en -298. Une autre, entre -309 et -303 (par rapport à l'ATG), correspondrait à un site d'initiation à -281. La dernière, entre -292 et -286, permettrait l'initiation de la transcription en -261 ou -260. Aucune séquence de type boîte TATA n'est présente en amont des sites identifiés entre -222 et -197.

L'ARN polymérase II ne s'arrête pas de manière spécifique et synthétise un pré-ARNm qui possède une région 3' non codante devant être maturée. Ainsi, une endonucléase reconnaît une séquence consensus AAUAAA située 10 à 30 nucléotides en amont de son site de clivage. Après clivage, une queue poly-A est rajoutée à cette extrémité 3' par la poly-A polymérase. L'extrémité 3' d'un ADNc doit donc se trouver à quelques dizaines de nucléotides d'une séquence de type AATAAA. Dans le cas du clone possédant un site de polyadénylation à +322 (par rapport au Stop), une séquence AAATAG pouvant éventuellement être reconnue par l'endonucléase est présente 27 nucléotides devant cette extrémité. Dans les autres cas, une séquence génomique riche en A est présente juste derrière les extrémités identifiées. Ces extrémités peuvent donc résulter d'une mauvaise hybridation de l'amorce poly-T au niveau de ces séquences et non à la queue poly-A.

Les données obtenues ne sont pas suffisantes pour affirmer quelles sont les extrémités du transcrit correspondant à *AtCCMH*. Il faudrait refaire ces expériences pour confirmer certains sites. Les deux ADNc complets annotés dans les banques de données ont des extrémités différentes (-298 et -281 par rapport à l'ATG pour l'extrémité 5' et +272 et +442

A



Autoradiographie après incubation avec une sonde correspondant à *AtCCMH*

Coloration des ARN au bromure d'éthidium

B

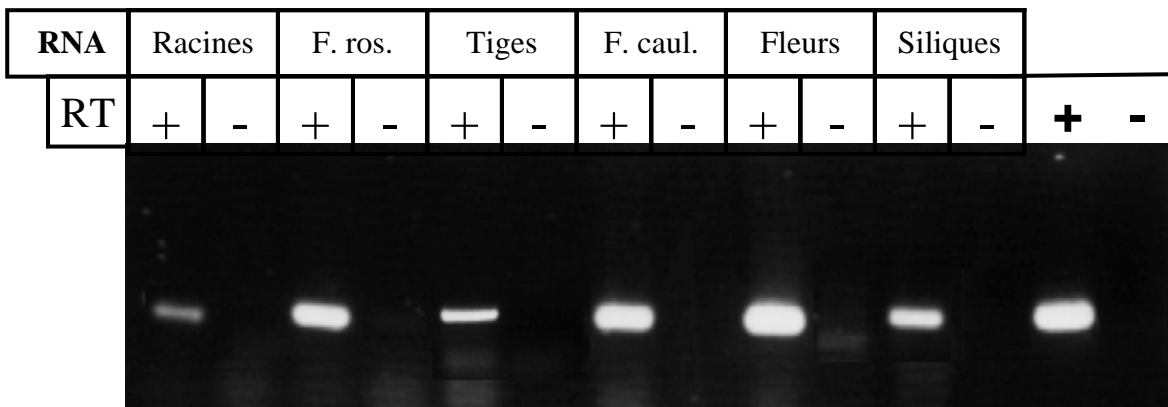


Figure r1.4 : Etude de l'expression d'*AtCCMH*.

A : Northern-blot. Aucun ARN n'est détecté avec la sonde spécifique d'*AtCCMH* après une semaine d'exposition.

B : RT-PCR sur des ARN issus de différents organes d'*A. thaliana*.

La transcription inverse a été réalisée avec une amorce complémentaire spécifique à la région 3' de la phase codante d'*AtCCMH*. Les amorces utilisées lors de la PCR permettent l'amplification de la phase codante d'*AtCCMH*.

R : racines

FR : feuilles de rosette

T : tiges

FC : feuilles caulinaires

F : fleurs

S : siliques

RT : transcriptase inverse

⊕ : témoin positif de PCR avec un clone de cDNA comme matrice

- : témoin négatif de PCR avec de l'eau à la place de la matrice.

par rapport au codon Stop pour l'extrémité 3'). Avec les données additionnelles obtenues lors de ces travaux, il semble que l'initiation de la transcription ait lieu à 261 nucléotides en amont de l'ATG (sous réserve que l'ARNm ne subisse pas de maturation en 5') et que le site de polyadénylation soit situé 322 nucléotides du codon Stop. Ainsi, l'ARNm correspondant à *AtCCMH* aurait une taille de 1062 nucléotides avec la phase ouverte de lecture située entre les nucléotides +261 et +740.

1.3. Expression d'*AtCCMH* dans différents organes

AtCCMH est un gène exprimé puisqu'un ADNc lui correspondant a pu être isolé par RT-PCR. L'expression spatiale d'*AtCCMH* dans la plante a été étudiée par deux approches, par Northern blot tout d'abord, puis par RT-PCR.

Des ARN totaux ont été isolés à partir de différents organes de plantes d'*A. thaliana* cultivées en terre. Les différents organes utilisés sont les racines, les feuilles de rosette, les tiges, les feuilles caulinaires, les fleurs et les siliques. Les ARN ont été séparés sur gel d'agarose dénaturant, transférés puis fixés sur une membrane de nylon. Une sonde a été préparée par PCR en amplifiant la partie codante de l'ADNc puis en réalisant un marquage au [α - 32 P] ATP avec le fragment de Klenow et des amorces hexamériques aléatoires. La sonde a été hybridée une nuit sur la membrane de nylon portant les ARN. Après les lavages, aucune radioactivité n'est détectée sur la membrane après une semaine d'exposition à un film sensible (Figure r1.4A). Ceci indique que les ARNm correspondants à *AtCCMH* sont très peu abondants et donc que ce gène est faiblement exprimé. La technique de Northern blot aurait pu permettre de vérifier la taille du transcrite correspondant à *AtCCMH*.

Nous avons donc utilisé la technique de RT-PCR pour mettre en évidence la présence des ARNm correspondant à *AtCCMH* dans les différents organes d'*A. thaliana*. Les ARN utilisés pour le Northern blot ont été utilisés lors de la réaction de transcription inverse. Un fragment spécifique d'*AtCCMH* a été amplifié avec les ARN provenant de tous les organes testés (Figure r1.4B). Ces RT-PCR n'étant pas quantitatives, les variations d'intensité du produit de PCR dans les différents organes ne reflètent pas la quantité d'ARNm présente dans chaque organe.

AtCCMH est donc un gène exprimé faiblement mais de façon ubiquitaire dans la plante.

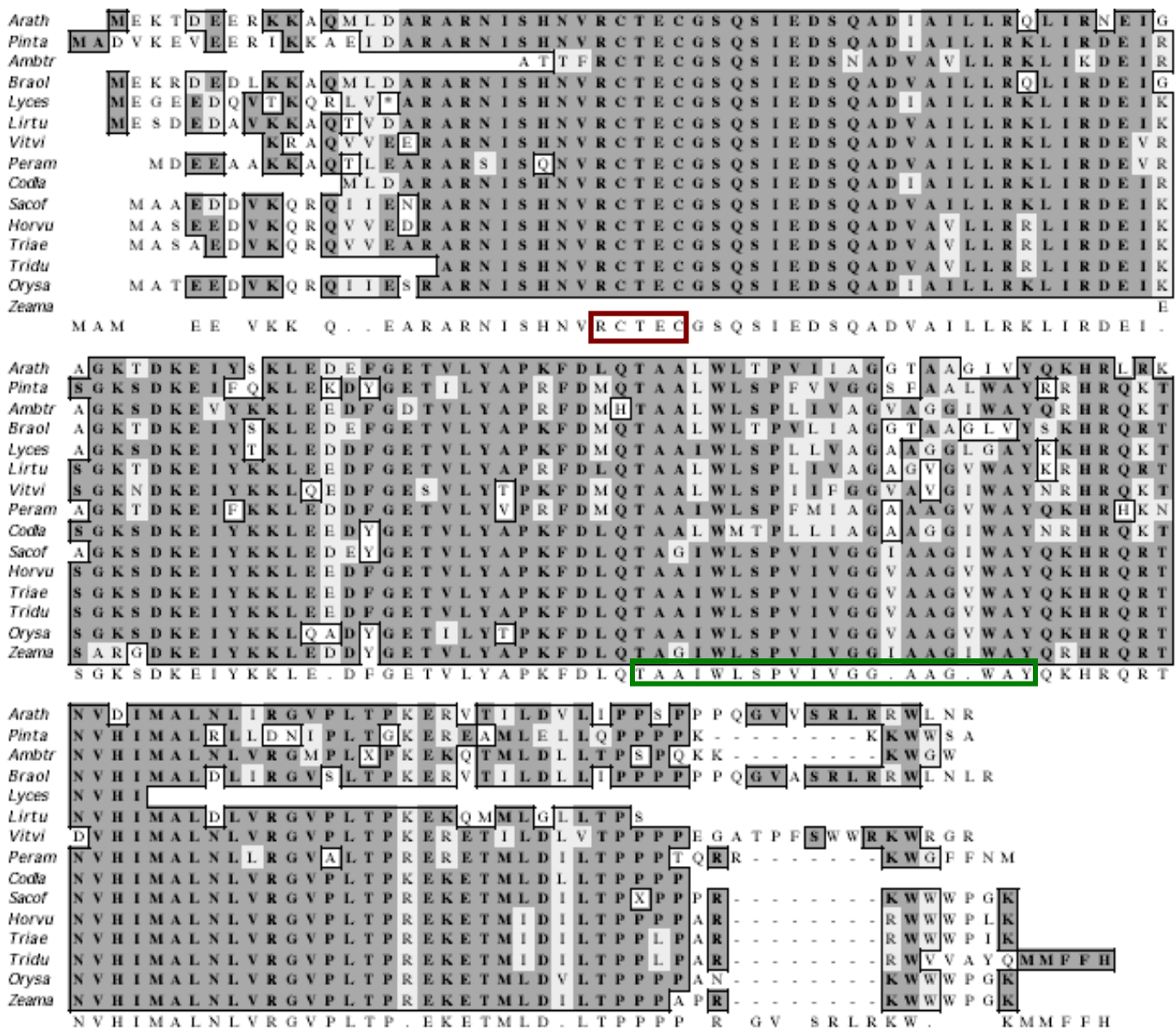


Figure r1.5 : Alignement des séquences de protéines CCMH de plantes, ces séquences étant déduites des séquences génomiques ou d'EST. Le motif RCXXC est indiqué en rouge et le domaine hydrophobe en vert.

Arath : *Arabidopsis thaliana*

Pinta : *Pinus taeda* (EST)

Ambtr : *Amborella trichopoda* (EST, séquence protéique incomplète)

Braol : *Brassica oleracea* (génomique)

Lyces : *Lycopersicon esculentum* (EST, séquence protéique incomplète)

Lirtu : *Liriodendron tulipifera* (EST)

Vitvi : *Vitis vinifera* (EST, séquence protéique incomplète)

Peram : *Persea americana* (EST)

Codla : *Codonopsis lanceolata* (EST, séquence protéique incomplète)

Sacof : *Saccharum officinarum* (EST)

Horvu : *Hordeum vulgare* (EST)

Triae : *Triticum aestivum* (EST)

Tridu : *Triticum durum* (EST, séquence protéique incomplète)

Orysa : *Oryza sativa* (génomique)

Zeama : *Zea mais* (EST, séquence protéique incomplète)

1.4. Homologues d'AtCCMH chez les plantes

Le génome complet d'*A. thaliana* étant entièrement séquencé, la séquence génomique d'*AtCCMH* est connue. Un certain nombre d'EST (GenBank AV823326, AV784278, AY097355) correspondant à *AtCCMH* sont présents dans les banques de données. Deux ADNc complets (GenBank AY085498, AY050392) sont aussi décrits.

En juin 2004, de nombreux homologues d'*AtCCMH* dans différentes plantes ont été identifiés par recherche bioinformatique (TBLASTN avec la séquence protéique d'*AtCCMH* contre une banque de données sélectionnant les séquences de plantes : TAIR). Des séquences génomiques ont été ainsi identifiées chez le colza (*Brassica oleracea*, BH478963, BH476662, BH736152), le riz (*Oriza sativa*, AQ795539, AQ691123, AQ576234) et le sorgho (*Sorghum bicolor*, CL169752, CL169753).

De nombreuses EST, plus ou moins complètes, ont été trouvées chez des plantes monocotylédones telles que l'orge (*Hordeum vulgare*, BQ464138, BQ462386), le maïs (*Zea mais*, AW566308, AY110507, CF630369), le blé (*Triticum aestivum*, BI751284, BQ281542 et *Triticum durum*, BF293862), la canne à sucre (*Saccharum officinarum*, CA079272, CA118789, CA123412, CA176514, CA262082) mais aussi chez des plantes dicotylédones telles que la tomate (*Lycopersicon esculentum*, AW623116), la pomme de terre (*Solanum tuberosum*, BQ516353), la vigne (*Vitis vinifera*, CF609607), l'avocatier (*Persea americana*, CK751708, CK754323), le peuplier (*Populus tremuloides*, CK116926), le tulipier de Virginie (*Liriodendron tulipifera*, CK755921) et le codonopsis (*Codonopsis lanceolata*, CF924729). Un EST a aussi été trouvé dans l'angiosperme la plus primitive (*Amborella trichopoda*, CK761157). Des EST codant pour un homologue à *AtCCMH* chez une gymnosperme, le pin (*Pinus taeda*, BQ701917, CF664059, CF664129) ont aussi été identifiées. Des homologues à la protéine CcmH ont donc été retrouvés dans de nombreuses plantes à fleurs. Par contre, aucune protéine de fougères, de mousses ou d'algues n'a été identifié pour l'instant comme orthologue d'*AtCCMH*.

Il est à noter que lorsque le BLAST est effectué contre une banque de données plus générale, seules des séquences de plantes supérieures ou de bactéries Gram⁻ sont sélectionnées. Conformément aux prédictions, aucune séquence similaire à *AtCCMH* n'a été détectée dans d'autres organismes (tels que la levure, *Caenorabditis elegans*, l'homme ou la souris).

La comparaison des séquences des protéines CCMH de plantes les plus complètes met en évidence la conservation des caractéristiques des CcmH procaryotiques, c'est-à-dire, la

présence du motif RCXXC dans le domaine N-terminal ainsi que la présence d'une région hydrophobe (Figure r1.5). Les séquences protéiques des différentes CCMH végétales sont très fortement conservées, 60% d'identité en moyenne.

1.5. Caractéristiques d'AtCCMH

AtCCMH code pour une protéine de 159 acides aminés. Selon les calculs, son poids moléculaire serait de 17,9 kDa et son pI de 9,34.

1.5.1. Adressage aux organelles

La fonction prédite d'AtCCMH est d'intervenir dans la maturation des cytochromes *c*. Chez les plantes, on ne trouve des cytochromes *c* que dans les mitochondries ou les chloroplastes. AtCCMH devrait donc être localisée dans ces organelles. Nous avons testé la séquence protéique d'AtCCMH avec différents logiciels de prédiction d'adressage. Aucun de ces logiciels n'a prédit l'adressage d'AtCCMH de manière significative dans les mitochondries ou les chloroplastes (voir Tableau r1). Ce résultat n'est pas surprenant en soi car AtCCMH ne possède pas d'extension N-terminale par rapport aux bactéries et les logiciels de prédiction d'adressage sont développés pour reconnaître de telles séquences d'adressage.

Logiciel	Mitochondries	Chloroplastes	Autres
psort	0,100	0,100	0,800
TargetP	0,296	0,059	0,803
Predotar	0,000	0,000	
MitoP	0,024		

Tableau r1 : Prédications d'adressage d'AtCCMH

1.5.2. Caractéristiques structurales

Une étude bioinformatique a été réalisée pour déterminer quelle était la structure d'AtCCMH. Aucune prévision de structure tertiaire n'est envisageable sans données cristallographiques ou RMN (Résonance Magnétique Nucléaire). Aucune étude structurale de protéine CcmH bactérienne n'a été publiée à ce jour (juin 2004). Aussi les prédictions de

structure d'AtCCMH se limiteront-elles à la structure secondaire. Tous les logiciels utilisés pour les prédictions sont localisés sur le portail bioinformatique www.bioinformatics.vg.

Un domaine transmembranaire est prédit entre les acides aminés 85 et 105 par le programme TopPred II (Claros and von Heijne, 1994). Cette prédiction est confirmée par de nombreux logiciels tels que PHD. Ces logiciels prédisent que le domaine N-terminal est orienté vers l'extérieur et le domaine C-terminal localisé à l'intérieur. Cette topologie est retrouvée expérimentalement pour les protéines CcmH bactériennes.

Plusieurs logiciels de prédiction de structure secondaire (DPM, DSC, GOR4, HNNC, PHD, Predator, SIMPA96, SOPM) ont été utilisés. Ces logiciels prédisent un domaine N-terminal globulaire et un domaine C-terminal moins structuré. Une structure secondaire consensus a pu être déduite des informations fournies par chaque logiciel (Figure r1.6). La structure d'AtCCMH prédite est donc la suivante : le domaine N-terminal est composé de trois hélices α (D5 - I21 ; Q39 - I54 ; K61 - F71) et d'un brin β (T74 - Y77), le motif RCXXC (R26 - C30) est situé dans une boucle. Le domaine C-terminal comporte deux hélices α (V114 - L121 ; V149 - R159) et un brin β (V133 - L139).

Les prédictions de structure secondaire ont aussi été réalisées pour BjCycL et RcCcl2. En comparant les structures prédites pour ces trois protéines, on remarque que le domaine N-terminal de ces protéines possède une structure secondaire conservée (les protéines bactériennes possèdent en outre une extension N-terminale qui a une structure prédite en hélice α). Par contre des variations de structures prédites sont présentes au niveau du domaine C-terminal. Chez les protéines bactériennes, une seule hélice α est prédite à la fin du domaine alors que pour AtCCMH, deux hélices α et un brin β sont prédits. Le domaine C-terminal n'étant pas localisé dans le même compartiment que le site actif de la protéine il ne serait pas impliqué dans la fonction de la protéine et pourrait donc être soumis à une variabilité structurale.

AtCCMH possède un motif RCXXC et fait donc partie de la famille des protéines thiol-disulfide isomérase. La structure tridimensionnelle de certaines protéines de cette famille est connue. Ce sont des protéines globulaires avec un cœur formé d'un feuillet β entouré d'hélices α , le site actif étant exposé à la surface. Au niveau de la structure secondaire, le site actif est dans une boucle située entre un brin β et une hélice α . Dans certains cas, les derniers acides aminés du motif sont les premiers acides aminés de l'hélice. AtCCMH ne possède pas un tel repliement puisqu'il n'y a pas de brin β avant le site actif. Mais on peut supposer un

MEKTDEERKKAQMLDARARNISHNV**RCTEC**GSQSIEDSQADIAILLRQL
 cccc**hhhhhhhhhhhhhhhhhhhh**?c**e**?cccccccc??**hhhhhhhhhhhh**
 IRNEIGAGKTDKEIYSKLEDEFGETVLYAPKFDLQ**TAALWLTPVI**IAGG
hhhhcccc**hhhhhhhhhhhh**c?**eee**cccc?**hhhh**cc**eee**?ccc
TAAGIVYQKHRLRKNVDIMALNLIRGVPLTPKERVTILDVLIPPSPPPQ
 c?**ee**?**hhhh**??c**hhhhhhhh**cccccccccccc**eeeeeeee**cccccccc
 GVVSRLRRWLNR
 c**hhhhhhhhhhhh**

Figure r1.6 : Structure secondaire prédite d'AtCCMH.

La séquence d'AtCCMH est donnée avec, en dessous, une structure secondaire consensus obtenue avec différents programmes de prédiction : DPM, DSC, GOR4, HNNC, PHD, Predator, SIMPA96, SOPM. Le site actif RCTEC d'AtCCMH est indiqué en orange et le domaine hydrophobe en bleu.

c : région non structurée

h : hélice

e : brin β

? : non conservé entre les différents logiciels

repliement similaire, c'est-à-dire une protéine globulaire dont le motif RCXXC est exposé à sa surface pour permettre aux cystéines d'accéder à leur cible.

1.5.3. Modifications post-traductionnelles

Une fraction totale de mitochondries purifiées à partir de cellules d'*A. thaliana* en culture a été séparée sur un gel bidimensionnel (IEF-SDS-PAGE). Les protéines ont tout d'abord été séparées sur un gradient non linéaire de pI de 3 à 10 puis selon leur poids moléculaire. Après transfert des protéines du gel sur une membrane de PVDF, celle-ci a été incubée en présence d'anticorps dirigés contre le domaine N-terminal d'AtCCMH. Après immunodétection, une série de signaux à 20 kDa ayant des pI proches de 10 a été détectée (Figure r1.7). Un autre spot de 45 kDa à pI proche de 7 est détecté, cette protéine est parfois détectée par les anticorps. La série de signaux peut représenter AtCCMH (poids moléculaire calculé 17,9 kDa, pI 9,3). Cette série est composée de trois signaux majoritaires. Ceci indique qu'AtCCMH pourrait être présente sous trois formes *in vivo*. Ces trois formes peuvent correspondre à des modifications post-traductionnelles.

Les modifications post-traductionnelles potentielles ont été prédites par différents logiciels (Prosite, Motif Scan, ProSA). Tous ces logiciels donnent le même résultat et détectent un site de N-glycosylation (N20), deux sites de phosphorylation par la protéine kinase C (T59, T128), sept sites de phosphorylation par la caséine kinase II (T4, S34, S38, T59, S65, T128, T134) et deux sites de N-myristoylation (G55, G97). Certaines protéines mitochondriales sont phosphorylées (Schulenberg *et al.*, 2004). Par contre aucun exemple de glycosylation ou de myristoylation n'a été décrit pour des protéines mitochondriales pour l'instant. Il y a donc de fortes chances que les modifications post-traductionnelles potentielles d'AtCCMH soient des phosphorylations.

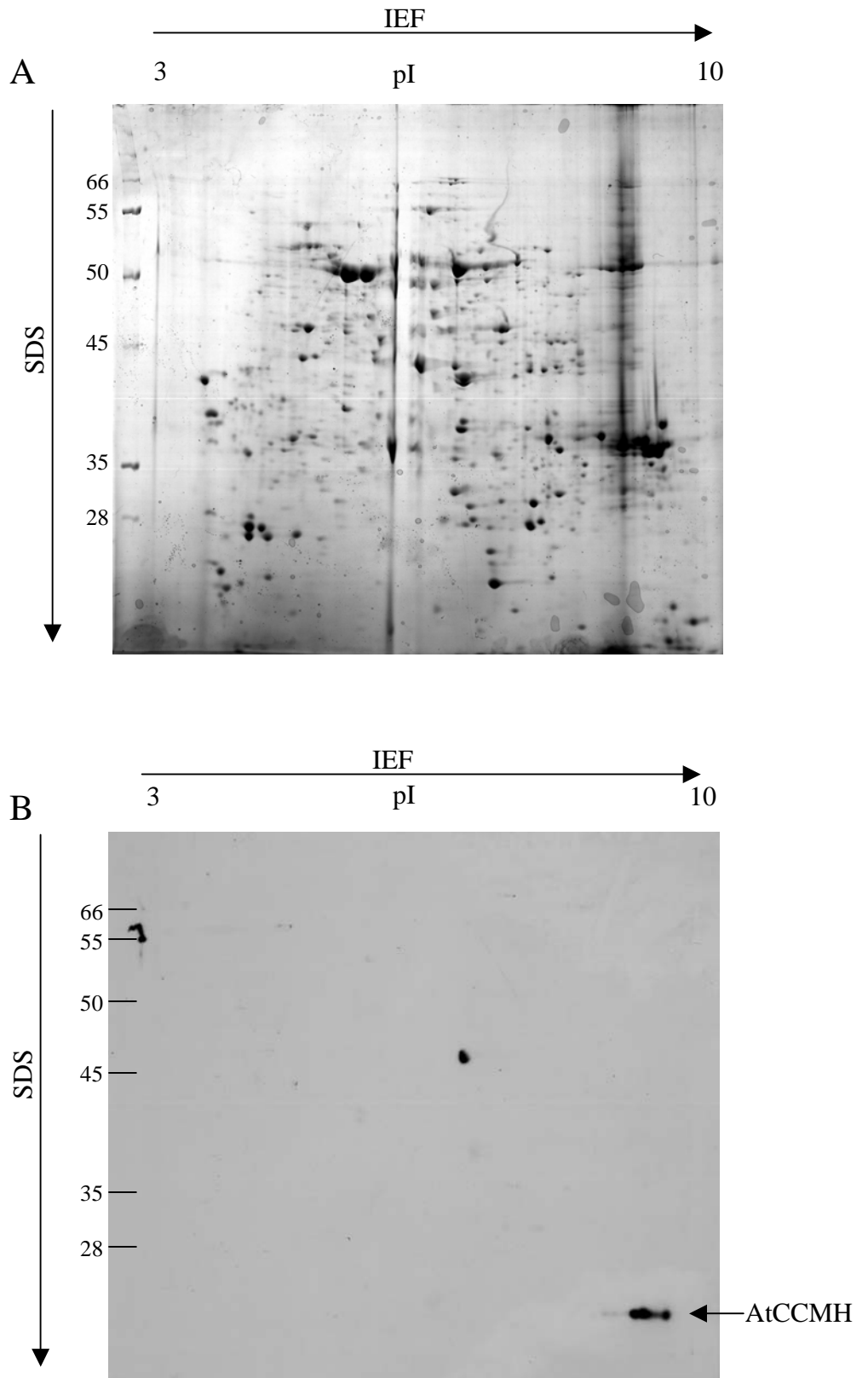


Figure r1.7 : Gel bidimensionnel IEF-SDS-PAGE obtenu à partir d'un extrait mitochondrial total d'*A. thaliana*, obtenu à partir de cellules en culture.

A : coloration du gel au bleu de Coomassie.

B : immunodétection avec les anticorps anti-AtCCMH.

Les poids moléculaires sont indiqués en kDa.

2. Localisation cellulaire et topologie d'AtCCMH

2.1. Localisation sous-cellulaire

Si AtCCMH est bien l'orthologue des protéines CcmH bactériennes, elle devrait être localisée dans les mitochondries où sont présentes d'autres protéines CCM, CCMA, CcmB, CcmC, CCME (la nomenclature utilisée pour les gènes et protéines CCM est définie en Annexe 1) et les différentes protéines homologues de CcmF. L'étude de la localisation cellulaire d'AtCCMH a été réalisée en utilisant trois méthodes : l'immunodétection sur des fractionnements cellulaires d'*A. thaliana*, importation *in vitro* dans des mitochondries isolées et localisation *in vivo* par expression transitoire d'une protéine fusionnée à la GFP.

2.1.1. Immunodétection d'AtCCMH sur des fractionnements cellulaires

Production d'anticorps contre AtCCMH

La séquence codant pour le domaine N-terminal d'AtCCMH (M1-D82) a été amplifiée par RT-PCR (transcription inverse avec une amorce poly-T, PCR avec z303 et z304 comme amorce, z303 contient le site *NcoI* (CCATGG) comme site de clonage au niveau du codon ATG d'AtCCMH, z304 contient le site *BamHI* juste après le codon GAT codant pour l'aspartate 82). Le fragment de PCR est introduit dans les sites *NcoI-BamHI* du vecteur pQE60. Ce vecteur code, en aval du site *BamHI*, pour une séquence poly-histidine suivie d'un codon Stop en phase avec l'ATG du site *NcoI*. Ainsi cette construction, appelée pEM2, code pour le domaine N-terminal d'AtCCMH (M1-D82) avec une étiquette poly-histidine (GSRSHHHHHH, la séquence GSRS étant générée par les sites de clonage).

Des bactéries compétentes *E. coli* BL21 (une souche de bactérie développée pour l'expression de protéines) ont été transformées par le plasmide pEM2. Le peptide codé par pEM2 a été purifié en conditions dénaturantes (cf. Matériels & Méthodes 2.4.6) grâce à son étiquette poly-histidine. Ce peptide purifié a été utilisé pour immuniser deux lapins. 7 injections de 100 µg de peptide purifié séparées chacune de deux semaines ont été réalisées puis suivies de saignées toutes les deux semaines, la première saignée ayant lieu une semaine après la troisième injection. Une semaine après la dernière injection de peptide, une saignée à blanc est réalisée. Les différents sérums récupérés lors des saignées ont été testés contre des protéines totales de mitochondries purifiées d'*A. thaliana*. Une saignée a été purifiée par

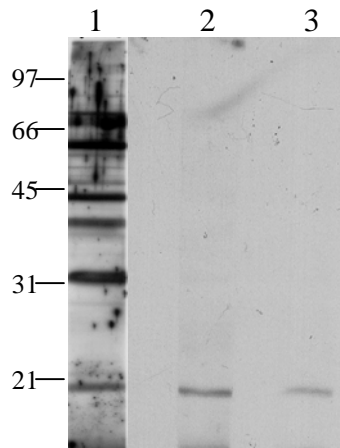


Figure r2.1 : Immunodétection des protéines totales de mitochondries d'*A. thaliana* à l'aide d'anticorps anti-AtCCMH.

1 : anticorps non purifiés

2 : anticorps purifiés (élution acide)

3 : anticorps purifiés (élution basique)

Une échelle de poids moléculaire en kDa est indiquée.

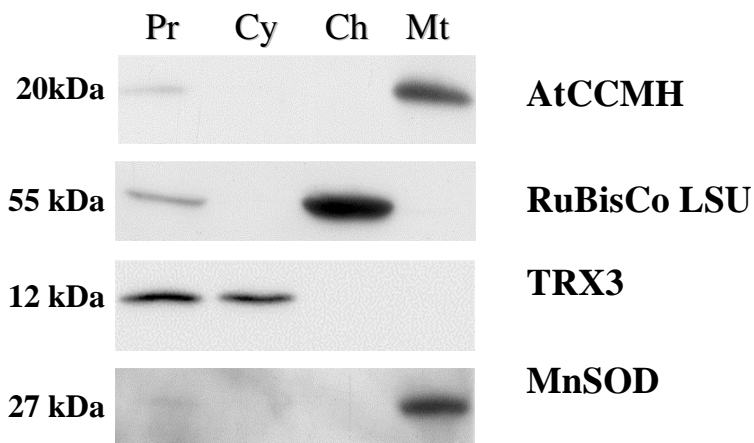


Figure r2.2 : Localisation cellulaire d'AtCCMH par immunodétection sur des fractions cellulaires préparées à partir de protoplastes de cellules d'*A. thaliana* en culture.

Pr : protoplastes

Cy : cytosol

Ch : chloroplastes

Mt : mitochondries

Rubisco LSU : grande sous unité de la RuBisCo

TRX3 : thioredoxine cytosolique

MnSOD : superoxyde dismutase à manganèse mitochondriale

affinité pour le peptide purifié (cf. matériels & méthodes 2.5.2). Après purification, les anticorps anti-AtCCMH ne reconnaissent plus qu'une protéine à 20 kDa dans une fraction mitochondriale (Figure r2.1). Ce poids moléculaire est proche du poids moléculaire calculé d'AtCCMH qui est de 17,8 kDa.

Localisation cellulaire par immunodétection

Les anticorps purifiés obtenus ont été testés contre des protéines de différentes fractions cellulaires issus de protoplastes d'*A. thaliana* (cf. matériels & méthodes 2.1.2). Un signal correspondant à une protéine de 20 kDa est spécifiquement détecté dans la fraction de protéines de protoplastes et dans la fraction mitochondriale (Figure r2.2). Les fractionnements protéiques ont été validés avec des anticorps dirigés contre des protéines spécifiques de chaque compartiment : RuBisCo LSU, la grande sous-unité de la RuBisCO, la protéine la plus abondante des chloroplastes ; TRX3, une thiorédoxine cytoplasmique ; MnSOD, une protéine de la matrice mitochondriale la superoxyde dismutase à manganèse. Par ailleurs, les anticorps anti-AtCCMH ne reconnaissent pas de protéine dans l'extrait protéique chloroplastique. Cette expérience indique qu'AtCCMH a une localisation exclusivement mitochondriale.

2.1.2. Importation *in vitro*

L'importation *in vitro* permet non seulement de vérifier l'importation d'une protéine dans un organe donné mais aussi d'étudier le mécanisme d'importation. La protéine AtCCMH complète (construction pEM7, cf. Résultat 1.2.3) a été marquée radioactivement avec de la méthionine [³⁵S] lors d'une traduction *in vitro* avec un lysat de réticulocytes de lapin. AtCCMH possède trois méthionines, deux dans le domaine N-terminal et une dans le domaine C-terminal, elle sera donc marquée sur toute sa longueur. La protéine majoritaire ainsi marquée a une taille de 20 kDa, ce qui est identique à la taille de la protéine détectée dans les mitochondries par les anticorps anti-AtCCMH.

L'importation *in vitro* a été testée avec des mitochondries isolées de pommes de terre ou de choux-fleurs (cf. matériels & méthodes 2.1.1).

Lorsqu'AtCCMH radiomarkée est incubée avec des mitochondries de pommes de terre isolées (Figure r2.3A), le signal à 20 kDa est toujours majoritairement (piste 3) présent mais en plus un produit de 15 kDa, non présent dans la traduction, apparaît. Après un traitement à

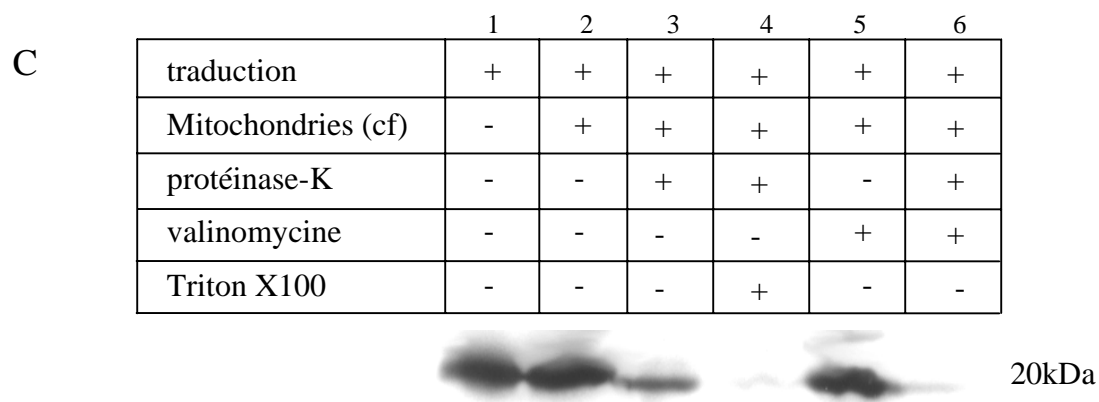
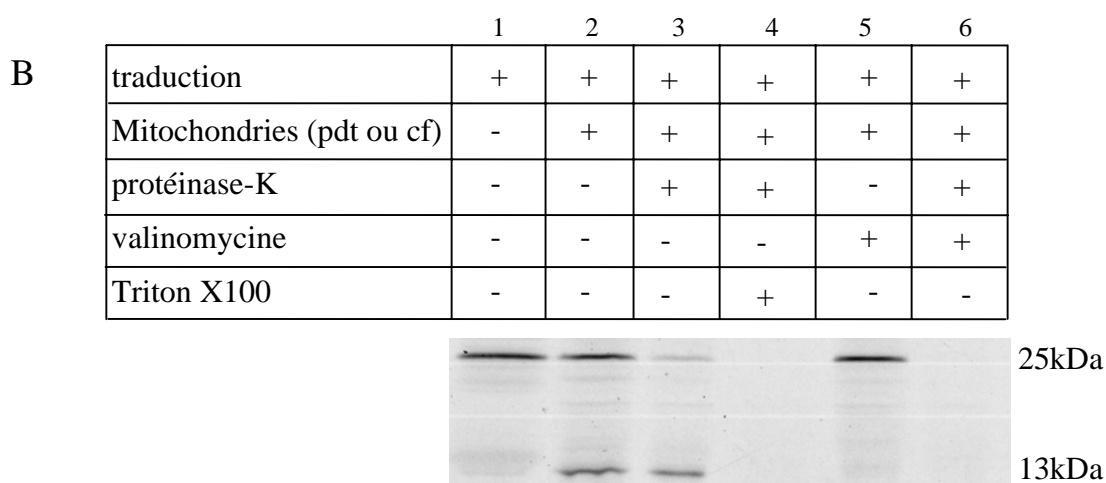
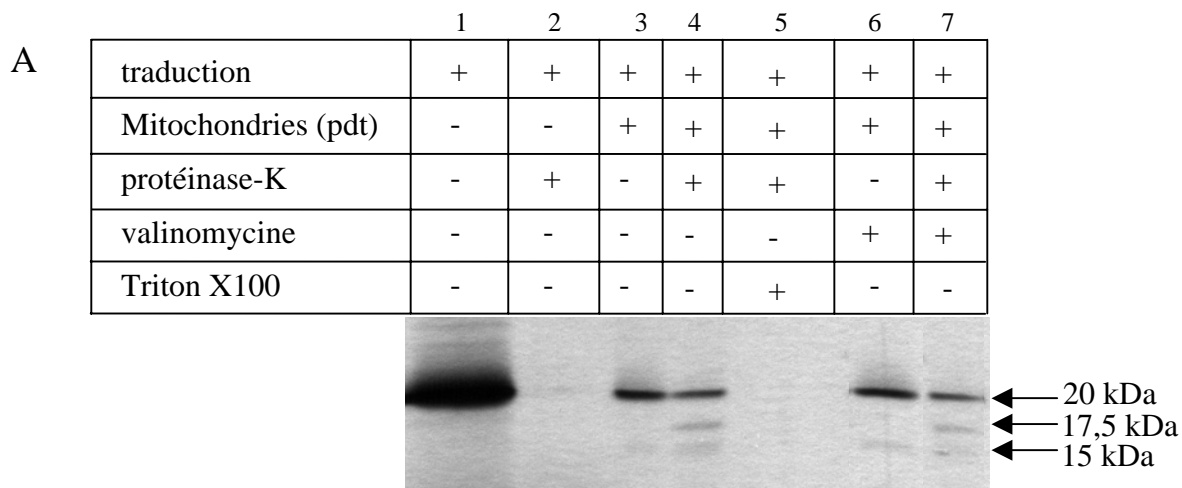


Figure r2.3 : Importation *in vitro* d'AtCCMH dans des mitochondries isolées. Les résultats sont présentés sous forme d'autoradiographie.

A : Test d'importation d'AtCCMH dans des mitochondries de pomme de terre (pdt) isolées

B : Test d'importation d'AtTRX-o1, la thioredoxine o1 d'*A. thaliana*

C : Test d'importation d'AtCCMH dans des mitochondries de chou-fleur (cf) isolées.

la protéinase K (piste 4) de la réaction d'import, la bande à 20 kDa est toujours majoritaire, la bande à 15 kDa toujours présente mais en plus une bande à 17,5 kDa apparaît. Si les membranes sont solubilisées par un traitement au Triton-X100 avant l'incubation avec la protéase (piste 5), tous les signaux observés disparaissent, indiquant que la résistance à la protéinase K observée précédemment est due à la présence de membranes. En effet, le produit de traduction n'est pas résistant à la protéinase K (piste 2).

Une expérience d'importation témoin a été réalisée avec AtTRXo-1 une thiorédoxine de la matrice mitochondriale. Cette thiorédoxine est codée par un gène nucléaire sous la forme d'un précurseur de 25 kDa qui est mûri lors de l'importation en une protéine de 13 kDa (Laloi *et al.*, 2001) (Figure r2.3B).

La protéine AtCCMH mature détectée dans les mitochondries par immunodétection a une taille de 20 kDa, ceci correspond à la forme majoritaire conservée dans les mitochondries après importation et traitement à la protéase. Ceci montre qu'AtCCMH peut être importée *in vitro* dans des mitochondries de pommes de terre isolées sans subir de maturation apparente.

Les deux autres formes observées (15 kDa et 17,5 kDa) ne sont pas des formes d'AtCCMH *in vivo* car elles ne sont pas détectées dans une fraction mitochondriale par immunodétection. Elles représentent plutôt des artefacts du test *in vitro*. La bande de 17,5 kDa n'apparaît qu'en présence de protéinase K, sa présence peut donc s'expliquer par une digestion partielle d'AtCCMH par cette protéase. La bande de 15 kDa est détectable en présence de mitochondries, elle est peut-être due à une digestion partielle d'AtCCMH par une protéase mitochondriale. Une autre explication serait que cette protéine puisse être issue de la traduction initiée à partir de la deuxième méthionine d'AtCCMH (M12) puis mûrie par les mitochondries lors de son import. Malheureusement, aucun précurseur pouvant correspondre à une protéine commençant par la deuxième méthionine d'AtCCMH (une protéine au poids moléculaire calculé de 16,4 kDa) n'a pu être détecté dans la réaction de traduction *in vitro*, mais la migration de celui-ci pourrait être perturbée par la globine qui est très abondante dans le lysat de réticulocyte. Il apparaîtrait donc à une taille différente.

Les expériences montrent qu'AtCCMH est importée indépendamment de la présence d'un potentiel transmembranaire. En effet, un prétraitement à la valinomycine, un ionophore qui rompt le potentiel transmembranaire et ainsi inhibe l'importation des protéines, telle qu'AtTRXo-1 (Figure r2.3B pistes 5 et 6), n'a aucun effet sur l'importation *in vitro* d'AtCCMH dans les mitochondries de pommes de terre (Figure r2.3A, comparaison entre les pistes 4 et 7).

Lors d'un test d'importation d'AtCCMH *in vitro* en utilisant des mitochondries isolées de chou-fleur (Figure r2.3C), un produit majoritaire de 20 kDa est détecté (piste 2). Ce produit est résistant à un traitement à la protéinase K (piste 3). Aucune résistance au traitement à la protéase après dissolution des membranes au Triton-X100 (piste 4) est observée. Le produit majoritaire de 20 kDa a une taille correspondant à celle détectée par les anticorps anti-AtCCMH, ceci montre qu'AtCCMH est importée *in vitro* dans les mitochondries isolées de chou-fleur sans maturation. Les produits de 15 et 17,5 kDa sont parfois détectés lors de l'importation d'AtCCMH dans des mitochondries de chou-fleur, ils ont le même comportement que lors des tests d'imports dans des mitochondries de pommes de terre.

Par contre, si les mitochondries de chou-fleur sont prétraitées à la valinomycine, l'importation d'AtCCMH est inhibée (par comparaison des pistes 3 et 6). Ceci indique le besoin d'avoir un potentiel membranaire, donc des mitochondries actives, pour l'importation d'AtCCMH.

Ainsi, AtCCMH est importée sans maturation apparente dans les mitochondries des deux espèces végétales testées. Par contre la nécessité d'un potentiel membranaire au niveau de la membrane interne est variable selon l'espèce. Le chou-fleur étant de la même famille qu'*A. thaliana*, l'importation d'AtCCMH dans les mitochondries d'*A. thaliana* devrait être similaire à celle obtenue dans les mitochondries de chou-fleur.

L'absence de maturation apparente d'AtCCMH lors de son importation rend les interprétations des résultats plus difficiles. L'efficacité d'importation d'AtCCMH *in vitro* est de l'ordre de 20%. L'importation *in vitro* d'AtCCMH dans des mitochondries isolées a été étudiée plus en détail, les résultats obtenus sont décrits ci-dessous (cf. Résultats-Discussion 2.4)

2.1.3. Localisation *in vivo* par expression transitoire d'une protéine fusionnée à la GFP

Les expériences d'immunodétection et d'importation *in vitro* montrent qu'AtCCMH est localisée dans les mitochondries. Un moyen d'observer la localisation *in vivo* d'une protéine est de la fusionner à la GFP (Green Fluorescent Protein), d'exprimer cette fusion de manière transitoire dans des cellules végétales et d'observer la localisation de la GFP par microscopie confocale. AtCCMH ne possède pas de séquence d'adressage mitochondrial prédite, ainsi nous ne savons pas comment cette protéine est importée dans les mitochondries. Nous avons donc décidé de fusionner AtCCMH en C-terminal de la GFP. Il s'agit d'une construction dans

un vecteur pKS contenant le promoteur 35S du CaMV et la séquence codant pour la GFP devant un site *SpeI* permettant la fusion en phase d'*AtCCMH* avec le gène codant pour la GFP. La construction a été appelée pEM9. Une autre construction, pEM10, contient *AtCCMH* fusionnée en N-terminal de la GFP (fusion réalisée dans le vecteur pCK-GFP) (Figure r2.4). Ces deux constructions devraient aider à déterminer quelle extrémité d'*AtCCMH* est importante pour son importation dans les mitochondries.

Pour la construction pEM9, des morceaux de feuilles de *Nicotiana benthamiana* ont été bombardés avec des billes de tungstène recouvertes de plasmides pEM9 ainsi qu'un plasmide portant une construction codant pour une préséquence d'adressage mitochondrial fusionnée à la RFP (Red Fluorescent Protein). Cette construction, appelée mRFP, est utilisée comme contrôle de localisation mitochondriale. L'expression transitoire de la GFP est observée au microscope confocal 24 h après le bombardement. Lors de ce test, nous n'avons pas obtenu d'expression de la construction mRFP. Par contre, la fluorescence de la GFP est détectée au niveau de la membrane cytoplasmique ou de la paroi des cellules épithéliales (Figure r2.4A).

La construction pEM10 a aussi été bombardée en même temps que la construction mRFP mais cette fois-ci les cellules bombardées sont des cellules de tabac BY-2 en culture. L'observation est réalisée au microscope confocal 24 h après le bombardement. La construction mRFP s'exprime faiblement mais permet d'observer des structures ponctuées dans le cytoplasme assimilées à des mitochondries. En revanche, la fluorescence de la GFP ne co-localise pas avec celle de la RFP. La GFP est détectée au niveau de la membrane cytoplasmique ou de la paroi des cellules BY-2 (Figure r2.4B).

Des cellules transformées ont été placées sur un milieu plasmolysant. Ce traitement permet de séparer la membrane plasmique de la paroi. La fluorescence de la GFP est détectée dans ces cellules au niveau de la membrane plasmique mais pas au niveau de la paroi (Figure r2.4C).

Ainsi, une localisation des deux fusions entre *AtCCMH* et la GFP au niveau de la membrane plasmique a été observée. La technique de localisation *in vivo* par expression transitoire d'une protéine fusionnée à la GFP donne parfois des résultats artéfactuels. Lors de ces expériences, la protéine de fusion est surexprimée dans la cellule végétale, cette surexpression, ne reflétant en rien la situation *in vivo*, peut être la cause d'artéfacts.

Cette localisation artéfactuelle ne permet pas de déterminer si un signal d'adressage mitochondrial est présent à l'une des deux extrémités d'*AtCCMH*. Ce signal d'adressage est peut-être incapable d'amener une grosse protéine (*AtCCMH* + GFP) vers la mitochondrie. La

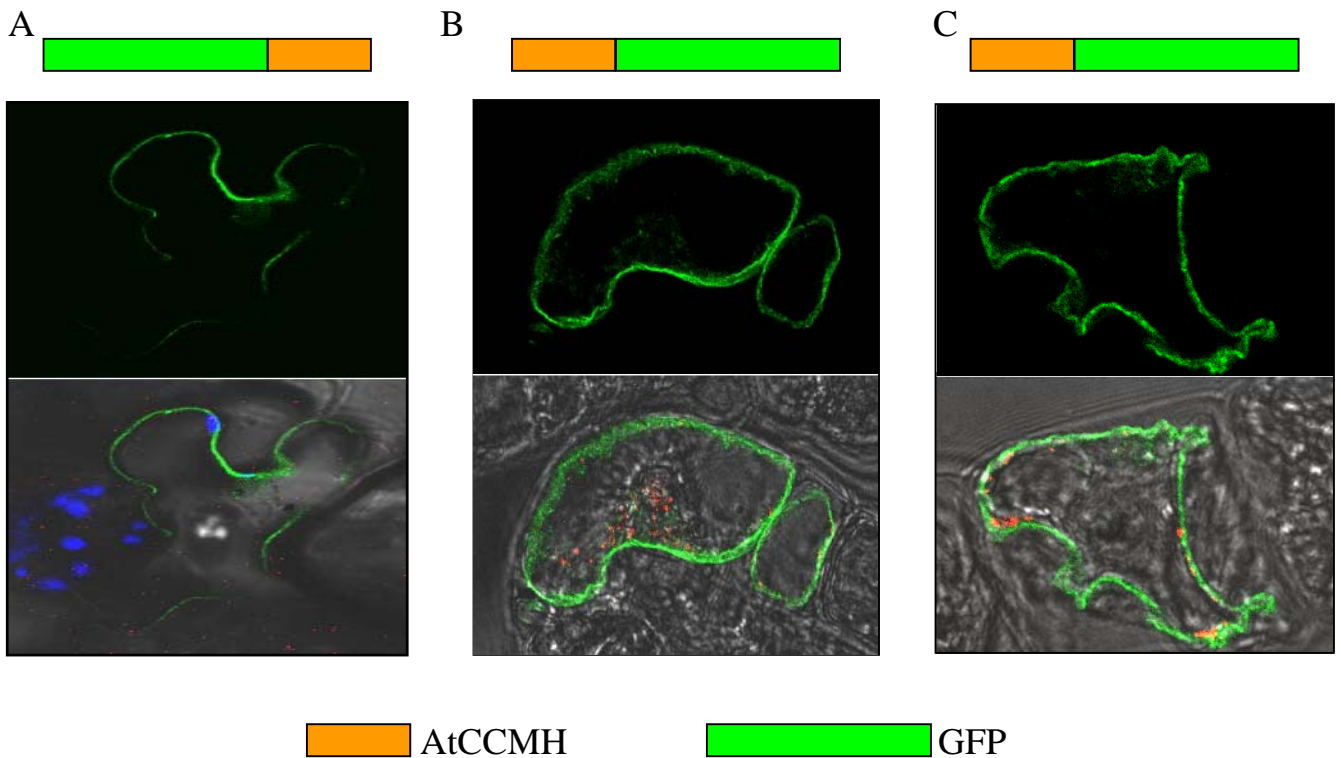


Figure r2.4 : Localisation *in vivo* par expression transitoire d'une fusion entre AtCCMH et la GFP. Les observations ont été réalisées au microscope confocal.

A : fusion avec AtCCMH en C-terminal (pEM9) transformée dans des cellules épithéliales de feuilles.

B : fusion avec AtCCMH en N-terminal (pEM10) transformée dans des cellules de BY2 en culture

C : fusion avec AtCCMH en N-terminal (pEM10) transformée dans des cellules de BY2 en culture puis plasmolysées.

L'image du haut montre la localisation de la GFP. L'image du bas superpose la localisation de la GFP, de la mRFP (marqueur mitochondrial en rouge) et l'image visible.

GFP est presque deux fois plus grande qu'AtCCMH (35 kDa contre 20 kDa), la structure des fusions masque peut-être le signal d'adressage.

Les protéines codées par le génome nucléaire puis adressées aux mitochondries sont dénaturées par des chaperons pour leur permettre de transiter à travers les complexes de translocation des membranes des organites. La présence de la GFP fusionnée à AtCCMH empêche peut-être la reconnaissance par le chaperon.

La localisation des fusions au niveau de la membrane plasmique est surprenante. AtCCMH pourrait posséder un signal d'adressage vers les membranes qui permettrait son insertion dans une membrane mitochondriale lorsque la protéine est présente dans la mitochondrie. Mais la protéine n'étant pas adressée à la mitochondrie, ce signal pourrait être reconnu et la protéine adressée à la membrane plasmique. AtCCMH possède un domaine hydrophobe, l'accumulation d'une telle protéine au sein du cytoplasme pourrait entraîner la formation d'agrégats qui pourraient perturber la physiologie cellulaire. Est-ce pour prévenir la formation de ces agrégats que la protéine de fusion est adressée à la membrane plasmique ?

Ces expériences de localisation *in vivo* après fusion à la GFP pourraient ne pas être adaptées pour déterminer la localisation de protéines possédant un signal d'adressage interne, ce qui semble être le cas pour AtCCMH. En effet, aucun exemple de localisation par fusion avec la GFP de protéines possédant une séquence d'adressage interne n'est connu à l'heure actuelle.

2.2. Localisation sous-mitochondriale

La localisation d'AtCCMH dans la mitochondrie a été déterminée par immunodétection sur différentes fractions sous-mitochondriales. Ces fractions ont été préparées à partir des mitochondries obtenues par fractionnement de protoplastes de cellules d'*A. thaliana* en culture.

Tout d'abord, les mitochondries sont incubées dans un tampon hypotonique pour gonfler la matrice, déplier la membrane interne et ainsi rompre la membrane externe. Deux fractions sont purifiées sur un gradient de saccharose, une fraction de mitoplastes (mitochondries dépourvues de membrane externe) et une fraction de membranes externes. Les anticorps anti-AtCCMH reconnaissent un signal à 20 kDa uniquement dans la fraction de mitoplastes mais pas dans la membrane externe (Figure r2.5A). La qualité du fractionnement a été contrôlée en utilisant des anticorps dirigés contre NAD9, une protéine du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale localisée du côté matriciel de la membrane interne, donc

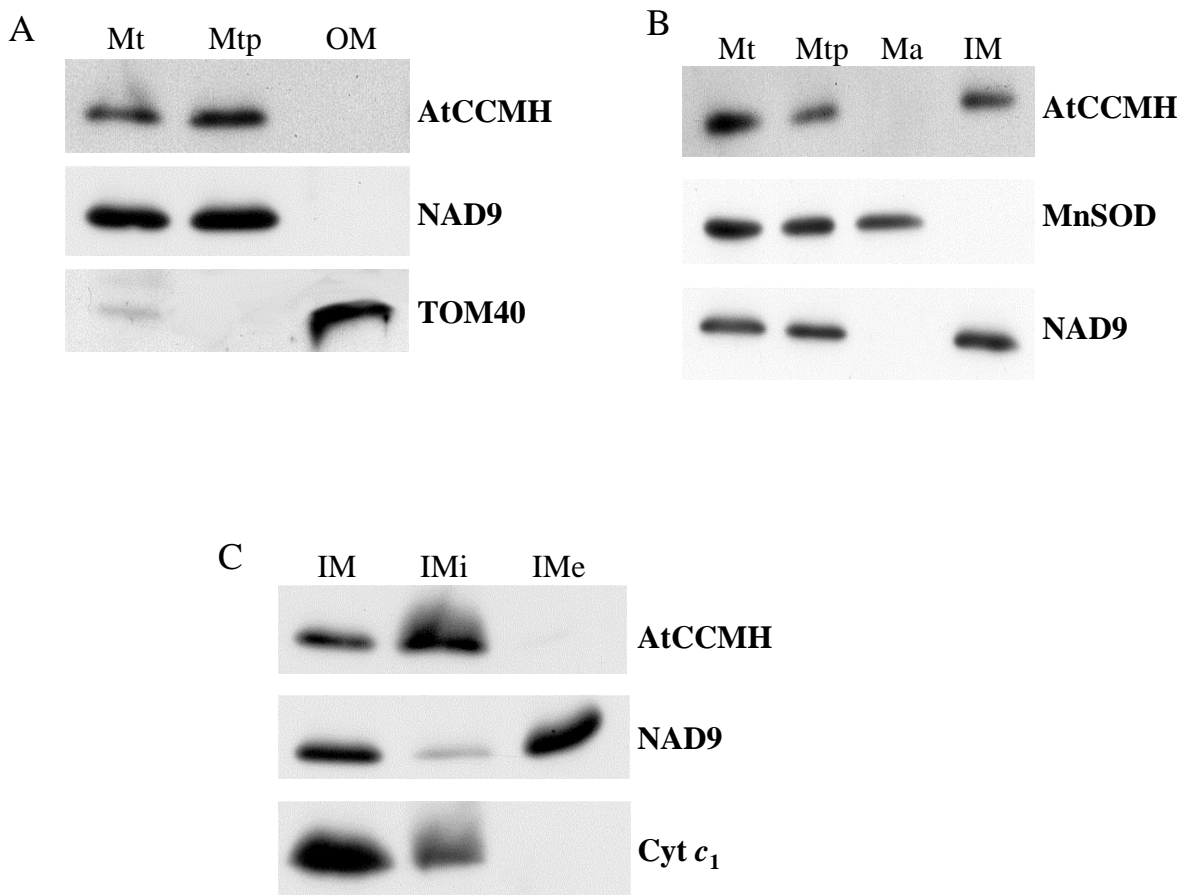


Figure r2.5 : Localisation sous mitochondriale d'AtCCMH

Les résultats présentés sont des immunodétections sur différentes fractions.

A : purification de mitoplastes.

B : fractionnement des mitoplastes.

C : solubilisation des protéines extrinsèques.

Mt : mitochondrie, Mtp : mitoplastes, OM : membrane externe, Ma : matrice, IM : membrane interne, IMi : protéines intrinsèques de la membrane interne, IMe : protéines extrinsèques de la membrane interne.

NAD9 : sous unité 9 du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale. TOM40 : sous unité de 40 kDa de la translocase de la membrane externe. MnSOD : superoxide dismutase à manganèse. Cyt *c*₁ : cytochrome *c*₁.

spécifique des mitoplastes et TOM40, un membre du complexe de translocation des protéines de la membrane externe. On ne détecte pas de contamination entre les deux fractions. Cette expérience montre qu'AtCCMH est bien une protéine de la membrane mitochondriale interne.

Les mitoplastes ont ensuite été cassés par trois cycles de congélation/décongélation suivie d'une sonication. Ce traitement déstabilise les structures membranaires et les rompt. Après ultracentrifugation, les résidus membranaires sédimentent alors que le surnageant contient les protéines solubles des mitoplastes assimilées à la matrice. Comme NAD9, AtCCMH est présent uniquement dans la fraction membranaire (Figure r2.5B). L'immunodétection réalisée avec l'anticorps anti-MnSOD montre qu'il n'y a pas de protéines solubles contaminantes présentes dans la fraction membranaire.

AtCCMH est donc une protéine de la membrane mitochondriale interne. Nous avons testé son association avec cette membrane par traitement alcalin. Ce traitement au carbonate de sodium permet de solubiliser les protéines extrinsèques par déstabilisation des interactions électrostatiques entre protéines (Fujiki *et al.*, 1982). Une ultracentrifugation permet de séparer les protéines non solubilisées (toujours associées aux membranes, principalement des protéines intrinsèques) qui sédimentent, des protéines décrochées par le traitement. Ce fractionnement a été validé avec des anticorps reconnaissant des protéines dont le comportement est connu (NAD9 une protéine extrinsèque du complexe I qui est solubilisée et Cyt c_1 qui est une protéine intrinsèque de la membrane interne). AtCCMH est détectée dans la fraction contenant les protéines toujours associées aux membranes (Figure r2.5C).

Les protéines CcmH bactériennes sont insérées dans la membrane plasmique par l'intermédiaire de leur domaine hydrophobe qui est un domaine transmembranaire. Ce domaine hydrophobe est conservé chez AtCCMH. Les résultats obtenus suggèrent donc que ce domaine hydrophobe est aussi un domaine transmembranaire pour la protéine de plante. AtCCMH est donc une protéine intrinsèque de la membrane mitochondriale interne.

2.3. Topologie

Chez les bactéries, CcmH est une protéine transmembranaire avec son domaine N-terminal, possédant le motif RCXXC, localisé dans le périplasme et son domaine C-terminal dans le cytoplasme. Pour vérifier l'orientation d'AtCCMH dans les mitochondries d'*A. thaliana*, nous avons purifié des mitoplastes et les avons soumis à un traitement à la protéinase K. Les domaines protéiques localisés dans l'espace intermembranaire sont ainsi dégradés, les protéines présentes ou orientées vers la matrice ne sont pas accessibles. Lorsque

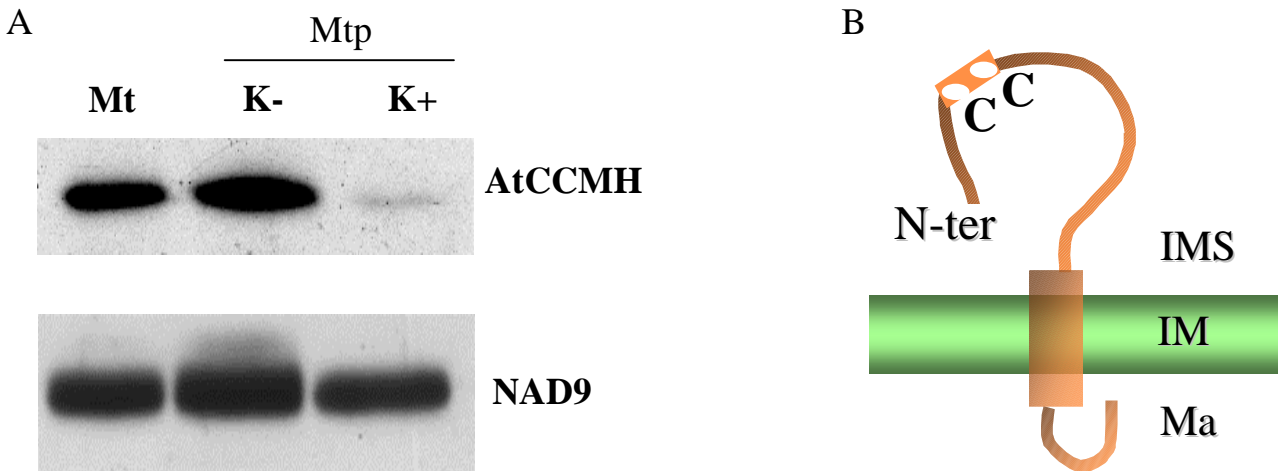


Figure r2.6 : Topologie d'AtCCMH dans les mitochondries.

A : Immunoprécipitations sur des fractions sous mitochondriales.

B : Modèle de la topologie d'AtCCMH dans la membrane mitochondriale interne

Mt : mitochondries

Mtp : mitoplastes

K- : pas de traitement à la protéinase K

K+ : traitement à la protéinase K

IMS : espace intermembranaire

IM : membrane interne

Ma : matrice

des mitoplastes subissent un tel traitement, le signal correspondant à l'immunodétection d'AtCCMH disparaît (Figure r2.6). Les anticorps anti-AtCCMH ont été produits contre le domaine N-terminal de la protéine, ce domaine est donc orienté vers l'espace intermembranaire. L'intégrité des mitoplastes est vérifiée en utilisant l'anticorps anti-NAD9. Cette protéine appartient au complexe I de la chaîne respiratoire et est située sur la face matricielle de la membrane interne.

AtCCMH possède une topologie mitochondriale similaire à celle de ses orthologues bactériens, donc en adéquation avec son rôle supposé.

2.4. Caractérisation de l'importation *in vitro*

L'importation d'AtCCMH est particulière. En effet, les premiers tests ont montré qu'AtCCMH est importée *in vitro* sans maturation apparente (précurseur et forme mature ayant une taille de 20 kDa). De plus, des résultats différents ont été obtenus selon le matériel végétal utilisé dans le rôle du potentiel transmembranaire de la membrane interne (pas d'effet pour l'importation dans les mitochondries de pommes de terre, nécessaire pour l'import dans les mitochondries de chou-fleur). Nous avons essayé d'en savoir plus sur cet import en testant d'autres paramètres.

2.4.1. Immunoprécipitation après importation

Cette expérience a été réalisée pour confirmer que la protéine traduite *in vitro* et utilisée lors des expériences d'importation est bien AtCCMH et pour déterminer si les deux bandes additionnelles observées après importation (à 17 kDa et à 15,5 kDa) correspondent à des produits de maturation ou de dégradation d'AtCCMH. Après importation et traitement à la protéinase K, le culot de mitochondries est repris dans un tampon contenant du SDS qui va solubiliser les membranes et dénaturer les complexes protéiques. Le SDS est remplacé par un excès de Triton-X100, un détergent non-ionique qui ne perturbera pas les interactions antigène-anticorps, puis l'extrait ainsi obtenu est incubé avec du sérum anti-AtCCMH. Le complexe antigène-anticorps formé est précipité avec de la protéine A-Sepharose puis analysé par autoradiographie après séparation sur SDS-PAGE. Les anticorps anti-AtCCMH précipitent la protéine radiomarquée de 20 kDa importée dans les mitochondries (Figure r2.7). Donc la protéine traduite *in vitro* correspond bien à AtCCMH. En effet, cette protéine n'est

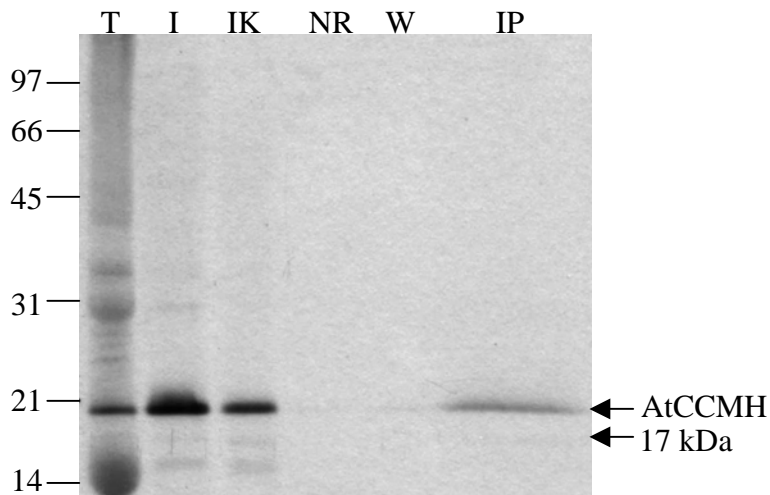


Figure r2.7 : Immunoprécipitation après importation.

Les mitochondries sont solubilisées après importation et traitement à la protéinase K puis la solution est incubée avec le sérum anti-AtCCMH. Les complexes antigènes/anticorps sont précipités avec de la protéine A-Sepharose. L'expérience est analysée sur SDS-PAGE puis une autoradiographie est réalisée.

T : produit de traduction d'AtCCMH

I, IK : témoins d'importation d'AtCCMH sans(I) ou avec (IK) traitement à la protéinase K

NR : fraction contenant les protéines non reconnues par les anticorps anti-AtCCMH (1/50^{ème} du total)

W : dernier lavage de la protéine A-Sepharose (1/50^{ème} du total)

IP : culot de protéine A-Sepharose ayant précipité les complexes antigènes/anticorps anti-AtCCMH

L'échelle de poids moléculaires est donnée en kDa.

pas précipitée en absence d'anticorps. De plus, les anticorps anti-AtCCMH sont capables d'immunoprécipiter une protéine mitochondriale de 20 kDa (cf. Résultats 4.2).

Il est très difficile de déterminer le comportement des deux bandes additionnelles présentes dans la fraction mitochondriale après importation *in vitro* (à 15,5 kDa et à 17 kDa) avec cette technique. Ces bandes sont très minoritaires par rapport à la bande à 20 kDa correspondant à AtCCMH. Ainsi, il semble que la bande à 17 kDa soit immunoprécipitée par les anticorps anti-AtCCMH. Par contre la bande à 15,5 kDa n'est pas détectée dans la fraction contenant les protéines immunoprécipitées. Cette bande à 15,5 kDa serait donc un artéfact.

2.4.2. Cinétique de l'importation

Une cinétique de l'importation d'AtCCMH a été réalisée pour étudier les bandes additionnelles détectées après importation (bandes à 15,5 kDa et 17 kDa). Le test d'importation *in vitro* a été réalisé pendant quatre durées différentes : 10, 20, 30 et 60 min (Figure r2.8). Lors de l'importation sans traitement à la protéinase K, la bande correspondant à AtCCMH (à 20 kDa), ne varie pas en intensité selon le temps d'incubation. Ceci est dû au fait qu'une partie des précurseurs n'est pas importée et donc qu'ils restent accrochés à l'extérieur des mitochondries. Plus l'incubation est longue, plus l'intensité du signal à 15,5 kDa augmente. Ceci est caractéristique de l'importation d'une protéine. L'intensité du signal à 17 kDa, qui n'est présent qu'après un traitement à la protéinase K, est proportionnelle à l'intensité du signal correspond à AtCCMH. Ce signal à 17 kDa provient soit d'une digestion partielle d'AtCCMH par la protéinase K, soit il correspond à la forme mature d'une protéine importée. Mais si ce signal provenait de l'importation d'une protéine, il serait aussi détecté lors du test sans traitement à la protéinase K. Comment expliquer une dégradation de seulement 3 kDa ? Pourquoi cette dégradation n'est-elle que partielle ? Une explication pourrait être que la fraction d'AtCCMH qui est partiellement dégradée soit bloquée au niveau de la machinerie d'importation et que seuls 3 kDa soient exposés à l'extérieur de la mitochondries, ceux-ci étant digérés par la protéinase K.

2.4.3. Fractionnements après importation

Afin de tester si après importation AtCCMH est bien insérée dans une membrane mitochondriale, un fractionnement a été réalisé après importation et traitement à la protéinase K. Le culot de mitochondries obtenu après l'importation est repris dans un tampon

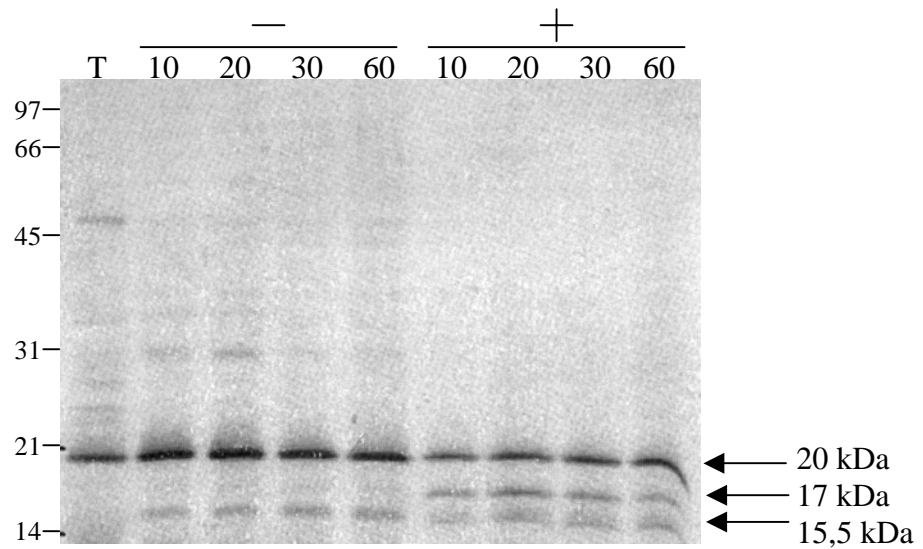


Figure r2.8 : Cinétique de l'importation d'AtCCMH.

L'importation d'AtCCMH est réalisée pendant différents temps (10, 20, 30 et 60 min).

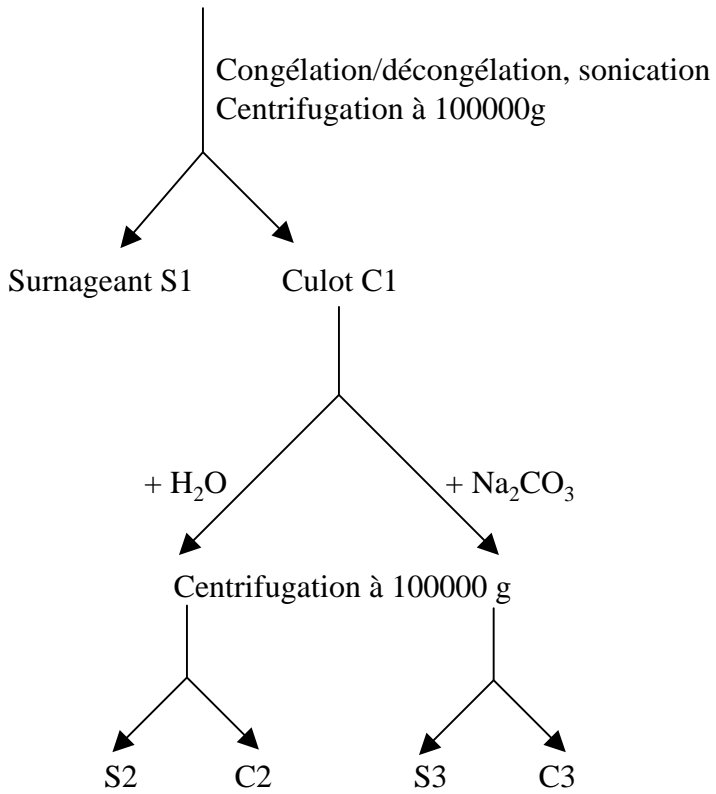
- : Importation sans traitement à la protéinase K

+ : Importation suivie d'un traitement à la protéinase K

L'échelle de poids moléculaires est donnée en kDa.

A

Mitochondries après importation
et traitement à la protéinase K



B

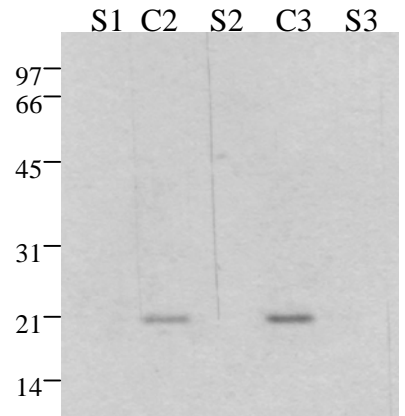


Figure r2.9 : Fractionnements après importation.

A : Schéma des différentes étapes de l'expérience.

B : Autoradiographie du gel d'analyse des différentes fractions.

L'échelle de poids moléculaires est donnée en kDa.

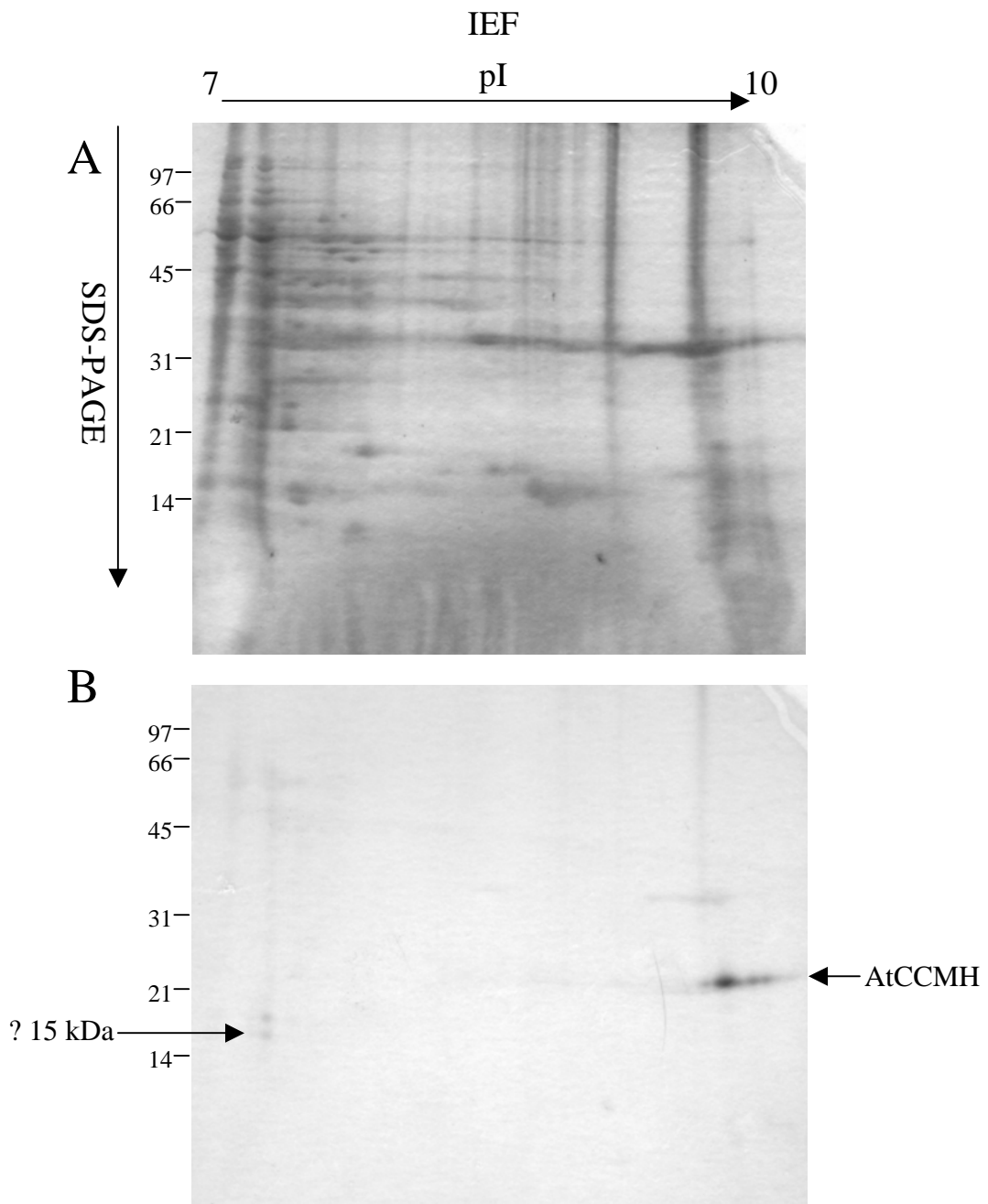


Figure r2.10 : Etude de la maturation d'AtCCMH. Gel bidimensionnel (IEF-SDS-PAGE) réalisé avec l'extrait de mitochondries post traitement à la protéinase K.

A : coloration du gel au bleu de Coomassie.

B : autoradiographie du gel.

L'échelle de poids moléculaires est donnée en kDa.

hypotonique puis cette suspension est soumise à trois cycles de congélation/décongélation. Après ultracentrifugation, le culot contenant les protéines membranaires et le surnageant, contenant les protéines solubles, précipité au TCA sont repris dans le même volume de tampon. La protéine radiomarquée est détectée uniquement dans la fraction membranaire (Figure r2.9). La fraction membranaire a ensuite été soumise à un traitement alcalin afin de solubiliser les protéines extrinsèques. Après un tel traitement AtCCMH est toujours présente dans la fraction membranaire (Figure r2.9). Ces deux résultats suggèrent qu'AtCCMH est bien insérée dans les membranes mitochondriales après importation *in vitro*.

2.4.4. Etude de la maturation d'AtCCMH

La maturation d'AtCCMH a été étudiée en réalisant un gel bidimensionnel (IEF-SDS PAGE) après importation. En effet, aucune maturation n'est détectée après importation *in vitro* sur un gel SDS-PAGE. AtCCMH est une petite protéine (20 kDa), la résolution de ce type de gel ne dépassant pas 1 kDa, il est difficile de visualiser une différence de quelques acides aminés. Les extrémités d'AtCCMH sont très chargées : N-terminal (MEKTDEERKKA---), C-terminal (---SRLRRWLNLR). Si le domaine N-terminal était mûré de quelques acides aminés lors de l'importation, le pI augmentera (si sept acides aminés sont enlevés, le pI passera de 9,3 à 9,9 avec une diminution de poids moléculaire de 1 kDa). De même, une maturation de l'extrémité C-terminale entraînerait une baisse du pI de 0,5 et une baisse de poids moléculaire de 0,7 kDa pour une maturation des six derniers acides aminés. L'extrait mitochondrial utilisé pour le gel bidimensionnel n'est pas traité à la protéinase K, l'apparition d'un spot légèrement décalé pourrait indiquer une éventuelle maturation d'AtCCMH. Pour avoir une meilleure résolution avec les petites protéines, un gel SDS-PAGE 20% est réalisé lors de la deuxième dimension. Après autoradiographie, les trois spots correspondants à AtCCMH (cf. Résultats 1.5.3) sont détectés (Figure r2.10). Ceci indique qu'AtCCMH n'est sûrement pas mûrée lors de son importation ou si cette maturation existe, elle n'est pas détectable par ce type d'expérience. Le seul moyen de déterminer si AtCCMH est mûré lors de son importation serait de purifier la protéine présente dans les mitochondries d'*A. thaliana* et de séquencer ses extrémités.

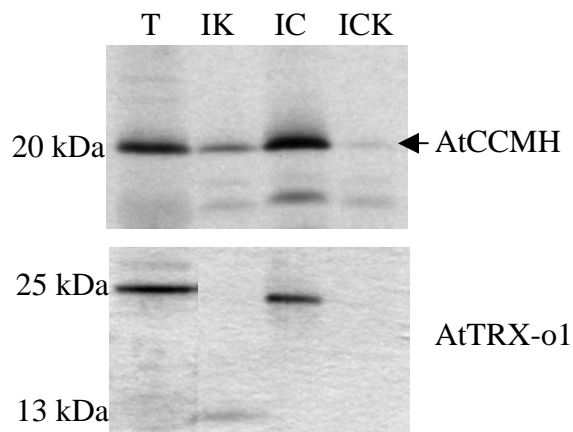


Figure r2.11 : Autoradiographies de fractions protéiques obtenues après importation dans des mitochondries isolées de pommes de terre et inhibition du potentiel transmembranaire avec le CCCP

T : produit de traduction

IK : importation + traitement à la protéinase K

IC : prétraitement au CCCP puis importation

ICK : prétraitement au CCCP puis importation + traitement à la protéinase K

Par contre, le signal à 15 kDa est détecté dans la zone de pI proche de 7, suggérant fortement que cette protéine n'est pas apparentée à AtCCMH. En l'absence de traitement à la protéinase K, le signal de 17,5 kDa ne peut être détecté.

2.4.5. Inhibition du potentiel transmembranaire

Lors des premières expériences réalisées, la valinomycine a été utilisée pour dissiper le potentiel transmembranaire de la membrane interne. Ce traitement n'avait aucun effet sur l'importation d'AtCCMH dans les mitochondries isolées de pommes de terre. AtCCMH est une protéine intrinsèque de la membrane interne. Aucun exemple d'importation d'une protéine à travers la membrane interne découplée par un ionophore n'est publié à l'heure actuelle (juin 2004). Ce résultat, obtenu avec les mitochondries de pommes de terre, est d'autant plus surprenant qu'avec des mitochondries de chou-fleur, le potentiel membranaire est indispensable à l'importation d'AtCCMH. Un autre ionophore, le CCCP a été utilisé pour perturber le potentiel transmembranaire lors d'un test d'importation dans des mitochondries de pommes de terre. Dans ce cas, il y a abolition de l'importation d'AtCCMH. En effet après un traitement à la protéinase K, la bande à 20 kDa disparaît presque complètement (Figure r2.11). Ce résultat montre que l'importation d'AtCCMH nécessite un potentiel membranaire au niveau de la membrane mitochondriale interne. La non-inhibition observée avec la valinomycine est donc un artéfact.

2.4.6. Prétraitement des mitochondries avec une protéase

Afin de déterminer si l'importation d'AtCCMH nécessite un récepteur au niveau de la membrane externe, les mitochondries purifiées ont été traitées à la protéinase K avant importation. Après ce traitement, les mitochondries sont lavées et purifiées à travers un coussin de saccharose puis la réaction d'importation est réalisée. Ce prétraitement à la protéinase K empêche l'importation de la protéine témoin AtTRXo-1. Par contre, AtCCMH est toujours importée malgré la dégradation des protéines de surface des mitochondries (Figure r2.12). Ce résultat indique qu'AtCCMH peut être importée *in vitro* malgré la dégradation d'un grand nombre de protéines exposées à la surface dont certains récepteurs (celui qui est utilisé lors de l'importation d'AtTRXo-1 par exemple). Le récepteur qui est reconnu par AtCCMH n'est peut-être pas accessible à la protéinase K ou bien l'importation d'AtCCMH ne nécessite pas de récepteur au niveau de la membrane externe.

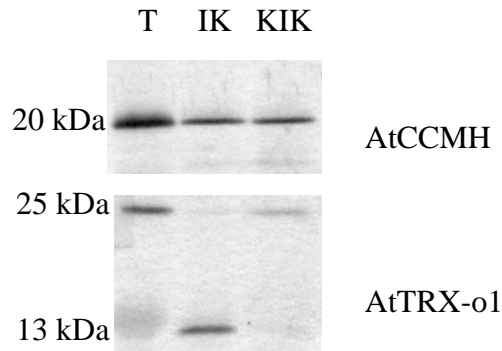


Figure r2.12 : Autoradiographies de fractions protéiques obtenues après importation et prétraitement à la protéinase K

T : produit de traduction

IK : importation + traitement à la protéinase K

KIK : prétraitement à la protéinase K, lavage puis importation + traitement à la protéinase K

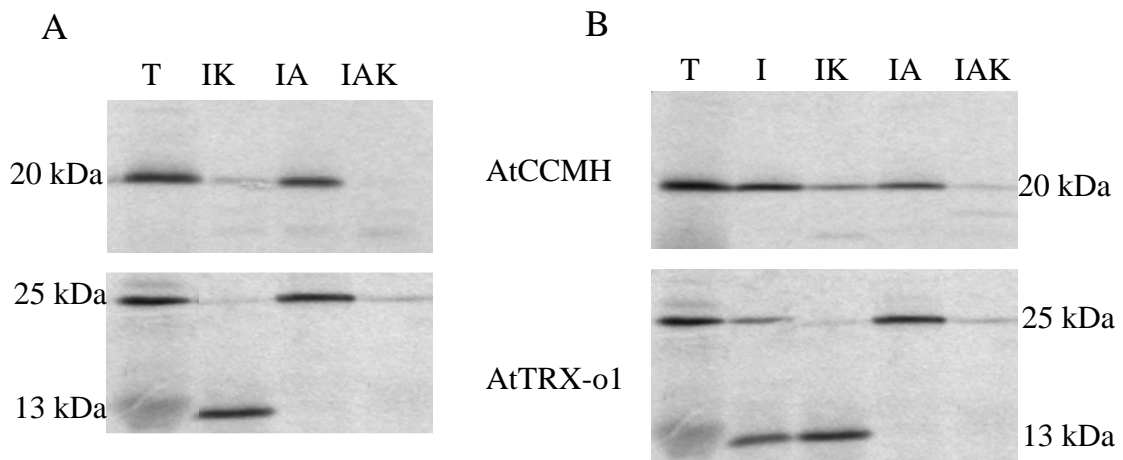


Figure r2.13 : Influence de l'ATP sur l'importation d'AtCCMH

A : importation sans ATP à l'extérieur des mitochondries. B : importation dans des mitochondries déplétées en ATP.

T : produit de traduction

I : importation

IK : importation + traitement à la protéinase K

IA : importation dans les conditions sans ATP

IAK : importation dans les conditions sans ATP + traitement à la protéinase K

2.4.7. Influence de l'ATP

L'ATP joue un rôle important lors de l'importation des protéines dans les mitochondries. En effet, dans le cytoplasme, il permet le relargage de la protéine à importer par le chaperon qui la déstructure pour permettre son passage à travers les pores de translocation des membranes mitochondriales. Dans la matrice mitochondriale, les protéines en cours d'importation sont prises en charge par HSP70, qui en consommant de l'ATP permet la translocation de la chaîne peptidique à travers la membrane interne.

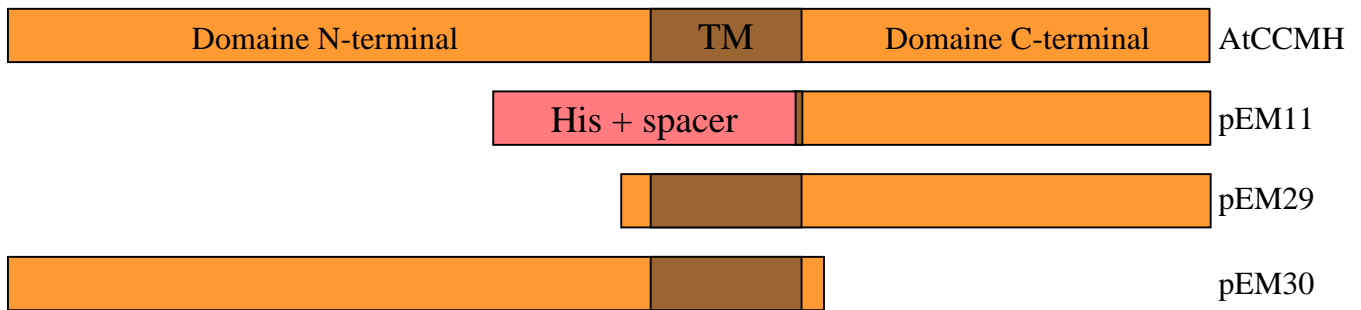
L'ATP est synthétisé du côté matriciel de la membrane interne par l'ATP synthétase. Ce complexe peut être inhibé par l'oligomycine. L'ATP synthétisé est soit utilisé par la mitochondrie soit exporté dans le cytoplasme pas le biais de l'ANT (Adenine Nucleotide Translocator) qui exporte l'ATP en important de l'ADP. L'ANT peut être bloquée au niveau de l'espace intermembranaire par l'atractyloside. Enfin, l'ATP ou l'ADP peuvent être dégradés en AMP par l'apyrase.

Un test d'importation sans ATP à l'extérieur de la mitochondrie a été réalisé. Pour cela, les mitochondries isolées sont traitées à l'atractyloside pour empêcher l'exportation de l'ATP néosynthétisé hors de la mitochondrie. Puis les mitochondries sont incubées dans du tampon d'importation contenant de l'apyrase pour dégrader l'ATP résiduel. D'un autre côté, la réaction de traduction est aussi traitée à l'apyrase, le lysat de réticulocyte renfermant de l'ATP à éliminer. La réaction est ensuite réalisée dans les conditions habituelles. Ce traitement inhibe l'importation d'AtTRXo-1 mais aussi l'importation d'AtCCMH (Figure r2.13A).

Des mitochondries ont aussi été épuisées en ATP. Pour cela, dans un premier temps, les mitochondries sont incubées avec de l'oligomycine pour stopper la synthèse d'ATP et de l'apyrase pour dégrader l'ATP résiduel. Les mitochondries sont ensuite lavées et purifiées sur un coussin de saccharose pour éliminer l'apyrase. Enfin, elles sont traitées à l'atractyloside pour stopper l'échange ATP/ADP et incubées dans un tampon d'importation contenant de l'oligomycine mais aussi de l'ATP. Ce traitement de déplétion d'ATP inhibe l'importation d'AtTRXo-1 et diminue fortement celle d'AtCCMH (Figure r2.13B).

L'ATP résiduel après traitement à l'apyrase a été mesuré par réaction luminométrique en utilisant la luciférase. En présence d'ATP et d'O₂, cette enzyme transforme la luciférine en oxy-luciférine. Cette réaction s'accompagne de l'émission de lumière ($\lambda_{\max} = 560 \text{ nm}$). Si

A



B

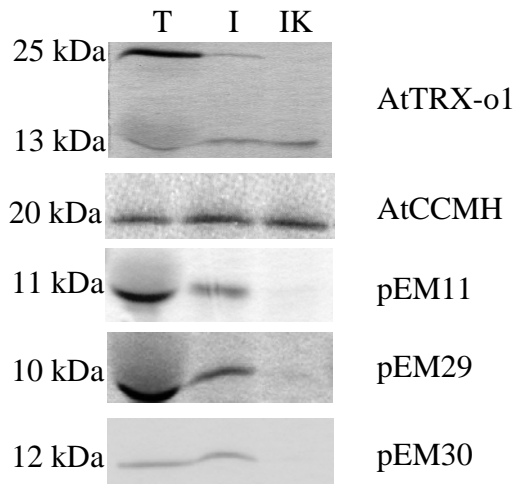


Figure r2.14 : Etude du signal d'adressage

A : Mutants de délétion réalisés

TM = domaine transmembranaire

B : Autoradiographies obtenues lors des expériences d'importation de ces mutants.

T : produit de traduction

I : test d'importation

IK : test d'importation suivi d'un traitement à la protéinase K.

l'ATP est le substrat limitant de la réaction, l'intensité de lumière émise est proportionnelle à la concentration d'ATP. Ainsi la mesure de l'intensité de lumière émise avec un luminomètre permet une quantification directe de l'ATP. Par comparaison avec une gamme de concentration d'ATP, la mesure de l'ATP résiduel dans la réaction d'importation sans ATP extérieur donne une concentration en ATP d'environ 1 μM . Or dans un tampon d'importation classique, il y a 1 mM d'ATP. Ceci indique que ce traitement a permis de réduire la quantité d'ATP d'un facteur 1000. Dans le cas des tests avec des mitochondries épuisées en ATP, la quantité d'ATP résiduel n'a pas été estimée faute de matériel. Mais l'effet du traitement peut être considéré comme similaire à celui d'élimination de l'ATP extérieur.

Les effets obtenus lors de ces tests de carence en ATP sont donc bien dus à un manque en ATP lors du test d'importation. Mais dans les deux cas AtCCMH se comporte comme AtTRXo-1. AtCCMH a donc besoin d'ATP à l'extérieur aussi bien qu'à l'intérieur de la mitochondries pour être importée *in vitro*.

2.4.8. Etude du signal d'adressage

L'étude du signal d'adressage a été réalisée en testant l'importation *in vitro* de mutants de délétion d'AtCCMH. Trois mutants ont été construits (Figure r2.14a) :

- pEM11, qui correspond au domaine C-terminal (V104-R159) fusionné à un domaine N-terminal de quarante acides aminés comportant un tag histidine et un espaceur.
- pEM29, qui correspond au domaine transmembranaire et au domaine C-terminal (F81-R159)
- pEM30, qui correspond au domaine N-terminal et au domaine transmembranaire (M1-H108)

Les peptides correspondants à ces trois constructions ont été synthétisés et marqués radioactivement *in vitro* puis utilisés dans des tests d'importation *in vitro* dans des mitochondries isolées de chou-fleur. Ces expériences ont pour but de définir un domaine responsable de l'importation d'AtCCMH dans les mitochondries.

Les résultats obtenus lors de l'importation de ces trois mutants de délétion sont présentés sur la Figure r2.14B. La protéine traduite à partir de la construction pEM11 est utilisée dans des expériences d'import *in vitro* qui résultent dans la détection d'une bande à 11 kDa qui semble importée dans les mitochondries de chou-fleur isolées. En effet, après traitement à la protéinase K, une faible bande radiomarquée est détectée.

	MitoP	Predotar
M1 → R159	0,024	0
Q147 → R159	0,920	0,607

Figure r2.15 : Prédications d'adressage mitochondrial d'AtCCMH.
 Probabilités d'adressage d'AtCCMH aux mitochondries par les logiciels de prédiction :
 protéine entière (M1 → R159) ou domaine C-terminal (R159 → M1)

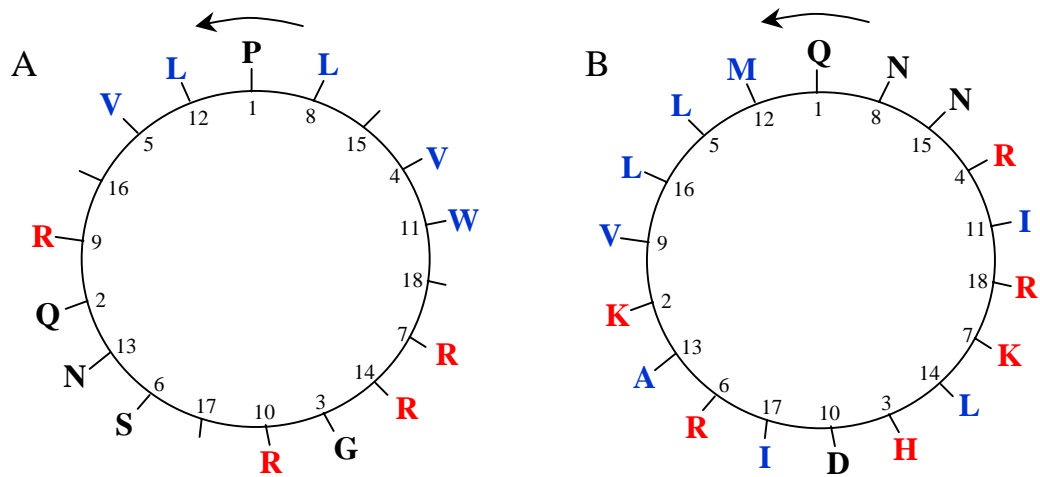


Figure r2.16 : Représentation en hélice
 A : des 14 derniers acides aminés d'AtCCMH (P146-R159).
 B : du domaine situé en C-terminal du domaine hydrophobe (Q86-R123).
 Les acides aminés hydrophobes sont indiqués en bleu, ceux chargés positivement en rouge.
 La flèche indique le sens de l'hélice.

La construction pEM29 permet la traduction *in vitro* d'une version tronquée d'AtCCMH (domaine transmembranaire + domaine C-terminal) de 10 kDa. La migration de cette protéine est perturbée par la grande quantité de globine présente dans l'extrait de réticulocytes utilisé lors de la synthèse *in vitro*. Cette bande à 10 kDa est purifiée avec les mitochondries après importation. Par contre, cette bande est en partie résistante à un traitement à la protéinase K après importation, elle semble donc être importée dans les mitochondries.

La construction permettant la synthèse d'un mutant d'AtCCMH ne possédant pas le domaine C-terminal (pEM30) est traduite *in vitro* et un signal de 12 kDa est détecté. Cette protéine est associée avec les mitochondries après importation mais elle n'est plus détectée après importation suivie d'un traitement à la protéinase K. Elle n'est donc pas importée dans les mitochondries.

Ainsi, le signal d'adressage aux mitochondries d'AtCCMH serait localisée dans la partie C-terminale de la protéine.

2.4.9. Bilan sur l'importation d'AtCCMH

L'importation d'AtCCMH dans les mitochondries est particulière. En effet, AtCCMH n'est pas prédite comme étant une protéine mitochondriale. Aucune maturation n'est détectée après importation. Son importation nécessite un potentiel transmembranaire au niveau de la membrane interne ainsi que de l'ATP, comme pour l'importation d'une protéine possédant une préséquence d'adressage. Par contre, AtCCMH est importée dans des mitochondries prétraitées à la protéinase K, indiquant une importation sans reconnaissance par un récepteur de la membrane externe. Finalement après son importation, AtCCMH est localisée au niveau des membranes mitochondriales.

Si le domaine N-terminal possédait le signal d'adressage mitochondrial, la topologie d'AtCCMH (domaine N-terminal tourné vers l'espace intermembranaire) impliquerait une importation dans la matrice puis une exportation vers l'espace intermembranaire. D'un autre côté, il ne serait pas surprenant que le signal d'adressage d'AtCCMH soit situé dans la partie C-terminale de la protéine. En effet, l'extrémité C-terminale de la séquence d'AtCCMH (Q147 → R159) est reconnue avec une forte probabilité par les logiciels de prédiction d'adressage comme une séquence d'adressage mitochondrial (Figure r2.15). Les derniers acides aminés peuvent être représentés en hélice amphiphile possédant une face hydrophobe et une face chargée positivement (Figure r2.16A), ce qui est la principale caractéristique des

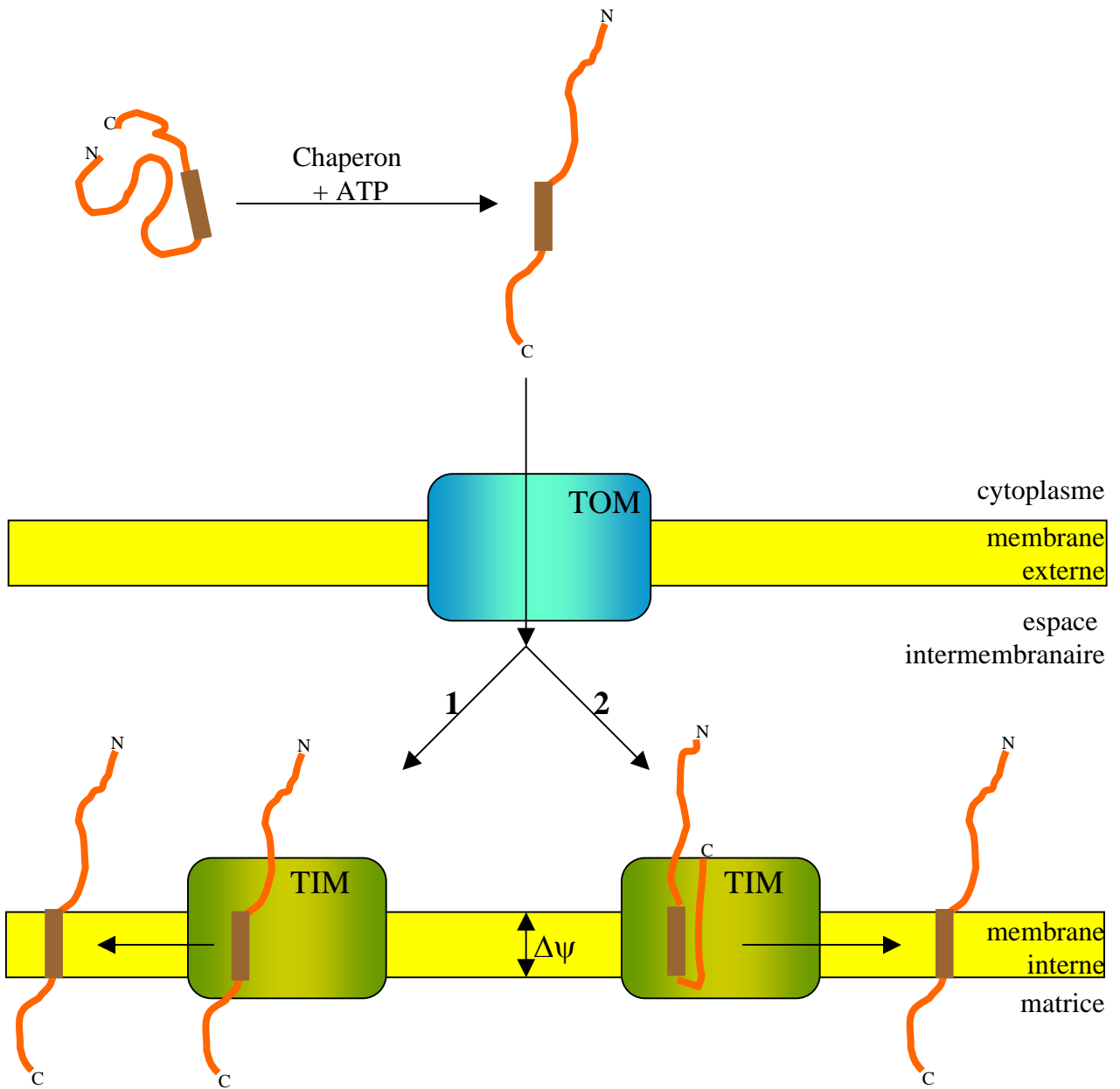


Figure r2.17 : Modèle proposé pour l'importation d'AtCCMH.

1 et 2 présentent les deux hypothèses de passage d'AtCCMH à travers le complexe TIM

$\Delta\psi$: potentiel transmembranaire

préséquences d'adressage mitochondrial. Ainsi l'extrémité C-terminale possède toutes les caractéristiques d'une séquence typique d'adressage aux mitochondries.

L'étude des mutants de délétion a montré que le domaine responsable de l'adressage mitochondrial d'AtCCMH pourrait être localisé au niveau du domaine transmembranaire et du domaine situé en C-terminal de ce domaine hydrophobe. Un tel signal d'adressage a été décrit pour la protéine BSC1 de la membrane mitochondriale interne des levures (Folsch *et al.*, 1996). Le domaine situé en C-terminal du domaine transmembranaire de cette protéine peut se représenter sous la forme d'une hélice amphiphile possédant une face hydrophobe et une face chargée positivement, comme les préséquences d'adressage. Dans le cas d'AtCCMH, la formation d'une telle hélice amphiphile est envisageable (Figure r2.16B). Il est possible qu'AtCCMH suive une voie d'importation proche de celle de BSC1.

L'importation d'AtCCMH pourrait suivre le modèle schématisé sur la Figure r2.17 :

La séquence d'adressage située dans la partie C-terminale d'AtCCMH pourrait servir de séquence de reconnaissance pour le chaperon qui la déstructurerait pour permettre son passage à travers les complexes de translocation. L'importation d'AtCCMH nécessite de l'ATP à l'extérieur des mitochondries, cet ATP pourrait être nécessaire pour le relargage du chaperon. Ensuite AtCCMH pourrait traverser la membrane externe par l'intermédiaire du complexe TOM comme toutes les protéines qui sont importées dans les mitochondries. L'importation d'AtCCMH ne semble pas nécessiter de récepteur. L'implication du complexe TOM devra être vérifiée en prétraitant les mitochondries avant importation avec des anticorps dirigés contre TOM40, la protéine qui forme le pore dans la membrane externe, ainsi ce pore sera bouché et l'importation d'AtCCMH devrait être inhibée. Une fois dans l'espace intermembranaire, AtCCMH se dirigerait vers le complexe TIM23 et s'engagerait dans le pore de ce complexe de translocation. Deux hypothèses peuvent être émises quant à la manière dont AtCCMH s'engagerait dans le pore. Selon une première hypothèse, le domaine C-terminal s'engagerait le premier comme une préséquence d'adressage (attraction électrostatique entre le domaine C-terminal d'AtCCMH chargé positivement et la face matricielle de la membrane interne, chargée négativement). Ceci ne pourrait avoir lieu que s'il y a un potentiel transmembranaire au niveau de la membrane interne. Or, un potentiel transmembranaire est indispensable pour l'importation d'AtCCMH. L'importation serait ensuite bloquée lorsque le domaine transmembranaire serait dans le pore. Dans une deuxième hypothèse, AtCCMH prendrait la même conformation que BCS1 (Folsch *et al.*, 1996), le domaine suivant le domaine transmembranaire se replie en hélice et se colle à l'hélice

transmembranaire. Les deux hélices s'engageraient ensemble dans le pore. L'hélice transmembranaire d'AtCCMH serait bloquée dans le pore et le domaine C-terminal serait "tiré" dans la matrice. Dans ces deux hypothèses, AtCCMH se retrouverait bloquée par son domaine transmembranaire dans le pore du complexe TIM23. Une translation d'AtCCMH dans la membrane interne s'en suivrait. En suivant ce modèle, AtCCMH aurait la topologie déterminée expérimentalement.

Une hypothèse pour la formation de la protéine de 17 kDa lors du traitement avec la protéinase K après importation serait la suivante : TIM23 possède un domaine N-terminal qui fait le lien avec le complexe TOM, ainsi ces deux complexes seraient très proches. Si au moment du traitement avec la protéase, un certain nombre de protéines AtCCMH étaient bloquées au niveau de complexe TIM, en attente de translation dans la membrane, il serait probable qu'une petite partie de la protéine (environ 3 kDa) n'ait pas encore traversé le pore du complexe TOM. Cette partie de la protéine serait accessible pour la protéinase K. Ainsi après importation et traitement à la protéinase, une grande majorité de protéines importées seraient détectées ainsi qu'une petite fraction de protéines radiomarquées délétées de 3 kDa.

3. Caractérisation fonctionnelle d'AtCCMH

La localisation d'AtCCMH au niveau de la membrane interne mitochondriale est analogue à celle des protéines CcmH bactériennes au niveau de la membrane plasmique. Il est fort probable que sa fonction de réduction des apocytochromes de type *c* soit aussi conservée. Une étude fonctionnelle a été réalisée pour tenter de confirmer cette hypothèse. Tout d'abord, un mutant bactérien de CcmH a été complété par AtCCMH. Ensuite les effets d'une mutation dans *AtCCMH* ont été observés *in planta*. Enfin, une étude *in vitro* de propriétés oxydoréductrices d'AtCCMH a été initiée.

3.1. Complémentation fonctionnelle d'un mutant d'*E. coli* Δ CCMH

3.1.1. Principe de l'expérience

Un des meilleurs moyens de connaître la fonction d'une protéine est de montrer que cette protéine est capable de suppléer une de ses homologues dont la fonction est connue : c'est le test de complémentation fonctionnelle. Chez les mitochondries de plantes, la maturation des cytochromes de type *c* suit le système I, aussi utilisé par les α - et γ -protéobactéries. Un des organismes modèles pour l'étude du système I de maturation de cytochrome de type *c* est *E. coli*. Dans le cas d'AtCCMH, nous avons choisi de compléter un mutant *ccmh* d'*E. coli*. De plus le système bactérien possède un avantage, les cytochromes de type *c* ne sont pas indispensables à la croissance des bactéries. Ainsi un mutant n'est léthal que sous certaines conditions.

Le test de complémentation a été réalisé en collaboration avec le laboratoire du professeur L. Thöny-Meyer à l'Institut für Mikrobiologie de l'ETH (Zürich, Suisse) où j'ai effectué un séjour de deux semaines.

Le principe de ces tests de complémentation est de construire un mutant bactérien dont le gène d'intérêt a été délété. Ce mutant est ensuite co-transformé avec un plasmide contenant le gène codant pour la protéine dont on étudie la fonction et un plasmide portant un gène codant pour un cytochrome *c* rapporteur. Les bactéries sont placées en culture anaérobie (mode de vie dans lequel les cytochromes *c* sont exprimés). Puis, sur un extrait périplasmique, une coloration d'hème est réalisée. Cette coloration permet de révéler les hèmes liés de

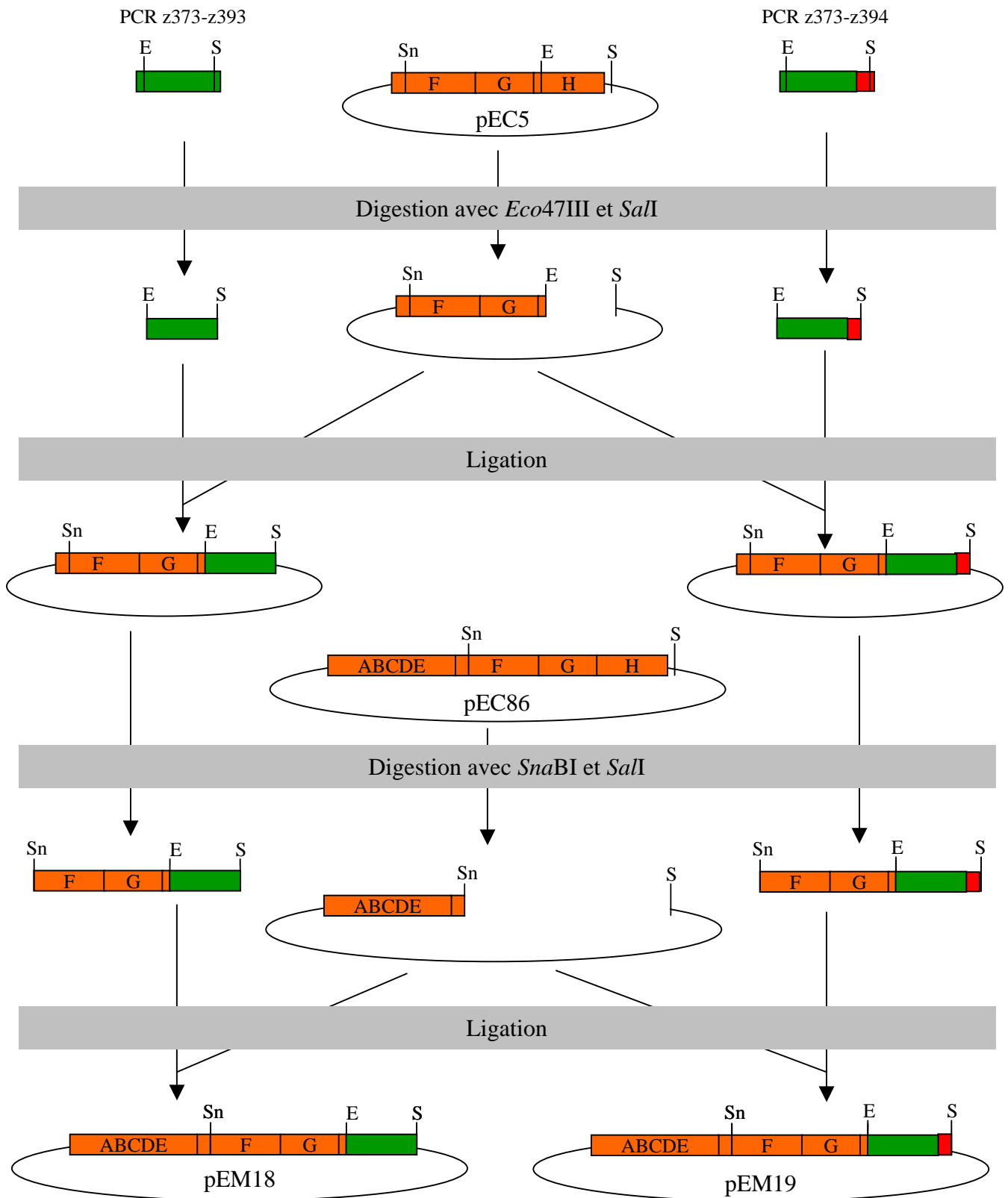


Figure r3.1 : Schéma représentant la stratégie utilisée pour la construction des vecteurs pEM18 et pEM19.

Les sites de restriction utilisés sont : *SnaBI* (Sn), *Eco47III* (E) et *SalI* (S).

Gène *ccm* d'*E. coli*
 AtCCMH
 His-tag

manière covalente sur leur apoprotéine (donc celui du cytochrome *c* rapporteur) grâce à leur activité peroxydase.

Lors de la complémentation d'un mutant d'EcCcmH par AtCCMH, une variante de ce test de complémentation classique a été utilisée. Aucun mutant d'EcCcmH n'étant disponible, un mutant pour l'ensemble des gènes *ccm* (souche EC06 d'*E. coli*) a été utilisé. Cette souche a été transformée avec des plasmides portant l'ensemble des gènes *ccm* d'*E. coli* (pEC86) ou les gènes *EccmA-G* et *AtCCMH* (pEM18 ou pEM19).

3.1.2. Construction des plasmides contenant AtCCMH

L'ensemble des souches et vecteurs ont été fournis par le laboratoire de Zürich. Le vecteur pEC86 est dérivé du vecteur pACYC184 dans lequel a été cloné le fragment BamHI contenant *EcCmA-H*. Ainsi en transformant la souche EC06 (souche Δccm) avec le vecteur pEC86, on reconstitue l'ensemble du génome bactérien. Les clonages dans le pACYC184 se font dans le gène de résistance à la kanamycine, ainsi les gènes clonés sont exprimés constitutivement grâce au promoteur du gène *kan^R*.

EcCcmH possède une extension N-terminale qui est un signal d'adressage au périplasma. Comme AtCCMH ne possède pas cette extension, une fusion a été réalisée entre le peptide d'adressage au périplasma d'EcCcmH et AtCCMH. La fusion entre les deux fragments de gènes a lieu au niveau du site *Eco47III* situé dans la partie 5' d'EcCcmH (+45 par rapport à l'ATG). Une amorce directe contenant une partie de la séquence d'*EcCcmH* (jusqu'au site *Eco47III*) et dix-neuf nucléotides correspondant à *AtCCMH* (z373) a été utilisée pour amplifier *AtCCMH* par PCR (avec comme matrice un plasmide contenant la séquence de l'ADNc d'*AtCCMH*), l'amorce complémentaire contient le codon Stop d'*AtCCMH* et le site *SalI* (z393). Ce produit de PCR est cloné dans les sites *Eco47III* et *SalI* du vecteur pEC5. Ce vecteur pEC5 est aussi un dérivé de pACYC184 dans lequel a été cloné le fragment BamHI contenant la partie 3' d'*EcCcmF*, *EcCcmG* et la partie 5' d'*EcCcmH*. Ce clonage est réalisé dans le vecteur pEC5 car *Eco47III* est unique dans ce vecteur, alors qu'il est multiple dans pEC86. Ainsi, la fusion entre *EcCcmH* et *AtCCMH* est réalisée. La protéine chimérique ainsi formée correspond à EcCcmH (M1-D21) :: AtCCMH (E6-R159). Le fragment *SnaBI-SalI* contenant *AtCCMH* du vecteur pEC5 est cloné dans les sites *SnaBI* et *SalI* du vecteur pEC86. On obtient ainsi le plasmide pEM18.

Une deuxième construction a été réalisée. La seule différence avec pEM18 est qu'AtCCMH possède une étiquette poly-histidine. Pour cela, la matrice utilisée pour la PCR

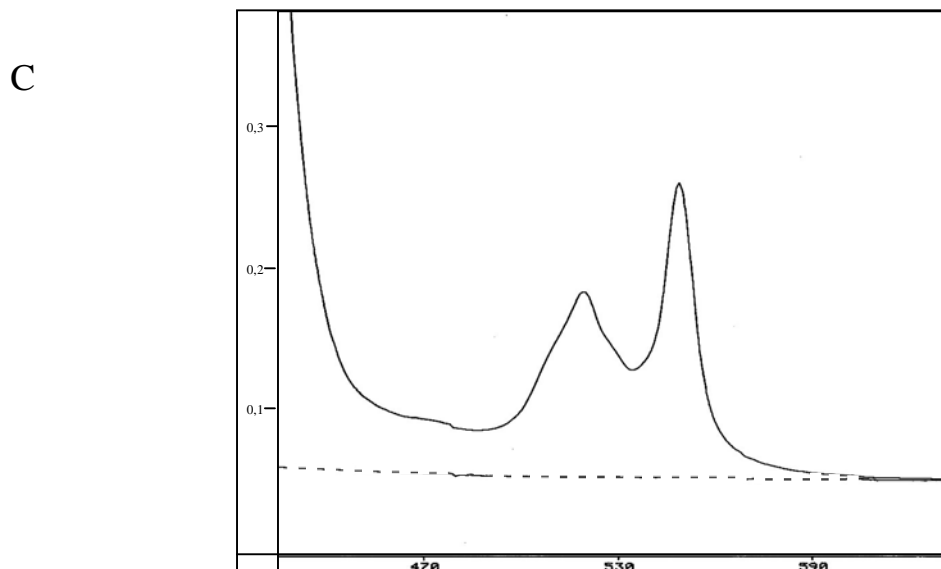
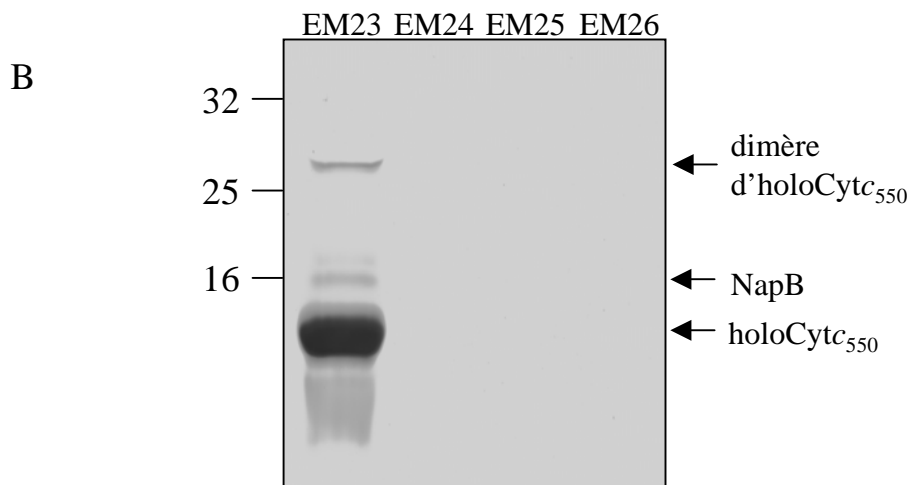
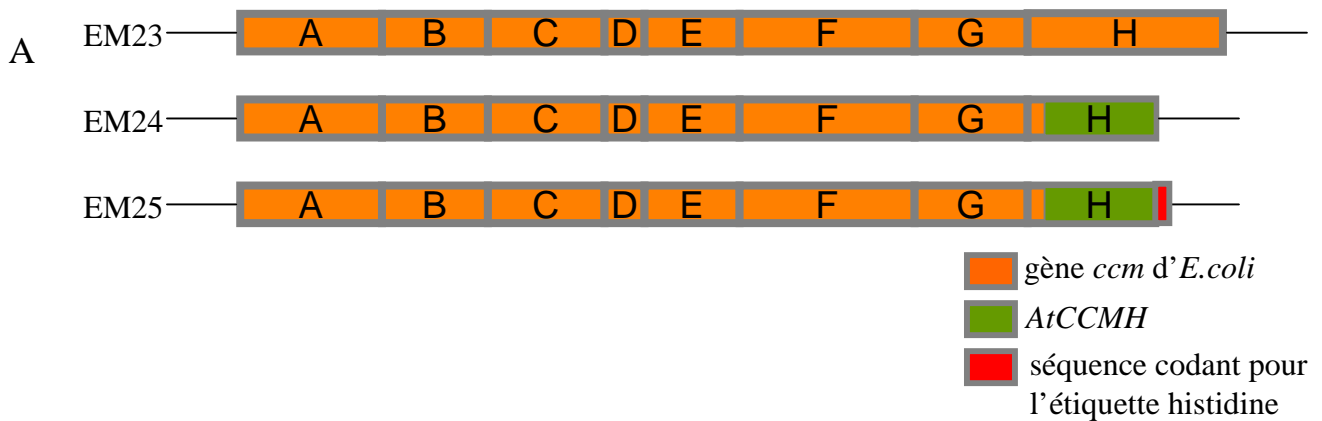


Figure r3.2 : Complémentation fonctionnelle d'un mutant d'*E. coli* $\Delta CcmH$ par *AtCCMH*.

A : Schéma des constructions utilisées

B : Coloration d'hème sur des extraits périplasmiques.

C : spectre d'absorption des extraits périplasmiques. La souche contenant l'opéron *ccm* sauvage donne la courbe en trait plein. Les souches sans opéron *ccm* ou avec l'opéron possédant *AtCCMH* donnent la courbe en pointillés.

Les poids moléculaires sont indiqués en kDa.

permettant d'amplifier *AtCCMH* est un vecteur de type pQE portant la séquence codante d'*AtCCMH* fusionnée à une étiquette poly-histidine. La PCR est réalisée avec une amorce complémentaire spécifique de la séquence codant pour l'étiquette poly-histidine de ce plasmide (z394). Le clonage est réalisé comme pour pEM18, en deux étapes (premier clonage dans pEC5, puis clonage dans pEC86). Ainsi l'on obtient le plasmide pEM19.

La Figure r3.1 schématise la construction des plasmides pEM18 et pEM19.

Ces trois plasmides permettent une expression constitutive de l'ensembles des gènes *EcCcmA-G* et de *EcCcmH* (pEC86), *AtCCMH* (pEM18) ou *AtCCMH-his* (pEM19).

3.1.3. Complémentation

Des bactéries compétentes EC06 ont été transformées par choc thermique avec les différents vecteurs construits et le vecteur pRJ3290 qui porte le gène codant pour le cytochrome *c*₅₅₀ de *B. japonicum* (BjCyt_{c550}). Ce cytochrome *c* est un cytochrome périplasmique soluble. Son expression est régulée par un promoteur inductible par l'arabinose. Quatre souches ont été obtenues (Figure r3.2A) :

EM23 : bactéries EC06 transformées avec pEC86 et pRJ3290, c'est le contrôle positif

EM24 : bactéries EC06 transformées avec pEM18 et pRJ3290

EM25 : bactéries EC06 transformées avec pEM19 et pRJ3290

EM26 : bactéries EC06 transformées avec pACYC184 et pRJ3290, c'est le contrôle négatif, le vecteur pACYC184 étant le vecteur de clonage des gènes *Ccm*.

Les quatre souches ont été mise en culture anaérobie pendant 14 h puis l'expression de BjCyt_{c550} est induite par l'ajout d'arabinose. La culture se poursuit encore pendant 12 h.

Un extrait périplasmique a été préparé en traitant les bactéries avec la polymyxine B qui crée des pores dans la membrane bactérienne externe. Cet extrait doit contenir l'holocytochrome *c*₅₅₀ produit si la complémentation est positive. Deux approches ont été utilisées pour détecter la présence de cet holocytochrome.

Tout d'abord, une coloration d'hème a été réalisée. Cette coloration permet de mettre en évidence l'activité peroxydase d'un hème lié de manière covalente sur une protéine comme c'est le cas pour les cytochromes de type *c*. Les protéines (100 µg) de l'extrait périplasmique sont séparées sur un gel SDS-PAGE puis une coloration d'hème est réalisée. Là où il y a une protéine à activité peroxydase (un cytochrome *c* en l'occurrence), il y a formation d'un précipité verdâtre. Ce précipité est détecté dans l'extrait périplasmique obtenu avec la souche

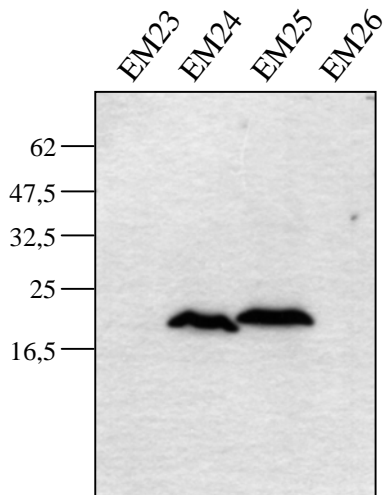


Figure r3.3 : Expression d' AtCCMH *in bacterio*

Immunodétection avec des anticorps anti-AtCCMH sur des fractions totales bactériennes.

EM23 : opéron sauvage d' *E. coli*

EM24 : opéron d' *E. coli* contenant *AtCCMH*

EM25 : opéron d' *E. coli* contenant *AtCCMH::His*

EM26 : aucun opéron

Les poids moléculaires sont indiqués en kDa.

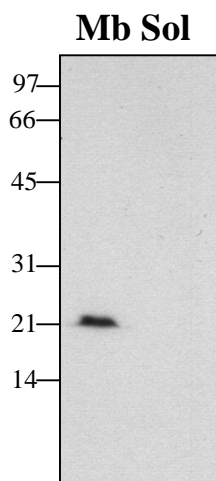


Figure r3.4 : Localisation d' AtCCMH : immunodétection avec des anticorps anti-AtCCMH

Les bactéries ont été lysées à la presse de French puis l'extrait est ultracentrifugé. Le culot contient les membranes (Mb), le surnageant les protéines solubles (Sol).

Les poids moléculaires sont indiqués en kDa.

EM23, le témoin positif (Figure r3.2B). Il y a production d'une grande quantité d'holo-cytochrome c_{550} . Un autre cytochrome c endogène est détecté, NapB. Aucune activité peroxydase n'est détectée dans les extraits périplasmiques obtenus à partir des souches EM24 et EM25 comme pour EM26 qui est le témoin négatif. Ceci indique qu'il n'y a pas de formation d'holo-cytochrome c lorsqu'AtCCMH remplace EcCcmH.

Un autre moyen de détecter les holo-cytochromes c dans l'extrait périplasmique est de réaliser le spectre d'absorption de l'extrait périplasmique. Ce spectre est réalisé entre 450 et 600 nm. Avec l'extrait périplasmique d'EM23, un pic est détecté à 550 nm (Figure r3.2C), c'est le pic caractéristique de l'holo-cytochrome c_{550} , indiquant la présence de cet holo-cytochrome dans l'extrait périplasmique et donc une complémentation positive. Aucun pic à 550 nm n'est détecté dans les extraits périplasmiques issus des cultures de EM24, EM25 ou EM26.

Ces deux résultats indiquent qu'AtCCMH est incapable de compléter une déficience en EcCcmH.

3.1.4. Hypothèses permettant d'expliquer ce résultat

Plusieurs hypothèses permettent d'expliquer l'absence de complémentation du mutant Δ EcCcmH par AtCCMH. Ces différentes hypothèses ont été testées.

AtCCMH n'est pas exprimé

Pour tester si AtCCMH était exprimé correctement dans nos constructions, des extraits protéiques bactériens totaux ont été sondés avec les anticorps anti-AtCCMH lors d'une expérience d'immunodétection. AtCCMH est bien détectée dans EM24 et EM25 (Figure r3.3). Les constructions réalisées permettent donc bien l'expression d'AtCCMH.

AtCCMH n'est pas localisée dans la membrane

Des fractions solubles et membranaires ont été obtenues après éclatement de bactéries (souche EM24) à la French press et centrifugation. Une immunodétection a été réalisée sur ces fractions avec les anticorps anti-AtCCMH. AtCCMH n'est détectée que dans la fraction membranaire (Figure r3.4).

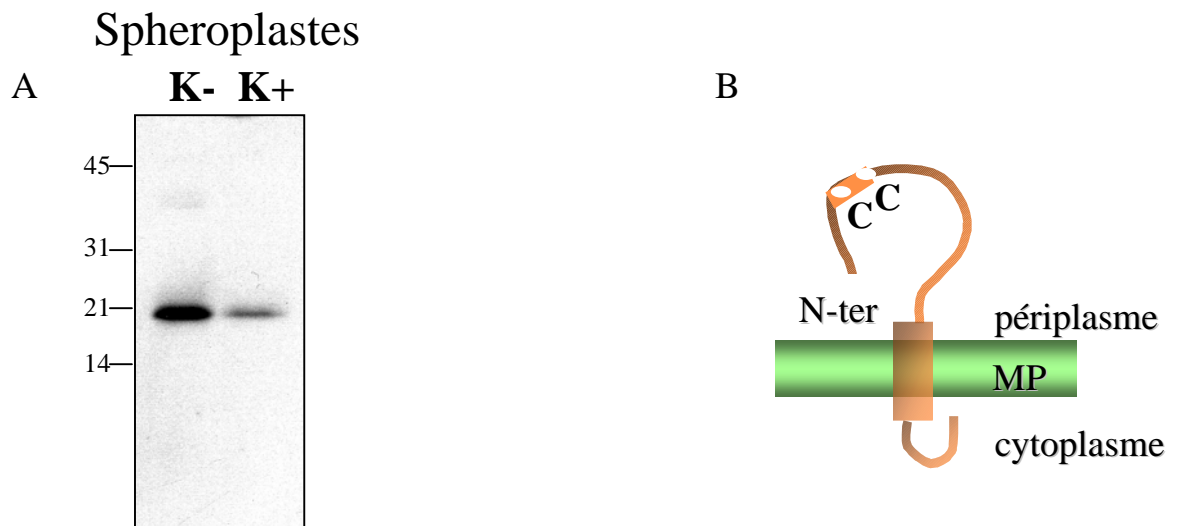


Figure r3.5 : Topologie d'AtCCMH.

Des sphéroplastes sont préparés par choc osmotique puis une fraction est traitée à la protéinase K (K+), une fraction n'est pas traitée (K-). A : Immunodétection avec les anticorps anti-AtCCMH. B : Modèle de l'insertion d'AtCCMH dans la membrane plasmique bactérienne (MP) lors du test de complémentation.

Les poids moléculaires sont indiqués en kDa.

AtCCMH est mal orientée dans la membrane

Des sphéroplastes, bactéries gonflées et dépourvues de membrane externe, ont été préparés en faisant subir un choc osmotique aux bactéries (souche EM24) et en les traitant au lysozyme qui dégrade la paroi bactérienne. Une partie des sphéroplastes a été traitée à la protéinase K pour dégrader les fragments de protéine orientés dans le périplasma. Après un tel traitement, le signal correspondant à AtCCMH décroît fortement (Figure r3.5), indiquant que le domaine N-terminal de la protéine est localisé dans le périplasma (les anticorps anti-AtCCMH ne reconnaissent que ce domaine N-terminal). Une partie des protéines AtCCMH produites par la bactérie est donc bien intégrée dans la membrane avec une topologie correspondant à celle d'EcCcmH.

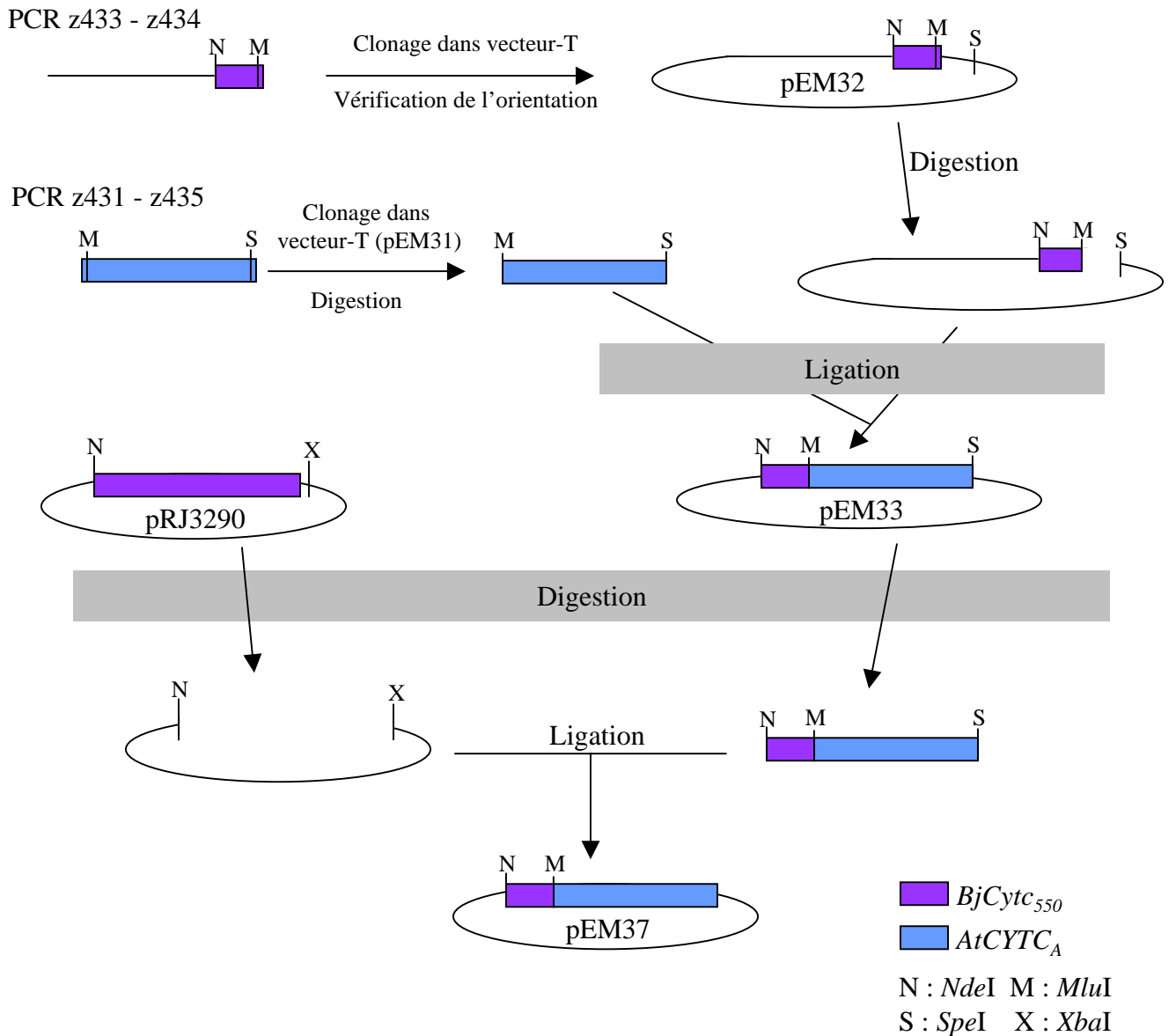
AtCCMH n'interagit pas avec EcCcmF

Chez les bactéries, des expériences de co-immunoprécipitation ont montré que CcmH interagissait avec CcmF (Ren *et al.*, 2002). La complémentation du mutant de délétion d'EcCcmH par AtCCMH n'est peut-être pas réalisable car AtCCMH n'est pas capable d'interagir avec EcCcmF. Pour tester cela, une co-immunoprécipitation avec des anticorps anti-EcCcmF a été réalisée sur un extrait membranaire bactérien (souche EM25). Les membranes sont solubilisées avec du n-dodécylmaltoside puis incubées avec les anticorps anti-EcCcmF. Les complexes antigènes-anticorps formés sont précipités avec de la protéine-A-Sepharose puis sédimentés par centrifugation. Ces complexes sont dissociés lors de l'ajout du tampon de charge (contenant du DTT) avant de séparer les protéines sur gel SDS-PAGE. Une immunodétection est réalisée avec des anticorps anti-Histag. AtCCMH est détectée (Figure r3.6), elle est donc co-immunoprécipitée avec les anticorps anti-EcCcmF. Lors du test de complémentation, AtCCMH interagit avec EcCcmF. Mais cette expérience ne permet pas de définir si cette interaction est similaire à celle entre EcCcmF et EcCcmH. En effet, il est envisageable qu'AtCCMH interagisse avec EcCcmF mais soit incapable de réduire l'apocytochrome car son repliement l'éloignerait trop de son site d'activité.

AtCCMH est incapable de reconnaître BjCyt_{c550}

Le rôle des protéines CcmH est de réduire les cystéines des apocytochromes *c* (Fabianek *et al.*, 1999). Ceci implique une reconnaissance entre ces deux protéines. Il n'y a que 25% d'identité entre AtCCMH et son homologue chez *B. japonicum* (CycL). Il est

A



B

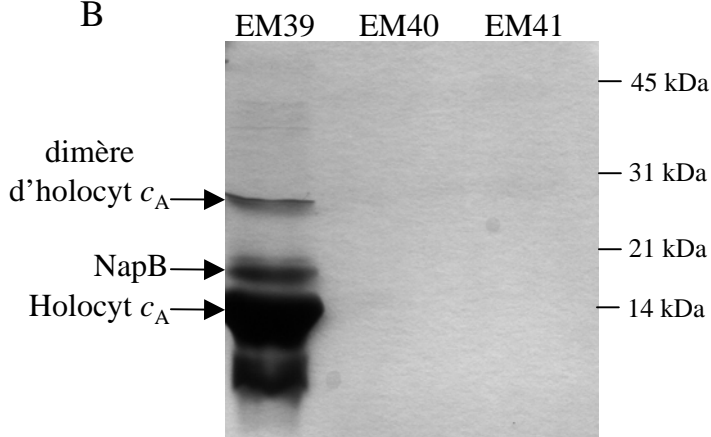


Figure r3.7 : Test de complémentation avec *AtCYTC_A* comme rapporteur.

A : Schéma du clonage d'*AtCYTC_A*.

B : Coloration d'hème des extraits périplasmiques correspondants à :

- EM39 (témoin positif EC06/pEM37/pEC86) : opéron *ccm* d'*E. coli*

- EM40 (témoin négatif EC06/pEM37/pACYC184) : pas d'opéron *ccm*

- EM41 (EC06/pEM37/pEM18) : opéron *ccm* d'*E. coli* contenant *AtCCMH*

possible qu'AtCCMH soit incapable de reconnaître BjCyt_{c550} comme un cytochrome *c*, alors elle sera incapable de la réduire, la complémentation sera impossible. Un autre gène rapporteur a été utilisé lors de la complémentation fonctionnelle du mutant d'EcCcmH par AtCCMH. Ce gène rapporteur est *AtCytC_A*, un des deux gènes d'*A. thaliana* codant pour le cytochrome *c* mitochondrial. Si AtCCMH est bien impliquée dans la maturation des cytochrome *c* mitochondriaux, AtCYTC_A est une de ses cibles.

AtCYTC_A est une protéine de l'espace inter-membranaire mitochondrial ne possédant aucune extension N-terminale susceptible d'être une séquence d'adressage mitochondrial. Pour l'utiliser lors du test de complémentation, il a fallu lui rajouter une séquence d'adressage périplasmique, le peptide d'adressage de BjCyt_{c550}. Cette construction a été réalisée dans le plasmide pRJ3290. Ce plasmide porte le gène *BjCyt_{c550}*, sites *NdeI* (contenant le codon ATG) et *SalI*, sous le contrôle d'un promoteur inductible par l'arabinose. La fusion entre *BjCyt_{c550}* et *AtCYTC_A* est réalisée au niveau d'un site *MluI* qui est rajouté à chaque fragment de gène (Figure r3.7A). La protéine chimérique résultant est BjCyt_{c550} (M1-S19)-TR (site *MluI*)-AtCYTC_A (A2-K114).

Une PCR est réalisée, en utilisant pRJ3290 comme matrice, pour amplifier la séquence codant pour le signal d'adressage périplasmique (amorce directe z433 s'hybridant sur pRJ3290 460 nucléotides devant le site *NdeI* ; amorce complémentaire z434 s'hybridant sur pRJ3290 60 nucléotides après le site *NdeI*, cette amorce contient le site *MluI*). Le produit de cette PCR est cloné dans un vecteur pSK-T. L'orientation de l'insert est vérifiée par séquençage. Un clone possédant le site *SpeI* de la cassette de clonage du pSK-T en aval du site *MluI* est sélectionné et appelé pEM32.

D'un autre côté, une PCR est réalisée en utilisant comme matrice le clone pNG29 (clone construit par Dr. N. Rayapuram), comme amorce directe z431 (remplace l'ATG d'AtCYTC_A par le site *MluI*) et comme amorce complémentaire z435 (ajoute le site *SpeI* après le codon Stop d'AtCYTC_A). Le produit de cette PCR est cloné dans un vecteur pSK-T et séquencé. Le clone obtenu est appelé pEM31.

Le fragment *MluI-SpeI* de pEM31 est cloné dans les sites *MluI* et *SpeI* de pEM32, on obtient le plasmide pEM33. La fusion entre *BjCyt_{c550}* et *AtCYTC_A* est ainsi réalisée au niveau du site *MluI*. Enfin, pEM33 est digéré par *NdeI* et *SpeI* et le fragment correspondant à la séquence codant pour la protéine chimérique est cloné dans le vecteur pRJ3290 digéré par *NdeI* et *XbaI* (les coupures par *SpeI* et *XbaI* donnent des extrémités cohésives. Après ligation, les sites sont perdus). On obtient ainsi le vecteur pEM37 qui possède le gène codant pour le

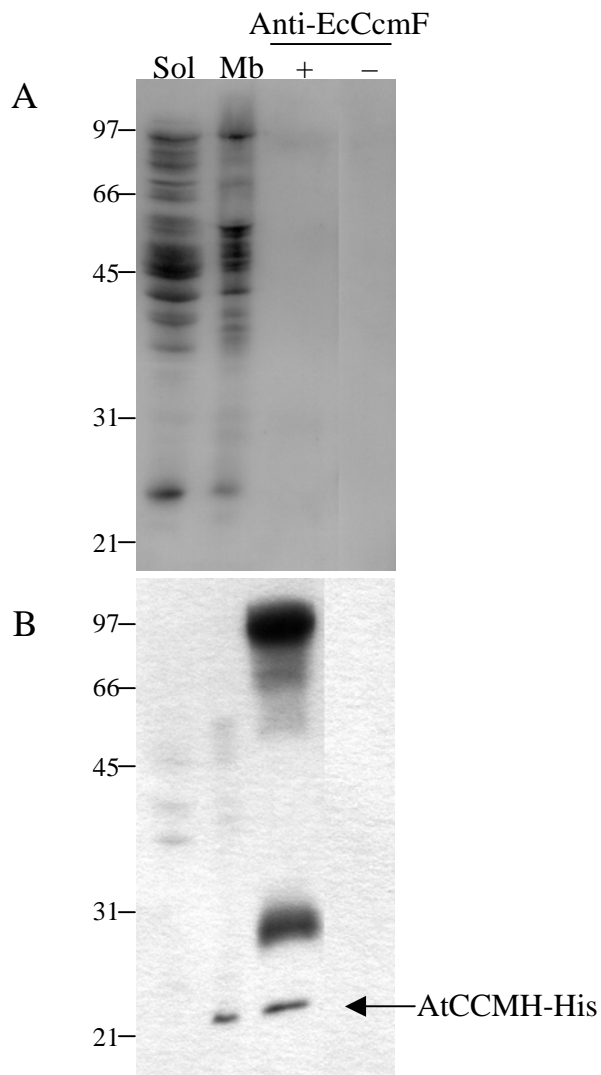


Figure r3.6 : Co-immunoprécipitation d'AtCCMH avec EcCcmF.

A : Coloration au bleu de Coomassie

B : Immunodétection avec les anticorps anti-Histag

L'immunoprécipitation est réalisée avec des anticorps anti-EcCcmF sur un extrait de membrane d'*E. coli* (souche EM25 qui contient la version d'AtCCMH contenant une queue poly-histidine).

Sol : fraction soluble

Mb : fraction membranaire

Les poids moléculaires sont indiqués en kDa.

cytochrome c_A d'*A. thaliana* possédant le peptide d'adressage au périplasme de BjCyt_{c550} sous le contrôle du promoteur inductible à l'arabinose.

Ce vecteur pEM37 est utilisé pour transformer par choc thermique la souche EC06. pEM37 est co-transformé avec soit pEC86 (contrôle positif, souche EM39), soit pACYC184 (contrôle négatif, souche EM40), soit pEM18 (souche EM41). Ces trois souches sont mises en culture anaérobie, l'expression du cytochrome *c* rapporteur est induite par ajout d'arabinose à la culture et un extrait périplasmique est préparé. Avec la souche EM39, l'holocytochrome c_A est détecté (Figure r3.7B) par coloration d'hème ou par un spectre d'absorption. Par contre avec la souche EM41 comme avec la souche EM40 (le témoin négatif), aucun holocytochrome *c* n'est détecté. Ceci indique qu'AtCCMH est incapable de compléter l'absence d'EcCcmH et que cette déficience n'est pas due à un défaut de reconnaissance du cytochrome *c* rapporteur.

AtCCMH ne peut pas être réduit par EcCcmG

Lors de la maturation des cytochromes *c* bactériens, CcmH transfère les électrons de CcmG vers l'apocytochrome. L'incapacité d'AtCCMH à remplacer EcCcmH lors du test de complémentation peut s'expliquer par le fait qu'AtCCMH ne peut pas être réduit par EcCcmG. A l'heure actuelle (juin 2004), aucun homologue de CcmG n'a été identifié chez les plantes. Aucune donnée n'est disponible sur la manière dont AtCCMH est réduit *in planta*. Si AtCCMH était réduit par un système ne faisant pas intervenir d'homologue de CcmG, elle ne pourrait sûrement pas être réduite *in bacterio* lors du test de complémentation. Pour tester cette éventualité, EcCcmG a été surexprimée et purifiée (construction réalisée dans le laboratoire de L. Thöny-Meyer (Zürich, Suisse)). Cette protéine a été testée dans un test de réduction *in vitro* du motif RCXXC d'AtCCMH marqué au DTNB (Figure r3.8). EcCcmG est capable de réduire AtCCMH mais cette réaction n'est pas très efficace (45% d'AtCCMH sont réduits par EcCcmG alors que 95% sont réduits par TRX-h2). EcCcmG possède une fonction de réduction spécifique, il n'est donc pas surprenant qu'elle soit moins efficace dans la réduction d'AtCCMH qu'une thiorédoxine possédant un spectre de cible large comme TRX-h2 par exemple. Pour l'instant aucune homologue de CcmG n'a été identifiée dans les mitochondries de plantes. La protéine CCMG de plante, si elle existe, pourrait être peu homologue aux protéines CcmG bactériennes. Ceci expliquerait la faible efficacité de réduction d'AtCCMH par EcCcmG.

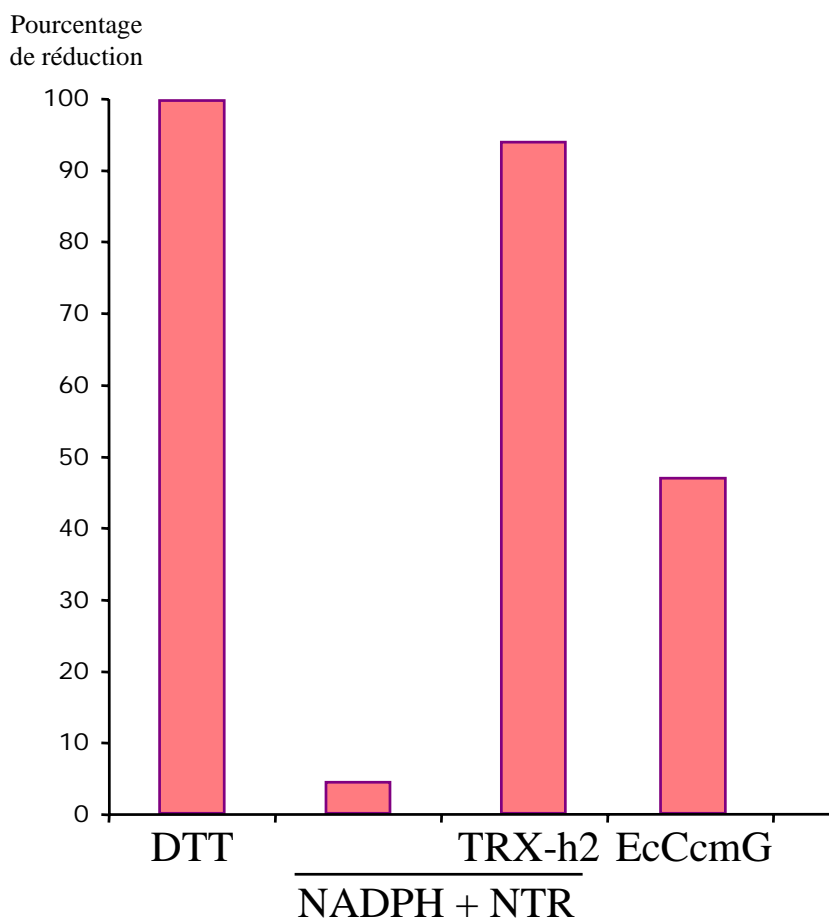


Figure r3.8 : Réduction d' AtCCMH par EcCcmG

Le peptide N-terminal d' AtCCMH a été réduit au DTT puis les thiols du site RCXXC ont été marqués au DTNB. Le peptide marqué est ensuite incubé avec différents systèmes réducteurs. La réduction d' AtCCMH est suivie par spectrométrie à 412 nm, longueur d'onde d'absorption du TNB libéré lors de la réduction.

Le DTT permet de déterminer la réduction complète d' AtCCMH. TRX-h2 est un témoin positif, cette thiorédoxine est réduite par le système NADPH/ thiorédoxine réductase (NTR). EcCcmG a été préalablement réduite au DTT puis le DTT a été éliminé.

Autres hypothèses

Une autre hypothèse serait qu'AtCCMH n'est pas impliquée dans la maturation des cytochromes *c*. Cette hypothèse est difficilement envisageable car tous les résultats obtenus vont dans le sens d'un rôle possible d'AtCCMH dans ce mécanisme.

Il existe une divergence entre le système d'*E. coli* et celui d'*A. thaliana*. En effet, EcCcmG ne réduit pas complètement AtCCMH. EcCcmG possède une forte spécificité de substrat et est inactif dans un test de réduction de l'insuline *in vitro*. Le seul rôle connu d'EcCcmG est de réduire EcCcmH. Ainsi AtCCMH possède des caractéristiques qui font qu'elle est reconnue par EcCcmG mais aussi il existe des divergences entre AtCCMH et EcCcmH qui font qu'EcCcmG n'est pas capable de réduire complètement AtCCMH. Comme aucun homologue de CcmG n'est connu dans les mitochondries de plantes, il est envisageable qu'AtCCMH soit réduit par un système n'incluant pas de protéine de type CcmG. Ainsi la voie de réduction de la voie de maturation des cytochromes *c* dans les mitochondries végétales serait différente de celle trouvée chez les autres organismes qui suivent le système I.

Si AtCCMH était réduite par EcCcmG, qu'elle interagissait avec EcCcmF et qu'aucun holo-cytochrome *c* n'était formé, ceci impliquerait un défaut au niveau du transfert des électrons d'AtCCMH sur l'apocytochrome. Chez *A. thaliana*, CcmF est codé par trois gènes mitochondriaux. Les protéines AtCcmF forment un ensemble plus grand qu'EcCcmF (130 kDa contre 70 kDa). Ainsi il est envisageable que la distance entre le site actif d'AtCCMH et sa cible (le motif CXXCH) de l'apocytochrome soit supérieure dans les mitochondries de plantes que chez *E. coli*. AtCCMH posséderait un repliement différent d'EcCcmH et en contexte bactérien, le site actif d'AtCCMH pourrait être trop éloigné de l'apocytochrome pour pouvoir réduire le site de fixation de l'hème.

3.2. Etude d'un mutant d'insertion *AtccmH*

Un des moyens d'accéder à la fonction d'un gène est d'étudier par génétique inverse les effets *in planta* d'une mutation du gène d'intérêt.

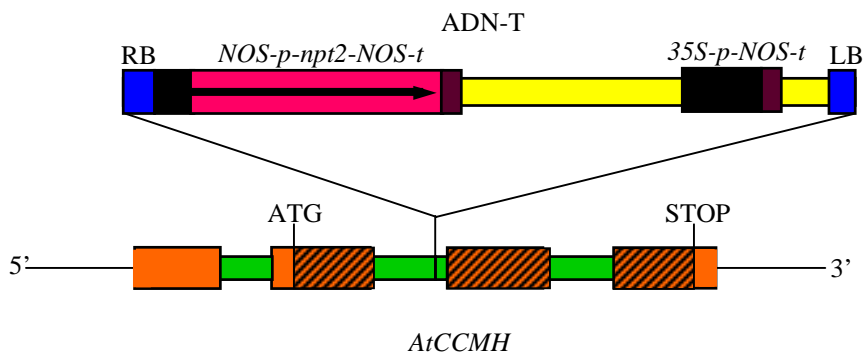
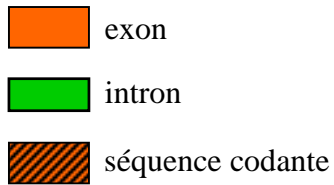


Figure r3.9 : Schéma de l'insertion du T-DNA dans *AtCCMH* (lignée SALK_046872)



3.2.1. Identification d'un mutant

Par recherche dans les banques de données, une séquence FST (Flanking Sequence Tag) correspondant à *AtCCMH* (BH748842) a été identifiée. Cette séquence provient d'un mutant de la banque de mutants d'insertion d'ADN-T construite par le SALK Institute (La Jolla, USA). Pour construire cette banque, des plantes d'*A. thaliana* écotype Columbia ont été transformées avec un ADN-T portant le gène *npt2* qui apporte une résistance à la kanamycine ainsi qu'une unité promoteur 35S-terminateur NOS. Le mutant ainsi identifié (SALK_046872) possède un ADN-T inséré dans le deuxième intron d'*AtCCMH* (Figure r3.9), ceci a pour effet de réduire la protéine produite par *AtCCMH* (AtCCMH de la méthionine 1 à la glutamine 48 puis 13 acides aminés codés par le début de l'intron).

Les séquences bordant l'ADN-T ont été déterminées. Pour cela des amorces situées dans les bordures de l'ADN-T (RB1a et LB1a) ont été utilisées dans des réaction de PCR avec des amorces spécifiques d'*AtCCMH*. Ainsi, une PCR avec z303 et RB1a a permis de réaliser la séquence en amont du site d'insertion et une PCR avec LB1a et z371 a permis d'obtenir la séquence en aval du site d'insertion. Ces deux PCR confirment la position du site d'insertion dans le deuxième intron. Lors de l'insertion de l'ADN-T, il y a eu excision d'un fragment d'ADN génomique de 22 nucléotides.

3.2.2. Analyse des plantes T4 et de leurs descendants

Des graines provenant du mutant SALK_046872 ont été commandées, elles correspondent à la génération T4. Les graines obtenues ont été semées directement sur terre sans pression de sélection. Aucun phénotype visible ne permet de distinguer d'éventuelles plantes hétérozygotes ou homozygotes pour l'insertion des plantes non transformées. La présence de l'ADN-T a été étudiée par PCR et la ségrégation de la mutation par l'analyse de la résistance à la kanamycine. Un phénotype a été recherché au niveau du développement précoce de la plante et des graines en développement dans les siliques.

Analyse PCR

Un génotypage initial a été réalisé pour identifier les plantes possédant un ADN-T. Pour cela, de l'ADN est extrait à partir d'un disque foliaire de 8 mm de diamètre (cf. matériel & méthode 2.2.1). Cet ADN est utilisé comme matrice lors de réactions de PCR en utilisant deux couples d'amorces : z388-z371 qui permet d'amplifier le gène *AtCCMH* sauvage et

LB1a-z371 qui permet une amplification uniquement lorsque l'ADN-T est présent dans *AtCCMH*. Vingt quatre plantes ont été analysées, onze ne possèdent pas d'ADN-T dans *AtCCMH* et sont donc considérées comme sauvage, onze possèdent un ADN-T dans *AtCCMH*, mais possèdent aussi le gène *AtCCMH* sauvage. Aucune d'amplification n'est possible avec l'ADN des deux dernières plantes, cet ADN étant peut-être trop peu abondant ou de mauvaise qualité. Quoiqu'il en soit, ce génotypage à permis de mettre en évidence des plantes hétérozygotes pour l'insertion dans *AtCCMH*. Aucune plante homozygote (*ccmH/ccmH*) pour cette insertion n'est détectée. Le ratio 50% de plantes sauvages, 50% de plantes hétérozygotes provenant d'un lot de graines trop petit (22 plantes ont été analysées) n'est statistiquement pas représentatif. Les graines de quatre plantes hétérozygotes ont été récoltées et ont été utilisées pour les analyses ultérieures.

Analyse de la résistance à la kanamycine

L'ADN-T qui a servi pour la création du mutant porte le gène de résistance à la kanamycine. La ségrégation de ce caractère reflète la ségrégation de l'ADN-T. Pour analyser la ségrégation de la résistance à la kanamycine, des graines issues de plantes hétérozygotes ont été semées *in vitro* sur un milieu contenant de la kanamycine. Les graines résistantes germent et des plantules se développent normalement. Les graines sensibles (ayant un génotype sauvage) germent normalement, les cotylédons s'ouvrent puis blanchissent rapidement et le développement de la plantule s'arrête. Des échantillons statistiques de graines (386 à 723) issues de quatre plantes hétérozygotes (1-4) ont été semés sur un milieu contenant de la kanamycine. Après deux semaines, le nombre de plantes vertes (résistantes) et de plantes blanches (sensibles) est compté. Les résultats sont donnés dans le Tableau r2.

	Nombre total de plantes	Nombre de plantes vertes	Nombre de plantes blanches	Pourcentage de plantes vertes
1	594	384	212	64,4
2	386	250	136	64,8
3	723	478	245	66,1
4	668	436	232	65,3

Tableau r2 : Analyse de la ségrégation de la résistance à la kanamycine

La ségrégation obtenue est donc de 2/3 résistant, 1/3 sensible. Cette analyse révèle qu'il n'y a qu'un seul site d'insertion de l'ADN-T dans le mutant étudié et qu'il n'existe pas de plantes homozygotes pour l'insertion. En effet, dans la cas d'un caractère (Résistance à la kanamycine) issu de parents hétérozygotes, il existe deux allèles différents (R pour résistant / S pour sensible). Lors de la fécondation, la ségrégation de ce caractère sera un quart R/R, un quart S/S et deux quarts R/S. Dans l'hypothèse où le descendant R/R n'est pas viable, il restera un tiers S/S et deux tiers R/S. C'est ce qui se passe dans le cas du mutant d'insertion dans *AtCCMH*. Une mutation homozygote de ce gène (*ccmH/ccmH*) est létale. *AtCCMH* est donc un gène qui code pour une fonction essentielle.

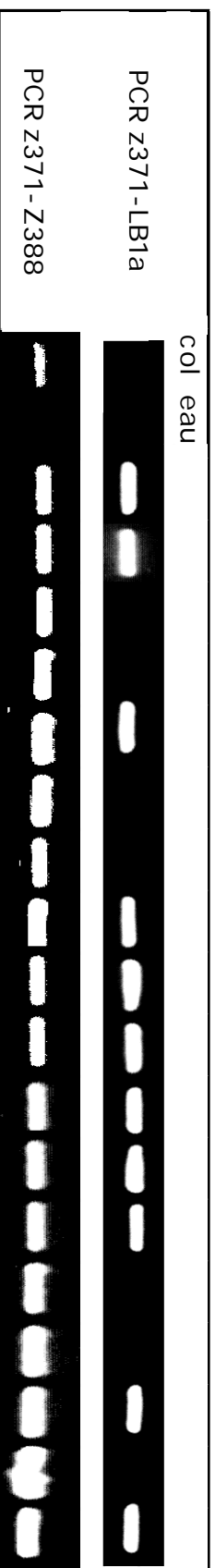
Recherche d'un phénotype

Une analyse phénotypique basée sur l'étude des stades précoces de croissance a été mise au point par Boyes (Boyes *et al.*, 2001). Cette analyse peut permettre d'associer un phénotype à un mutant qui en apparence n'en a pas. Une analyse des stades précoces de croissance a été réalisée pour le mutant d'insertion dans *AtCCMH*. Pour cela des graines issues d'une plante hétérozygote ont été semées *in vitro* sur un milieu sans antibiotique. Ainsi, un mélange de plantules sauvages et hétérozygotes pour l'insertion (*ccmH/CCMH*) est obtenu. Pour synchroniser la germination des différentes graines, la boîte de semis est incubée trois jours à 4°C. Les mesures nécessaires à l'analyse sont réalisées puis le génotype des différentes plantules est déterminé par PCR. Ainsi les mesures sont faites en aveugle, il n'y a pas de biais lié à l'observateur.

Lors de cette analyse, la germination et le développement de la plantule sont observés à la loupe binoculaire. Cinq paramètres sont observés :

- l'émergence de la racicule,
- l'émergence de l'hypocotyle et des cotylédons,
- l'ouverture complète des cotylédons,
- deux feuilles de rosettes ayant une taille supérieure à 1 mm,
- quatre feuilles de rosettes ayant une taille supérieure à 1 mm.

L'unité utilisée est le nombre de jours après le semis. Les observations étant réalisées deux fois par jour, les demi-jours peuvent être comptabilisés. Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure r3.10. Aucune variation significative des paramètres étudiés n'est observée entre les plantules sauvages et les plantules *ccmH/CCMH*. Ceci indique qu'à l'état hétérozygote, la mutation n'interfère pas avec le développement normal de la plante.



B

émergence de la radicule	sauvage	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	moy	ET
	mutant	5	5	5	5	4,5	5	5	5	6	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5,00	0,00
émergence de l'hypocotyle et des cotylédons	sauvage	6	5,5	6	6	5,5	5,5	5,5	5,5	6,5	6	5,5	5,5	6	5,5	5,5	5,5	5,5	5,5	5,64	0,24
	mutant	6	5,5	6	6	5,5	5,5	5,5	5,5	6,5	6	5,5	5,5	6	5,5	5,5	5,5	5,5	5,5	5,73	0,34
cotylédons complètement ouverts	sauvage	11	7	9	7	7	8	7	7	10	8	8	7	8	7	7	7	8	8	7,57	0,79
	mutant	11	7	9	7	7	8	7	7	10	8	8	7	8	7	7	7	8	8	8,00	1,34
2 feuilles de rosettes > 1mm	sauvage	13	12	13	12	12	13	12	12	13	12	12	13	13	12	12	12	12	12	12,29	0,49
	mutant	13	12	13	12	12	13	12	12	13	12	12	13	13	12	12	12	12	12	12,36	0,50
4 feuilles de rosette > 1mm	sauvage	16	16	17	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16,14	0,38
	mutant	16	16	17	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	15,91	0,54

Figure r3.9 : Recherche d'un phénotype lors du développement précoce.

A : PCR sur les plantules en vue de déterminer leur génotype.

B : tableau des observations, l'unité utilisée est le jour.

col : Columbia, Moy : moyenne, ET : écart-type

Observation des siliques

Aucune plante *ccmH/ccmH* n'existe. L'observation des siliques peut permettre de mettre en évidence des graines contenant des embryons *ccmH/ccmH*. Les siliques d'une plante âgée de deux mois ont été ouvertes puis observées à la loupe binoculaire. Trois catégories de siliques ont été observées :

- des siliques jeunes situées juste sous les fleurs au sommet de la hampe florale
- des siliques intermédiaires situées au milieu de la hampe florale.
- des siliques âgées, les plus basses sur la hampes florale

Dans les siliques jeunes, toutes les graines ont le même phénotype et aucune lacune n'est observée. Dans les siliques âgées, une graine sur quatre est rachitique et desséchée. Dans les siliques intermédiaires (siliques résultant d'une fécondation ayant eu lieu environ 7 jours avant les observations), une graine sur quatre est blanche alors que les autres sont vertes (Figure r3.11).

Ainsi, une graine sur quatre commence à se développer puis blanchit et se dessèche alors que les autres graines se développent normalement, elles sont vertes, grossissent puis brunissent lors de la mise en place du tégument. Dans les siliques d'une plante *ccmH/CCMH* une graine sur quatre meurt. Cette mort est vraisemblablement due à la présence de la mutation dans *AtCCMH* sous forme homozygote.

3.2.3. Caractérisation du phénotype

Le phénotype résultant de l'insertion d'un ADN-T dans *AtCCMH* est la présence de graines non-viables (graines blanches) dans les siliques des plantes *ccmH/CCMH*. Ces graines ont été analysées pour déterminer si elles possédaient un embryon *ccmH/ccmH*.

Analyse des graines blanches

Extraction des embryons

Les siliques d'une plante *ccmH/CCMH* possèdent un quart de graines blanches. Par dissection des siliques sous loupe binoculaire, des graines blanches et des graines vertes ont été isolées. Les graines blanches sont plus petites que les graines vertes (Figure r3.12). En



Figure r3.11 : Observation des siliques d'une plante *ccmH/CCMH*.
Une graine blanche est indiquée avec une flèche blanche, une graine verte avec une flèche verte.
La barre blanche représente 2 mm.

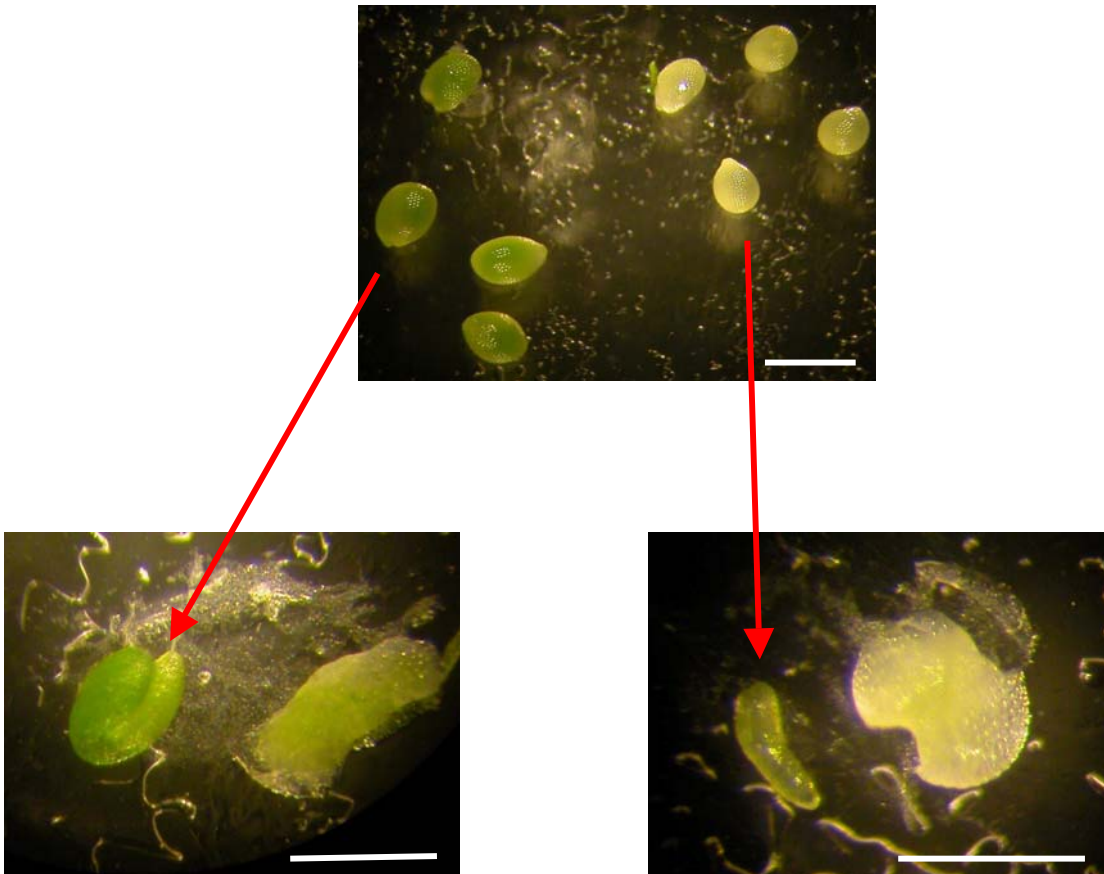


Figure r3.12 : Dissection de graines vertes et blanches issues de la même silique *ccmH/CCMH*.
Les deux types de graines possèdent un embryon.
La barre blanche représente 1 mm.

cassant ces graines (blanches ou vertes), un embryon peut être extrait. Les embryons extraits de graines vertes sont verts alors que les embryons issus de graines blanches sont décolorés et plus petits que les embryons verts.

Détermination du génotype des embryons

Les embryons verts et décolorés ont été analysés par PCR. Comme il n'a pas été possible de réaliser des PCR à partir d'un embryon unique, plusieurs embryons ont été extraits et regroupés et leur ADN extrait. Trois groupes d'embryons ont été créés, un groupe contenant une trentaine d'embryons décolorés, un groupe contenant une trentaine d'embryons verts et un groupe contenant une vingtaine d'embryons provenant de siliques d'une plante d'*A. thaliana* écotype Columbia. Pour réaliser le génotypage, les mêmes couples d'amorces que ceux utilisés lors de l'analyse des plantes ont été utilisés (z388-z371 pour amplifier *AtCCMH* sauvage, LB1a-z371 pour détecter la présence de l'ADN-T dans *AtCCMH*). Pour les embryons issus d'une plante Columbia, le gène *AtCCMH* sauvage est détecté alors que la présence de l'ADN-T dans *AtCCMH* ne l'est pas (Figure r3-13). Dans les embryons verts qui sont soit *CCMH/CCMH*, soit *ccmH/CCMH*, le gène sauvage et le gène interrompu par l'ADN-T sont détectés. Il est impossible d'amplifier le gène sauvage à partir de l'ADN issu des embryons décolorés. Par contre, l'ADN-T est détecté. Ces embryons sont donc homozygotes pour l'insertion (*ccmH/ccmH*). Un contrôle positif de chaque PCR a été réalisé avec de l'ADN issu d'une plante *ccmH/CCMH*. Un contrôle positif de la présence d'ADN dans chaque extrait a été réalisé en amplifiant le gène codant pour la tubuline.

Ces résultats démontrent que des embryons décolorés sont des embryons *ccmH/ccmH* et qu'ils ne sont pas viables. *AtCCMH* possède donc une fonction indispensable à la formation d'une graine viable.

Observation des embryons en microscopie

Des observations au microscope ont été réalisées pour étudier les embryons *ccmH/ccmH*. Le stade d'arrêt du développement de l'embryon a été observé par microscopie optique. Afin de déterminer si l'absence d'*AtCCMH* avait une incidence sur la structure des mitochondries, la structure intracellulaire des embryons a été observé par microscopie électronique.

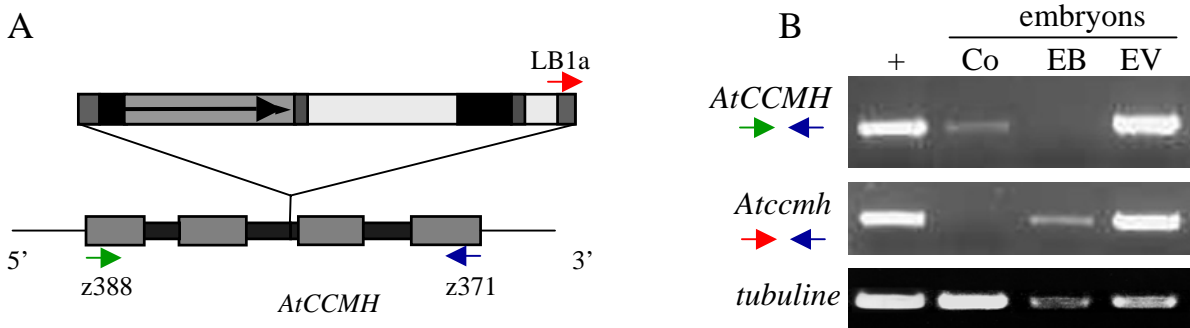


Figure r3.13 : Génotypage des embryons par PCR.

Des embryons issus de graines blanches (EB) ou de graines vertes (EV) ont été regroupés et leur ADN extrait. Puis des PCR ont été réalisées pour mettre en évidence la présence d'*AtCCMH* et/ou de l'ADN-T dans *AtCCMH* (*Atccmh*).

Co : ADN extrait d'embryons issus d'une silique d'une plante Columbia non transformée.

+ : ADN extrait à partir d'une feuille d'une plante hétérozygote (contrôle positif des PCR).

Microscopie optique

Des graines, blanches et vertes, ont été extraites d'une silique. Après fixation dans du glutaraldéhyde, elles sont décolorées dans la solution de Hoyer (Meinke, 1994). Ainsi, les tissus deviennent transparents et l'observation des embryons est possible par transparence sans casser la graine. Dans le cas d'une graine verte, on observe un embryon mature en fer à cheval occupant tout l'espace disponible dans la graine (Figure r3.14A). Par contre, l'observation des graines blanches décolorées (Figure r3.14B) montre un embryon au stade cœur ou au stade torpille. Une graine possédait un embryon à un stade torpille avancé mais aucun embryon mature n'a été détecté dans les graines blanches. La mutation *ccmH/ccmH* a pour conséquence un fort retard de croissance embryonnaire. Les observations des graines blanches indiquent que l'arrêt de la croissance a lieu vraisemblablement après le stade torpille. Les embryons au stade cœur observés n'avaient peut-être pas encore stoppé leur croissance.

Ces observations sont relativement surprenantes. On pouvait s'attendre à des graines ne développant pas d'embryons. Ainsi, le fait que des embryons *ccmH/ccmH* existent indique que la mutation n'est pas gamétophytique-létale. Dans l'hypothèse où *AtCCMH* soit bien impliquée dans la biogenèse des cytochromes de type *c*, une absence d'*AtCCMH* entraînerait une carence en cytochromes de type *c* et donc un probable arrêt de la respiration mitochondriale. Les mitochondries des embryons *ccmH/ccmH* proviennent du gamète femelle. En effet, lors de la fécondation seuls les noyaux du grain de pollen (gamète male) pénètrent dans l'ovule (gamète femelle). Ainsi, l'embryon se développe avec des mitochondries contenant des cytochromes *c* (issus des tissus maternels *ccmH/CCMH*) mais est incapable de produire des cytochromes *c de novo*. Le fait que ces embryons se développent quelque temps donne une indication sur la durée de vie des cytochromes *c* (quelques jours). De plus, l'embryon au stade torpille est formé d'un grand nombre de cellules. Ainsi, les chaînes respiratoires fonctionnelles (contenant des cytochromes *c*) doivent être peu nombreuses par rapport aux chaînes respiratoire néo-formées mais ne contenant pas de cytochromes de type *c* et donc potentiellement inactives. Il semblerait donc que les tissus végétaux puissent survivre avec très peu d'énergie fournie par les mitochondries ou qu'ils soient capables de se développer quelque temps avec une activité respiratoire fortement réduite.

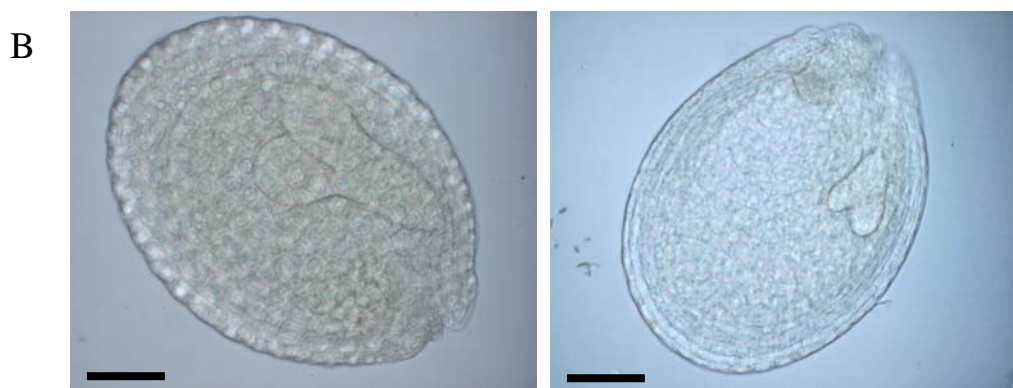


Figure r3.14 : Observation des embryons en microscopie optique par transparence après décoloration avec la solution de Hoyer.

A : une graine verte décolorée.

B : deux graines blanches représentatives décolorées.

La barre représente 200 μm .

Microscopie électronique

Des embryons issus de graines blanches ont été observés au microscope électronique afin de déterminer quel est l'effet de la mutation dans *AtCCMH* au niveau de la structure des mitochondries. Après avoir isolé des embryons issus de graines blanches ou vertes de la même silique, ils ont été fixés au glutaraldéhyde puis inclus dans une résine. Des coupes de 90 µm d'épaisseur ont été observées au microscope électronique. Dans les embryons verts, toutes les structures intracellulaires ont été observées (Figure r3.15A). Des vésicules de réserves lipidiques ont été observées à la périphérie des cellules. Dans les embryons blancs, les cellules sont complètement désorganisées (Figure r3.15B). Plus aucune structure 'normale' n'est observée. Les organites sont détruits, seules les réserves lipidiques sont encore présentes. Ces observations indiquent que le tissu est en train de mourir ou est déjà mort.

Des coupes ont aussi été réalisées au niveau de graines blanches entières dans le but de comparer les tissus *ccmH/CCMH* (l'endosperme) et l'embryon (*ccmH/ccmH*) et de réaliser une détection du cytochrome *c* par immunocytochimie. Malheureusement, ces observations n'ont pu être réalisées, faute de coupe contenant les deux tissus.

3.2.4. Bilan

Il reste à déterminer que le phénotype observé est bien causé par la mutation dans *AtCCMH*. Pour cela, il faut soit identifier un autre allèle mutant indépendant soit compléter le mutant étudié avec le gène *AtCCMH* sauvage et vérifier qu'il y a perte du phénotype mutant. Cette analyse permettrait de confirmer le phénotype.

La destruction cytoplasmique observée en microscopie électronique peut s'interpréter comme le résultat d'un déclenchement du phénomène de mort cellulaire programmée. Une explication de ce qui se passe pourrait être que les embryons se développent normalement jusqu'à ce qu'une carence en cytochrome *c* provoque un dysfonctionnement mitochondrial. Ceci déclencherait la mort cellulaire programmée et donc la destruction des cellules. Pour vérifier cette hypothèse, il faudrait tout d'abord vérifier, en utilisant un colorant vital, que les cellules sont mortes ou en train de mourir. Une mesure de l'activité respiratoire des embryons *ccmH/ccmH* pourrait permettre d'associer le phénotype observé à un dysfonctionnement mitochondrial. Il faudrait aussi déterminer si ces cellules possèdent du cytochrome *c* afin de corréler éventuellement le phénotype observé à une

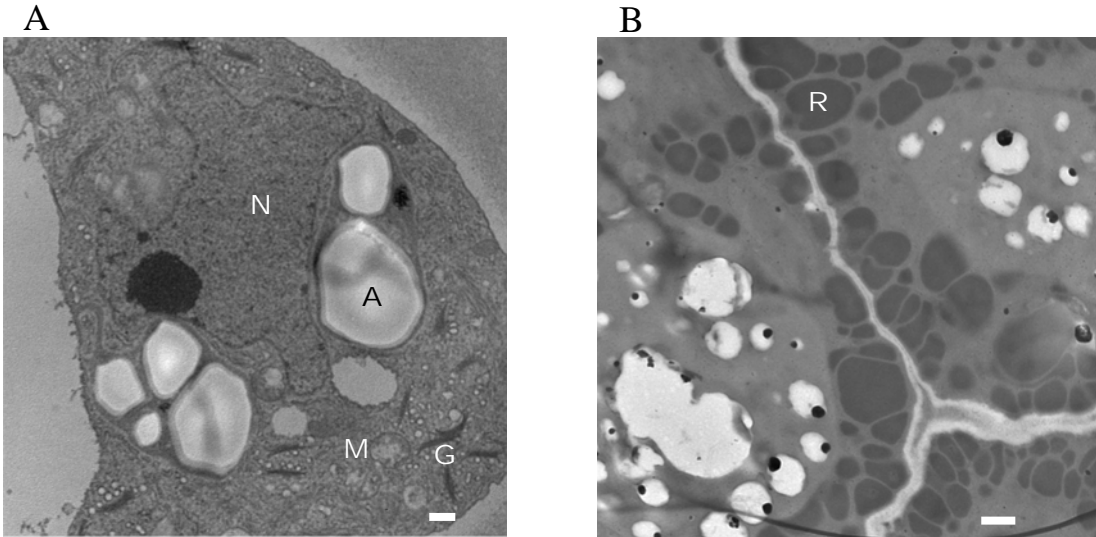


Figure r3.15 : Observation des embryons en microscopie électronique
La barre représente 2 μm .

A : embryon *ccmH/CCMH* ou embryon *CCMH/CCMH*

B : embryon *ccmH/ccmH*

R : réserves lipidiques

N : noyau

A : amyloplaste avec des grains d'amidon

M : mitochondries

G : appareil de Golgi

absence de cytochrome *c*. Ensuite, il faudrait réaliser les observations en microscopie électronique sur des embryons *ccmH/ccmH* plus jeunes pour déterminer si les cellules sont encore vivantes et si elles contiennent du cytochrome *c*.

3.3. Tests d'oxydoréduction *in vitro*

AtCCMH possède un site RCXXC caractéristique d'une fonction d'oxydoréduction. La fonctionnalité de ce motif a été testée *in vitro*. Premièrement, sa capacité à former un pont disulfure a été testée. Ensuite, la réduction du motif par divers systèmes donneurs d'électrons a été testée. Finalement, la fonction de réduction a été testée dans un test de réduction de l'insuline.

Le domaine N-terminal hydrophile contenant le motif RCXXC a été purifié en conditions non dénaturantes et ce peptide purifié a été utilisé lors des réactions *in vitro*. La plupart de ces tests ont été réalisés en collaboration avec le laboratoire de J-P. Jacquot (Université Henry Poincaré-INRA, Nancy, France) qui étudie les thiorédoxines de peuplier.

3.3.1. Titration des thiols d'AtCCMH purifiée

Pour la titration des thiols libres d'AtCCMH purifié, le réactif utilisé est le DTNB (acide dithionitrobenzoïque). Le DTNB est composé de deux molécules de TNB (acide thionitrobenzoïque) reliées par un pont disulfure. En présence d'une fonction thiol, le DTNB est clivé, une molécule de TNB est fixée sur le thiol par un pont disulfure et la deuxième molécule de TNB est libérée dans le milieu. Une coloration jaune apparaît, son intensité est proportionnelle à la quantité de TNB libérée. Ainsi en mesurant par spectrométrie la quantité de TNB libérée, le nombre de thiols libres peut être déterminé.

Le peptide N-terminal d'AtCCMH purifié a été incubé avec du DTT afin de le réduire complètement. Des lavages en utilisant des concentrateurs (cf. matériels & méthodes 2.4.2), ont été réalisés pour éliminer le DTT. Un dosage des thiols libres présents sur ce peptide a été réalisé avec du DTNB (Figure r3.16). La valeur atteinte au plateau correspond à une réduction complète du peptide. Dans un deuxième test, le dosage des thiols est réalisé directement sur le peptide purifié (non réduit au DTT). Lorsque le plateau est atteint tous les thiols libres du peptide ont fixé une molécule de TNB. La comparaison entre les deux valeurs (peptide réduit / peptide non réduit) indique que seulement 30% du peptide est sous sa forme réduite. Le peptide purifié possède donc 70% de thiols oxydés. Le peptide N-terminal d'AtCCMH ne

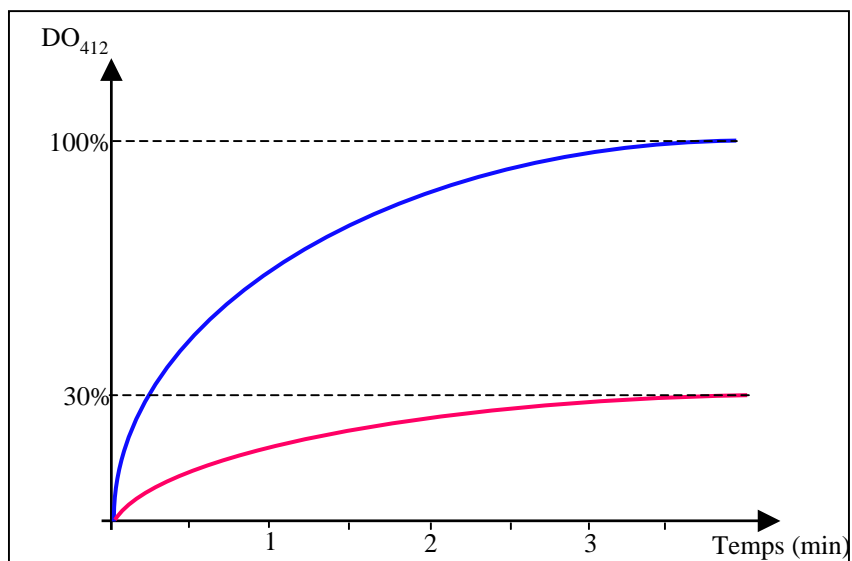


Figure r3.16 : Dosage des thiols du peptide N-terminal d'AtCCMH.

Le dosage des thiols libres du peptide N-terminal d'AtCCMH a été réalisé au DTNB en suivant le relargage de TNB. Le dosage a été réalisé sur le peptide préalablement réduit au DTT (courbe bleue) pour avoir la quantité totale de thiols libres, puis sur le peptide purifié non réduit (courbe rose).

possède que deux cystéines, les deux cystéines du motif RCXXC. La forme oxydée de ces cystéines est donc un pont disulfure.

Cette expérience indique que les cystéines du motif RCXXC d'AtCCMH sont capables de former un pont disulfure intramoléculaire.

3.3.2. Réduction d'AtCCMH

Si le motif RCXXC d'AtCCMH est capable de former un pont disulfure, il doit exister une voie métabolique capable de réduire ce pont disulfure. Les principaux systèmes capables de réduire un pont disulfure sont :

- Les thiorédoxines, qui transfèrent des électrons provenant du NAD(P)H par l'intermédiaire d'une thiorédoxine réductase.
- Les glutarédoxines, qui transfèrent des électrons issus du glutathion, lui-même réduit par une glutathion réductase.

Ces deux systèmes ont été testés *in vitro* pour la réduction du peptide N-terminal d'AtCCMH. Pour cela, les cystéines du peptide ont été marquées au DTNB. Le peptide a été réduit complètement avec un excès de DTT. Le DTT est éliminé par lavages dans des concentrateurs. Le peptide réduit est incubé avec un excès de DNTB pour marquer tous les thiols libres. Le DTNB n'ayant pas réagi et le TNB résiduel sont éliminés par lavage dans des concentrateurs jusqu'à ce que la solution devienne incolore (tout le TNB est éliminé). Le peptide ainsi marqué est utilisé lors des tests de réduction.

Une éventuelle réduction du peptide est suivie par mesure du relargage du TNB en mesurant l'absorbance à 412 nm. Les résultats obtenus sont représentés dans la Figure r3.17 sous forme d'un histogramme. Chaque barre représente le pourcentage de réduction du peptide dans un test. La même quantité de peptide marquée a été utilisée dans chaque test. La réduction complète du peptide avec du DTT en excès a été choisie comme 100% de réduction.

Le premier système testé est le système thiorédoxine/thiorédoxine réductase. Deux thiorédoxines purifiées au laboratoire de Nancy ont été testées : une thiorédoxine cytoplasmique (PtTrxh1) et PtTrxh2, une thiorédoxine mitochondriale de peuplier. Dans un premier temps, le système thiorédoxine réductase (AtNTRB)/ NADPH a été testé seul. Ce système est incapable de réduire AtCCMH. Puis la thiorédoxine PtTrxh1 est ajoutée. Cette thiorédoxine cytoplasmique est capable de réduire le motif RCXXC d'AtCCMH (75% réduit). PtTrxh2, la thiorédoxine mitochondriale, est aussi capable de réduire le domaine N-terminal

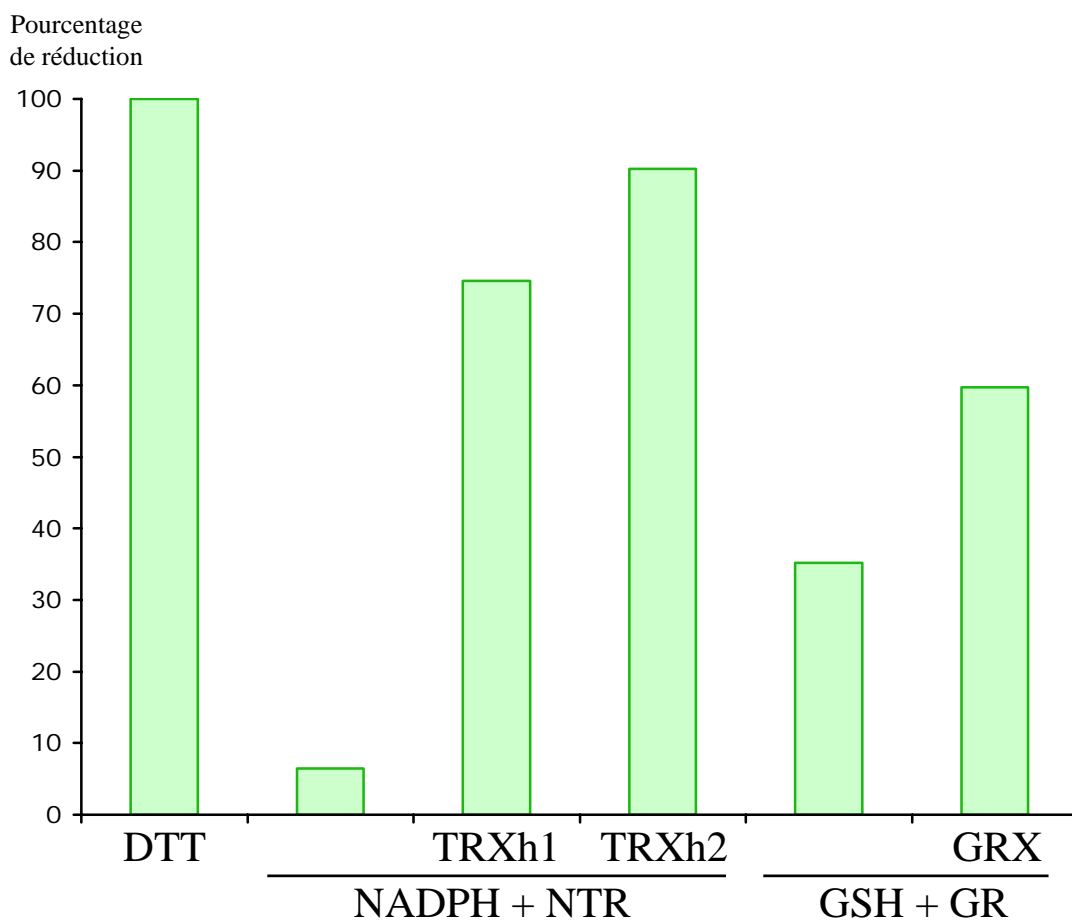


Figure r3.17 : Test de réduction d'AtCCMH.

AtCCMH est marquée avec du DTNB puis le relargage du TNB est suivi à 412 nm. Le test avec le DTT donne 100% de réduction. Deux systèmes donneur d'électrons ont été testés, le système thiorédoxine et le système glutathion.

d'AtCCMH (90% réduit). Le fait que ces deux thiorédoxines soient capables de réduire AtCCMH n'est pas surprenant car les thiorédoxines sont peu spécifiques et sont généralement capables de réduire tous les composés ayant un potentiel redox supérieur au leur qui est de l'ordre de -270 mV (Krause *et al.*, 1991). Dans le cas d'AtCCMH, le potentiel redox doit se situer autour de -200 mV, valeur mesurée pour RcCcl2 (Setterdahl *et al.*, 2000).

Un autre système de réduction a été testé, le système glutarédoxine/glutarédoxine réductase/glutathion. Tout d'abord, du glutathion réduit et de la glutarédoxine réductase ont été incubés avec le peptide marqué au TNB. Ce système est capable de réduire un peu les cystéines du peptide (35% réduites). Lorsqu'une glutarédoxine est ajoutée au mélange réactionnel, la réduction d'AtCCMH augmente mais reste assez faible (environ 60%). Les glutarédoxines ont un potentiel redox plus faible que celui des thiorédoxines (-200 mV contre -270 mV). Ce potentiel est plus proche du potentiel probable d'AtCCMH et ainsi la réduction d'AtCCMH par les glutarédoxines est plus difficile.

Les cystéines du motif RCXXC d'AtCCMH peuvent donc être réduites par différents systèmes de réduction lorsqu'elles sont oxydées. Dans les mitochondries végétales, un système thiorédoxine-thiorédoxine réductase est présent (Laloie *et al.*, 2001). De même, les mitochondries de plantes contiennent du glutathion et une glutathion réductase (Creissen *et al.*, 1995). Ces deux systèmes peuvent potentiellement jouer un rôle dans la réduction d'AtCCMH.

3.3.3. Réduction de l'insuline par AtCCMH

Pour tester une activité de réduction, l'expérience classique est de réduire l'insuline *in vitro* (Holmgren, 1979). L'insuline est une petite protéine de 6 kDa composée de deux chaînes, α et β , reliées entre elles par deux ponts disulfures. Un troisième pont disulfure est présent entre deux cystéines de la chaîne α . Lorsque cette protéine est réduite, ces trois ponts disulfures sont cassés et les deux chaînes séparées. La chaîne β libre précipite. Cette précipitation peut être suivie en mesurant l'absorbance à 650 nm.

La réduction de l'insuline par le DTT est très lente. La vitesse de cette réaction est augmentée d'un facteur 20 si une thiorédoxine est présente dans le milieu réactionnel. Une cinétique de réduction de l'insuline est réalisée à 650 nm, l'ajout de thiorédoxine étant le temps 0 de la cinétique. Le résultat de cette cinétique est représenté sur la Figure r3.18. Une thiorédoxine commerciale d'*E. coli* a été utilisée comme témoin positif. Dans ce cas, après un

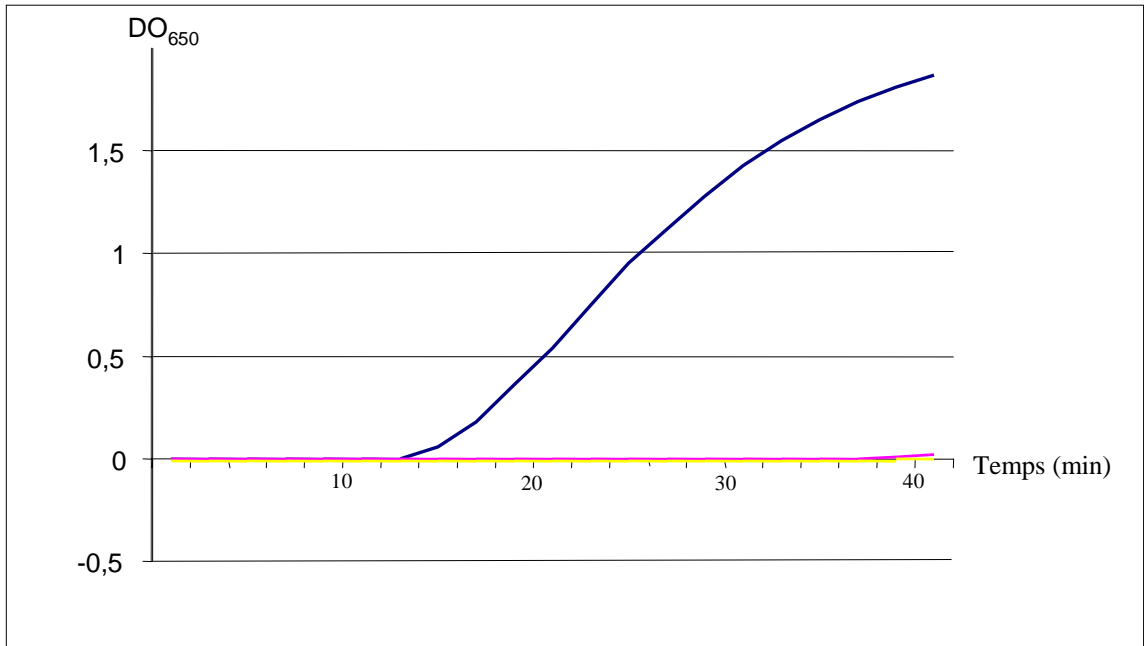


Figure r3.18 : Cinétique de réduction de l'insuline par AtCCMH.

La mesure de la DO_{650} permet de suivre la précipitation de la chaîne β et ainsi la réduction de l'insuline.

Courbe bleue : témoin positif avec la thiorédoxine d'*E. coli*

Courbe jaune : test avec AtCCMH

Courbe rose : témoin négatif sans thiorédoxine

temps de latence de 13 minutes, on observe un relargage de chaîne β , indiquant la réduction de l'insuline par la thiorédoxine. Lorsque le peptide N-terminal d'AtCCMH est rajouté, aucune réduction d'insuline n'est observée. Ce résultat n'est pas surprenant. En effet, les homologues bactériens d'AtCCMH sont inactifs dans des tests de réduction *in vitro*.

3.3.4. Bilan

La fonctionnalité du motif RCXXC d'AtCCMH dans des réactions de réduction a été testée *in vitro*. Les cystéines de ce motif sont capables de former un pont disulfure. Lorsque ces cystéines sont oxydées par du TNB, elle peuvent être réduites par des thiorédoxines ou une glutarédoxine. Cette réduction est plus efficace avec les thiorédoxines. Par contre, ce motif n'est pas capable de réduire l'insuline *in vitro*.

Ces résultats indiquent qu'AtCCMH peut être impliquée dans des réactions d'oxydoréduction. Pour confirmer *in vitro* son rôle dans la maturation des cytochromes de type *c*, il faudrait montrer qu'AtCCMH est capable de réduire un apocytochrome *c*. La purification d'apocytochrome *c* surproduit dans *E. coli* est très difficile car les apocytochromes ne sont pas stables et sont rapidement dégradés. Pour réaliser ce test, il faudrait purifier de l'holocytochrome *c*, détacher l'hème chimiquement, réduire l'apocytochrome obtenu, le marquer au DTNB puis essayer de le réduire avec le peptide N-terminal d'AtCCMH. Une autre alternative serait de synthétiser un peptide correspondant au site actif de l'apocytochrome *c*.

Le système choisi pour tester la réduction d'AtCCMH (réduction de thiols marqués au TNB) ne reflète pas la réalité. En effet, les thiols marqués au TNB ne miment pas un pont disulfure entre deux cystéines. Pour tester la réduction du pont disulfure, il faudrait oxyder le peptide puis réduire le pont disulfure avec une quantité catalytique connue de thiorédoxine et enfin doser les thiols libres présents dans le milieu réactionnel. Ceci signifie qu'il faut avoir de grandes quantités du peptide N-terminal d'AtCCMH or pour l'instant les rendements de purification de ce peptide sont assez faibles. Il faudra donc optimiser les conditions de purification de ce peptide.

Enfin si de grandes quantités de peptides peuvent être purifiées, une mesure du potentiel redox du site RCXXC pourra être réalisée. Ainsi, la valeur obtenue indiquera si AtCCMH est capable de réduire les apocytochromes ($E_m \cong -170$ mV).

4. Interactions entre AtCCMH et d'autres protéines

AtCCMH est la première protéine de la voie de réduction de la maturation des cytochromes de type *c* identifiée chez les plantes. Sa localisation dans la mitochondrie, le fait que le gène *AtCCMH* soit essentiel et les tests d'activité *in vitro* indiquent que cette protéine est bien active dans les mitochondries végétales. Chez les organismes modèle utilisés pour l'étude du système I de maturation des cytochromes de type *c*, les protéines CcmH font partie d'une cascade de réductions. Dans les mitochondries végétales, aucun autre membre d'une telle cascade n'a pu être identifié par homologie de séquences. La recherche de partenaires d'AtCCMH peut conduire à l'identification d'éventuels composants de la voie de réduction mitochondriale.

Le système de maturation des cytochromes de type *c* trouvé dans les mitochondries végétales diffère légèrement du système I bactérien. La protéine CcmF est partagée en deux ou trois peptides, certaines protéines bactériennes n'ont pas encore d'homologues identifiés chez les plantes. Il est envisageable que la maturation des cytochromes de type *c* mitochondriaux fasse intervenir des protéines spécifiques des plantes. Ces protéines pourraient être mises en évidence comme partenaires d'AtCCMH.

Enfin, chez les bactéries, des expériences de co-immunoprécipitation ont montré des interactions entre CcmH et CcmF. Ces interactions sont à mettre en évidence entre les protéines végétales.

La mise en évidence et la recherche de protéines interagissant avec AtCCMH a été entreprise par quatre approches. Tout d'abord par far-western sur des fractions mitochondriales, puis par co-immunoprécipitation avec les anticorps anti-AtCCMH et par pontage chimique *in vitro*. Enfin des électrophorèses sur gels Bleu-Natifs ont été réalisées afin d'identifier un éventuel complexe contenant AtCCMH.

4.1. Far-Western

La technique de far-western est une technique simple pour mettre en évidence des interactions fortes entre deux protéines. Cette technique a été utilisée pour mettre en évidence des interactions éventuelles entre le domaine N-terminal hydrophile d'AtCCMH et d'autres protéines. Un extrait protéique de membranes mitochondriales a été séparé par SDS-PAGE. Les protéines séparées ont été transférées sur une membrane de PVDF puis ont été renaturées.

La membrane est incubée avec le peptide N-terminal d'AtCCMH purifié en conditions natives. L'association entre ce peptide et une autre protéine est révélée par un anticorps reconnaissant l'étiquette poly-histidine du peptide. Lors de ce western, seule la bande correspondant à AtCCMH (à 20 kDa) est détectée (Figure r4.1). Ainsi, dans l'extrait testé, aucune interaction n'est mise en évidence entre le domaine N-terminal d'AtCCMH et une autre protéine.

4.2. Co-immunoprécipitation

Si une interaction entre AtCCMH et une autre protéine existait et si cette interaction était stable, le partenaire d'AtCCMH pourrait être co-immunoprécipité avec des anticorps anti-AtCCMH. Pour tester cette hypothèse, un extrait de membranes mitochondriales (500 µg de protéines) est solubilisé avec un détergent doux et incubé avec les anticorps anti-AtCCMH. Les anticorps sont précipités avec de la protéine A-Sepharose. Les anticorps et les protéines immunoprécipitées sont ensuite séparés sur gel SDS-PAGE. Le gel est coloré avec une solution colloïdale de bleu de Coomassie. Cette coloration permet la détection des chaînes lourdes et légères des anticorps (Figure r4.2). La bande à 20 kDa correspondant à AtCCMH est faiblement détectable au niveau de la bande à 21 kDa du témoin de poids moléculaire. AtCCMH semble donc être une protéine peu abondante dans les mitochondries. Dans les conditions utilisées aucunes protéines interagissant avec AtCCMH ne peuvent être visualisées. De grandes quantités d'extrait mitochondrial et d'anticorps devraient être utilisés lors de ces tests d'immunoprécipitation pour visualiser la protéine par coloration de gel. Cette technique pourrait être utilisée pour vérifier ou mettre en évidence une interaction entre AtCCMH et une protéine dont des anticorps sont disponibles.

4.3. Pontage chimique *in vitro*

Des agents chimiques peuvent être utilisés *in vitro* pour créer des liaisons covalentes entre deux protéines. Un de ces agents, le DTSSP (acide dithiobis(sulfosuccinimidyl-propionique)) a été utilisé pour créer des liaisons covalentes artificielles entre des protéines mitochondriales. Le DTSSP réagit spécifiquement avec les amines primaires, donc avec les extrémités N-terminales des protéines ou les chaînes latérales des lysines. Ce réactif permet de créer une liaison entre deux amines distantes au maximum de 12 Å. Ce composé n'est pas

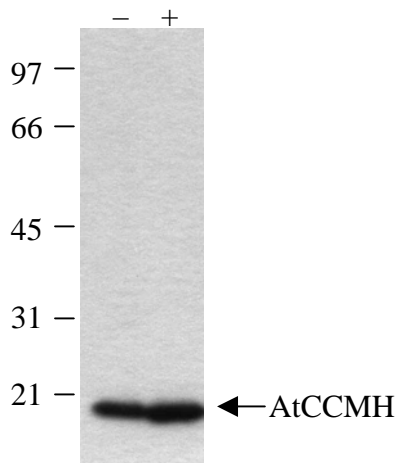
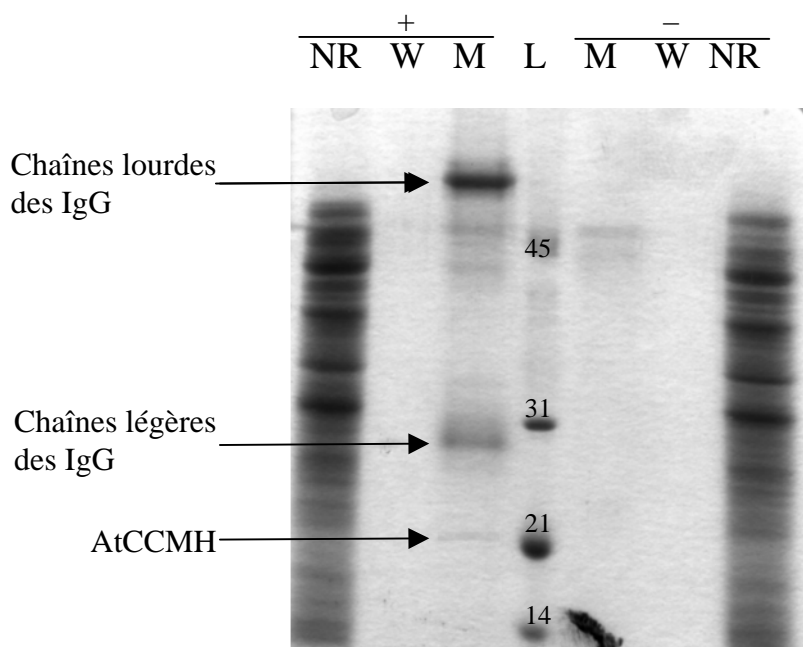


Figure r4.1 : Far-western.

Immunodétection avec des anticorps anti-AtCCMH sur une fraction membranaire mitochondriale renaturée et incubée (+) ou pas (-) avec le domaine N-terminal d'AtCCMH, purifié en conditions natives.

Les poids moléculaires sont indiqués en kDa.



Coloration au bleu colloïdal

Figure r4.2 : Co-immunoprécipitation avec les anticorps anti-AtCCMH.

+ : test avec les anticorps

- : test sans anticorps (témoin négatif).

NR : fraction non retenue

W : dernier lavage

M : fraction précipitée sur la protéine A-Sepharose

L : marqueur de poids moléculaire.

Les poids moléculaires sont indiqués en kDa.

capable de diffuser à travers les membranes, exceptée la membrane externe mitochondriale qui est poreuse pour les petites molécules.

Le DTSSP a tout d'abord été testé sur des mitochondries purifiées. Les mitochondries intactes sont incubées avec le DTSSP puis elles sont chargées sur un gel SDS-PAGE. Après transfert sur membranes de PVDF, les composés contenant AtCCMH sont révélés par immunodétection. Le domaine N-terminal d'AtCCMH possède 7 lysines susceptibles de réagir avec le DTSSP. Le signal à 20 kDa correspondant à AtCCMH est détecté avec ou sans traitement au DTSSP (Figure r4.3A). Dans les fractions ayant été traitées au DTSSP, deux espèces additionnelles sont révélées avec les anticorps anti-AtCCMH à 46 kDa et 90 kDa. Les anticorps anti-AtCCMH reconnaissent des protéines à 92 kDa et 45 kDa dans toutes les fractions. Ces deux protéines sont parfois détectées avec ces anticorps. De plus les espèces à 90 kDa et 46 kDa ne sont pas présentes lorsqu'il n'y a pas eu de traitement au DTSSP. Ce sont donc des espèces formées grâce au couplage chimique. Comme le DTSSP ne peut pas franchir la membrane interne, ces couplages ont eu lieu sur la face externe de cette membrane.

Le pontage chimique a ensuite été réalisé sur une fraction de membrane interne mitochondriale (Figure r4.3B). Avec un tel traitement, un composé de 46 kDa est détecté avec les anticorps anti-AtCCMH. Si les membranes ont été préalablement traitées au carbonate à pH alcalin pour solubiliser les protéines extrinsèques, aucun signal autre que celui correspondant à AtCCMH n'est détecté. Ces résultats indiquent qu'un traitement au DTSSP permet de créer une liaison entre AtCCMH et un constituant extrinsèque de la membrane interne ayant une taille de 26 kDa.

Ainsi AtCCMH est localisé à proximité (12 Å au maximum) d'une protéine extrinsèque ou un groupe de protéines extrinsèques de 26 kDa localisé(e) au niveau de la face externe de la membrane interne. La nature exacte du composé créé par le traitement au DTSSP doit être déterminée. Ce composé est sûrement présent en trop faible quantité car il est faiblement détecté par les anticorps. Il ne pourra donc pas être immunoprécipité en quantité suffisante pour une éventuelle identification par spectrométrie de masse. L'identification de candidats potentiels puis la vérification par immunodétection de la présence de ces candidats dans le même composé qu'AtCCMH semble être la seule méthode permettant de résoudre ce composé. Malheureusement cette stratégie est très lourde. Les candidats potentiels pourraient être un équivalent à CcmG ou au domaine C-terminal d'EcCcmH qui ne sont pas encore identifiés dans le système mitochondrial de plantes. Les apocytochromes *c* sont aussi des candidats potentiels.

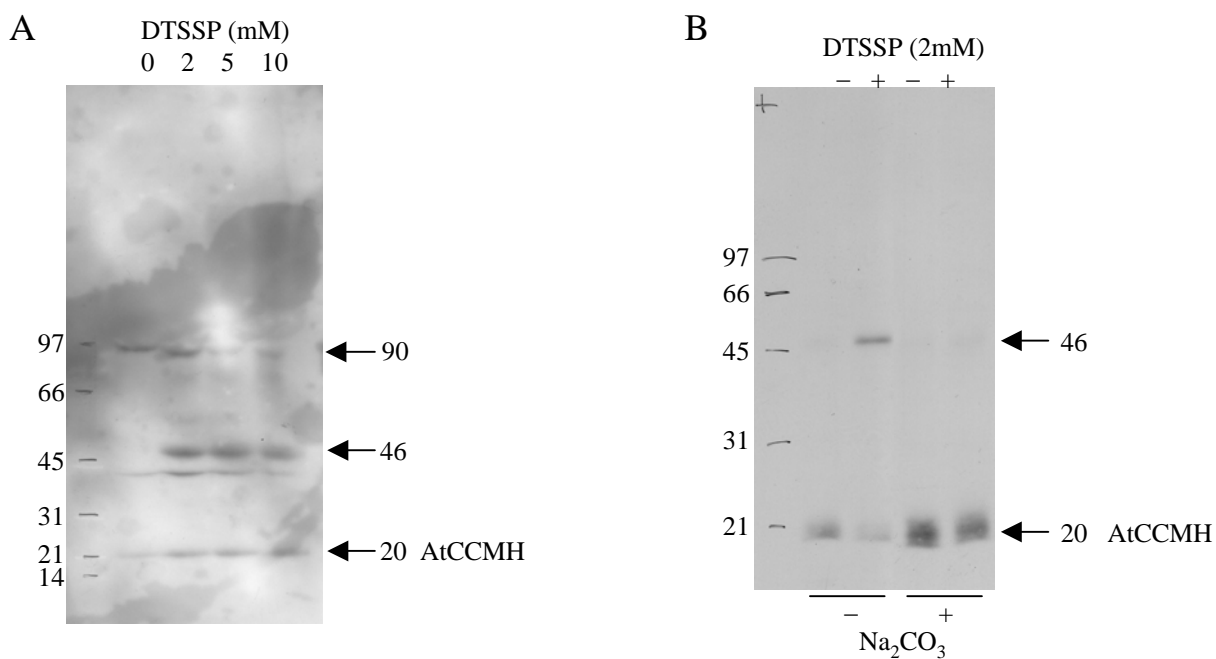


Figure r4.3 : Pontages chimiques *in vitro*.

Les résultats présentés sont des immunodétections avec les anticorps anti-AtCCMH.

A : pontage chimique sur une fraction mitochondriale totale.

B : pontage sur une fraction de membrane interne. Les fractions utilisées sont les fractions insolubles (culot 100000 g).

Les poids moléculaires sont indiqués en kDa.

4.4. Electrophorèse sur gels Bleu-Natifs

L'électrophorèse sur gels Bleu-Natifs permet de séparer des complexes natifs selon leur poids moléculaire. Elle a été décrite pour préparer et caractériser de manière native les complexes de la chaîne respiratoire des mitochondries de champignons et de mammifères (Schägger and von Jagow, 1991). Cette technique est appelée gels Bleu-Natifs car elle utilise le Bleu de Serva G pour introduire les charges négatives permettant la migration de protéines sans les dénaturer. Par la suite, elle a été adaptée à l'étude des complexes mitochondriaux de plantes supérieures (Jansch *et al.*, 1996).

Les expériences sur gels Bleu-Natifs ont été réalisées avec plusieurs objectifs, tout d'abord vérifier la présence d'AtCCMH dans un complexe mais aussi de déterminer si les anticorps anti-AtCCMH sont capables de reconnaître AtCCMH en conditions natives. Ceci pourrait permettre une éventuelle immunopurification du complexe contenant AtCCMH. Ainsi les partenaires potentiels d'AtCCMH pourraient être identifiés.

La première dimension et la deuxième dimension correspondante d'un gel Bleu-Natif typique obtenu à partir d'une fraction de complexes membranaires mitochondriaux sont montrés sur la Figure r4.4 après coloration au bleu de Coomassie. Les complexes I, F₀F₁ ATP synthase et III ont des poids moléculaires apparents d'environ 1000 kDa, 580 kDa, 480 kDa respectivement.

La solubilisation et la séparation des complexes ont été vérifiées avec des anticorps dirigés contre le cytochrome *c*₁ et NAD9. Ces anticorps anti-cytochrome *c*₁ et anti-NAD9 détectent des complexes d'environ 480 kDa et 1000 kDa respectivement et des protéines de 31 kDa et 29 kDa dans la seconde dimension (Figures r4.5A et r4.5B).

Les anticorps anti-AtCCMH ont été utilisés pour sonder les membranes portant les protéines de la première et de la deuxième dimension. Dans la première dimension, les anticorps anti-AtCCMH reconnaissent deux complexes (Figure r4.6) d'environ 600 kDa et 160 kDa, ce deuxième complexe étant moins abondant. En deuxième dimension, les anticorps anti-AtCCMH reconnaissent une protéine de 20 kDa à la verticale du complexes de 600 kDa. Ce signal correspond à la taille d'AtCCMH déjà observée dans les mitochondries. AtCCMH est aussi détectée dans des complexes mineurs de 270 kDa et 140 kDa. La forme monomérique d'AtCCMH est révélée par les anticorps. Par contre la protéine détectée à la

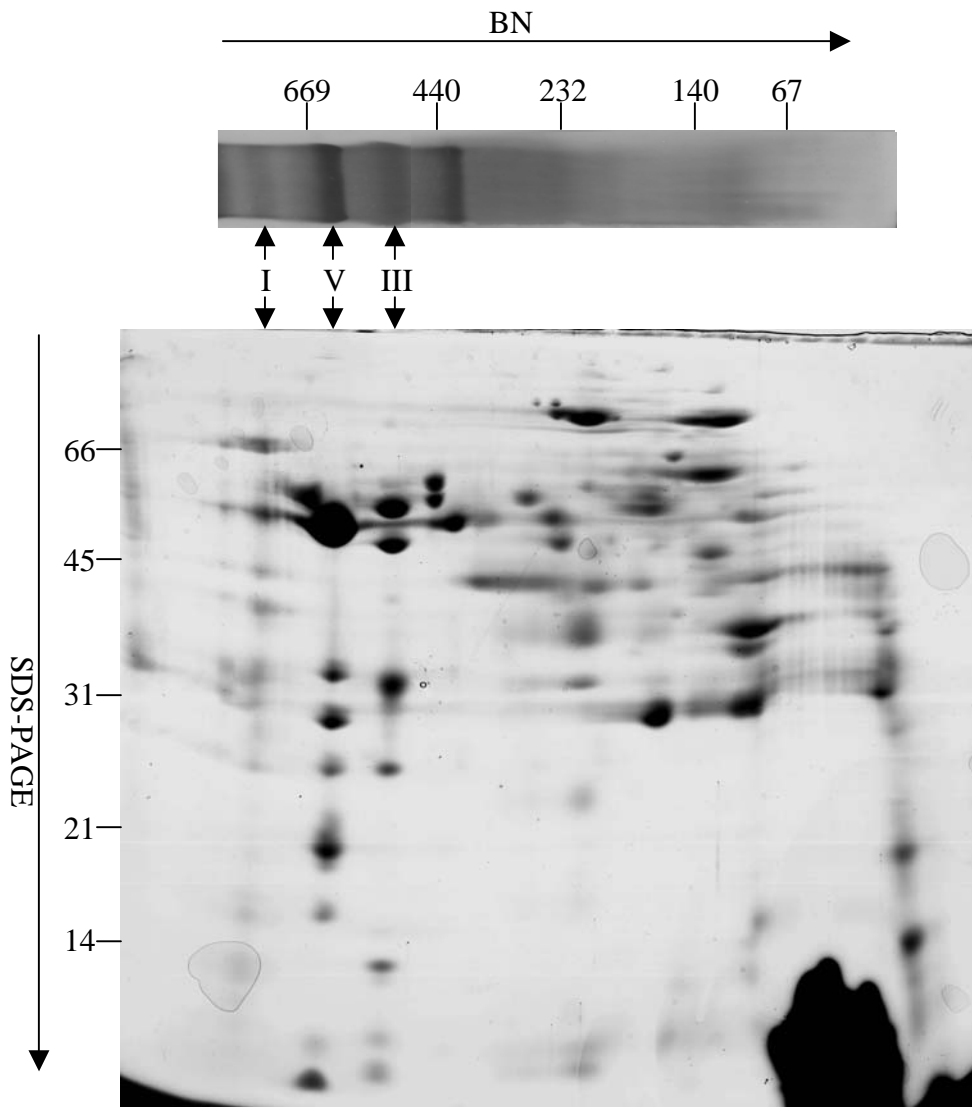


Figure r4.4 : Coloration au bleu de Coomassie d'un gel de type Bleu-Natif (BN, 1^{ère} dimension) et d'un gel SDS-PAGE (2^{ème} dimension). La position des complexes I, III et V de la chaîne respiratoire est indiquée par des flèches. Les poids moléculaires sont indiqués en kDa.

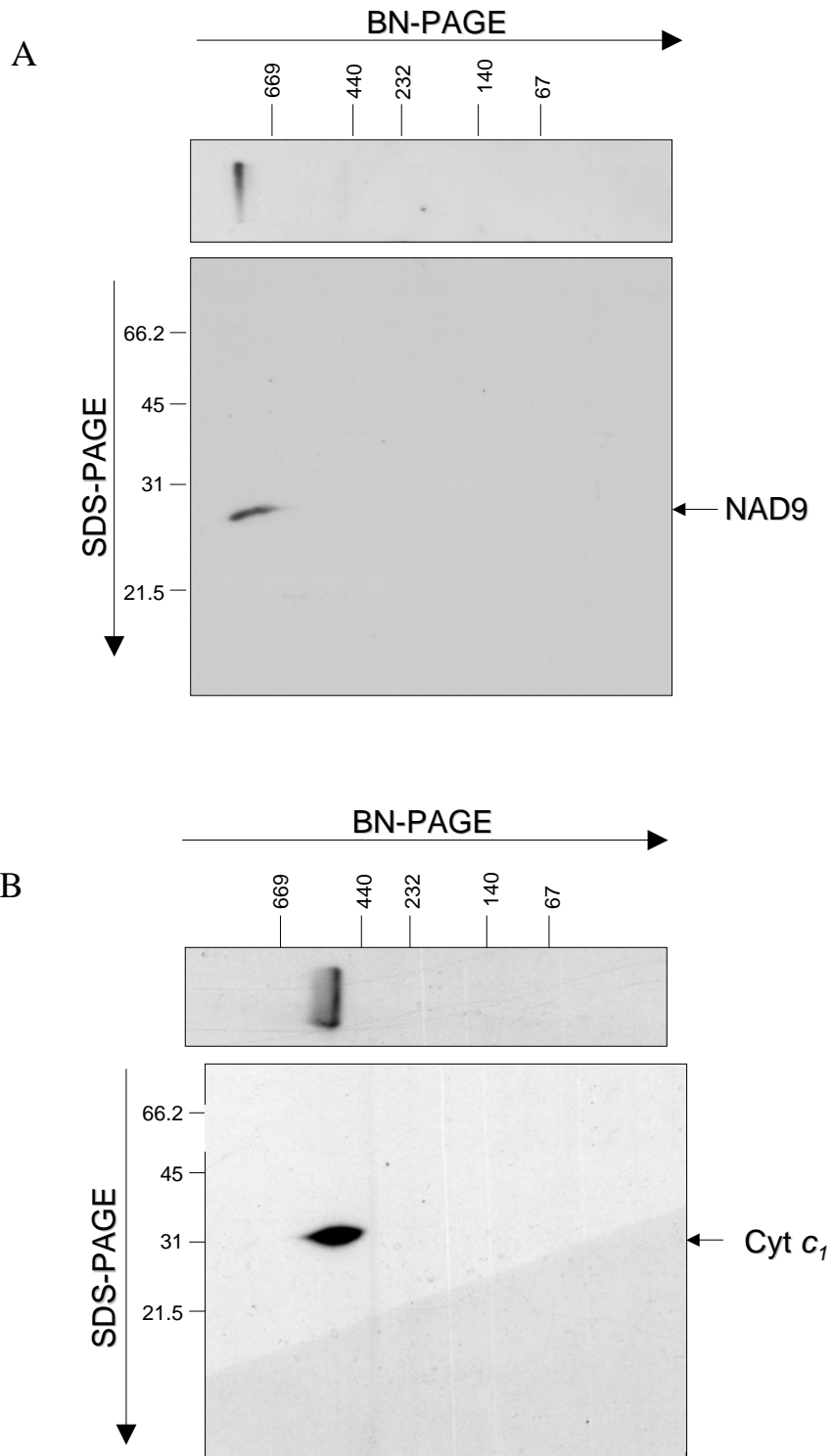


Figure r4.5 : Immunodétections avec des anticorps dirigés contre NAD9 (A), une protéine du complexe I et le cytochrome c_1 (B), une protéine du complexe III. Les poids moléculaires sont indiqués en kDa.

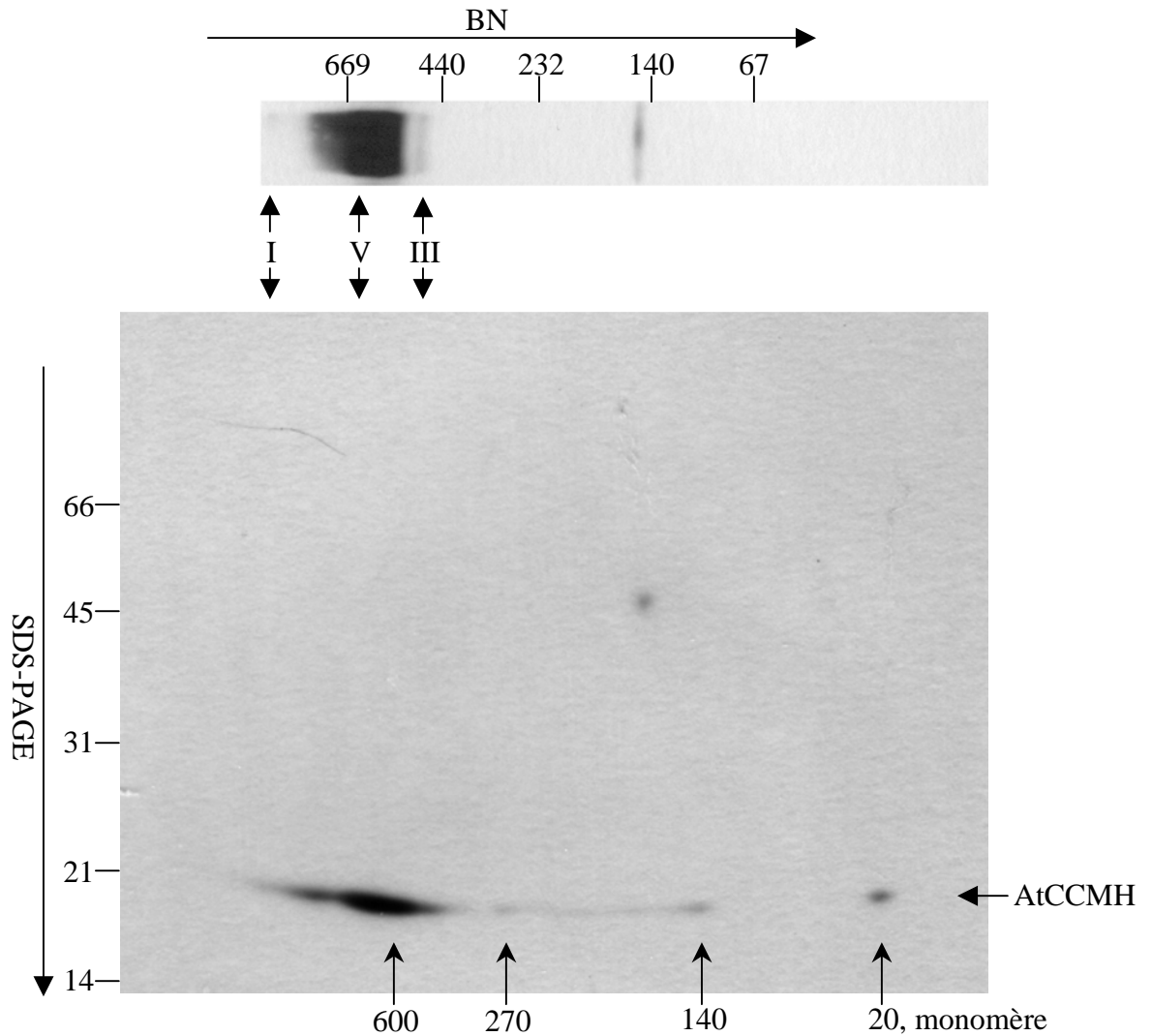


Figure r4.6 : Immunodétections avec des anticorps dirigés contre AtCCMH après transfert des gels Bleu-Natif (1ère dimension) et SDS-PAGE (2e dimension) sur membrane de PVDF. La position des complexes I, III et V de la chaîne respiratoire est indiquée par des flèches entre les images correspondant à chaque dimension. Les complexes dans lesquels AtCCMH est détecté sont indiqués par des flèches au bas de l'image. Les poids moléculaires sont indiqués en kDa.

verticale du complexe de 160 kDa à une taille de 45 kDa, cette protéine n'est pas identifiée mais possède des signaux reconnus par les anticorps anti-AtCCMH. Cette protéine de 45 kDa n'est pas apparentée à l'espèce de 46 kDa observée lors des expériences de couplage *in vitro* (cf. Résultats 4.3). AtCCMH est donc présente majoritairement dans un complexe de haut poids moléculaire (environ 600 kDa).

Les anticorps anti-AtCCMH reconnaissent AtCCMH en conditions natives. Ceci signifie qu'au moins un épitope reconnu par les anticorps anti-AtCCMH n'est pas masqué lorsque la protéine est incluse dans un complexe. Ces anticorps pourraient donc éventuellement être utilisés pour immunopurifier les complexes contenant AtCCMH.

Le complexe contenant AtCCMH est situé dans une zone du gel contenant une faible quantité de protéines, en effet, aucune bande protéique n'est visible en coloration au bleu de Coomassie.

D'autres anticorps dirigés contre des protéines CCM végétales ont été testés (Figure r4.7). AtCcmF_{N1} est détecté à 42 kDa dans un complexe de 150 kDa. AtCcmF_{N2}, à 30 kDa dans un complexe de 150 kDa, AtCCMA à 28 kDa dans un complexe de 480 kDa. Un complexe contenant toutes les protéines CCM d'*A. thaliana* connues (A₂B₂CEF_{N1}F_{N2}F_CH) aurait une taille d'environ 290 kDa. Un tel complexe semble donc ne pas exister dans les mitochondries de plantes. Chez les bactéries, l'existence d'un complexe contenant toutes les protéines Ccm n'a pas été montré non plus. Dans les deux cas, il est possible que les protéines CCM interagissent de manière transitoire. Des expériences de co-immunoprécipitation chez les bactéries vont dans ce sens (Ahuja and Thöny-Meyer, 2003; Ren et al., 2002).

AtCCMH est présent dans un complexe de haut poids moléculaire. Quelle est la composition exacte de ce complexe ? Pour répondre à cette question, une portion de gel contenant ce complexe a été découpée puis analysée par MALDI-ToF. Malheureusement la concentration en protéines dans ce fragment de gel était trop faible et la quantité de matériel utilisé pour la spectrométrie de masse insuffisante. Aucune protéine n'a pu être identifiée pour le moment.

4.5. Bilan

Aucun partenaire n'a été formellement identifié pour AtCCMH avec les techniques utilisées. Une protéine présente à proximité d'AtCCMH a été mise en évidence par pontage chimique *in vitro*. Il s'agit d'une protéine ou d'un groupe de protéines de 26 kDa périphérique

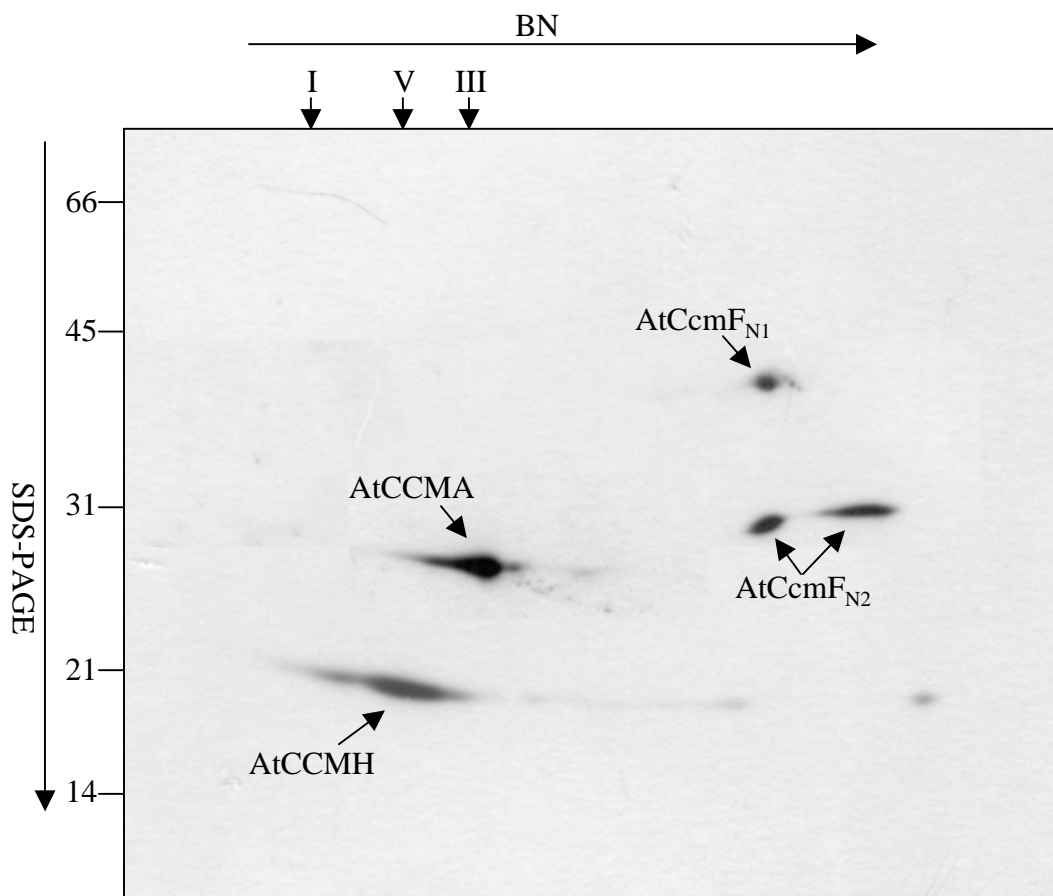


Figure r4.7 : Immunodétections avec des anticorps dirigés contre différentes protéines CCM.

La position des complexes I, III et V de la chaîne respiratoire est indiquée par des flèches. Les immunodétections ont été réalisées successivement avec les anticorps dirigés contre AtCCMH, AtCcmF_{N1}, AtCcmF_{N2} et AtCcmA avec décrochage des anticorps après l'immunodétection contre AtCCMH et AtCcmF_{N2}.

L'image présentée est une superposition des autoradiogrammes obtenus.

de la membrane interne localisées dans l'espace inter-membranaire. Il reste à déterminer quelle est la composition protéique de ce composé et comment cette(ces) protéine(s) interagi(ssen)t avec AtCCMH.

AtCCMH est présente dans un complexe de haut poids moléculaire mais la composition de ce complexe est inconnue. Aucune autre protéine CCM végétale dont les anticorps sont disponibles n'est présente dans ce complexe. Ce complexe pourrait être un complexe d'oxydoréduction. Ainsi, il y a de fortes chances qu'il contienne la protéine réduisant AtCCMH ainsi que l'ensemble des constituants de la voie de réduction des apocytochromes de type *c*. L'identification de l'ensemble des composants de ce complexe pourrait se faire soit par immunopurification avec les anticorps anti-AtCCMH, soit par gel-filtration, soit en utilisant la technique décrite par Werhahn (Werhahn and Braun, 2002). Cette méthode consiste à identifier les complexes d'intérêts sur gels Bleu-Natifs, à découper les fragments de gels contenant ces complexes, à électroéluer les complexes puis à séparer les sous-unités des complexes par électrophorèse bidimensionnelle IEF-SDS-PAGE et finalement à identifier ces sous-unités par spectrométrie de masse. Cette analyse est en cours au laboratoire.

5. Recherche bioinformatique d'autres protéines CCM

5.1. Le domaine C-terminal d'EcCcmH

Le domaine C-terminal d'EcCcmH, aussi appelé Cych (chez *B. japonicum* ou *R. capsulatus* par exemple), ne possède pas de motif caractéristique. Ces protéines possèdent deux motifs TPR (tetratricopeptide repeat) qui sont des motifs d'interaction protéine-protéine. Le génome d'*A. thaliana* code pour des centaines de protéines possédant des motifs TPR. A l'heure actuelle, aucune protéine mitochondriale possédant deux motifs TPR n'a pu être identifiée. La voie bioinformatique ne semble pas être une bonne approche pour identifier une telle protéine. En effet, il est possible que cette protéine possède un seul ou plus de deux domaines TPR. De plus, si elle ne possède pas de préséquence d'adressage mitochondrial reconnue par les logiciels de prédiction (comme c'est le cas pour AtCCMH), il sera encore plus difficile d'identifier un candidat.

5.2. CCMG, l'autre membre de la voie de réduction

5.2.1. Caractéristiques des CcmG bactériens

CcmG est une des protéines impliquées dans la voie de réduction des cystéines des apocytochromes *c*. Elle possède un site actif WCXXC, impliqué dans son rôle de réduction, elle appartient donc à la famille des thiorédoxines. Les protéines CcmG possèdent un domaine transmembranaire à leur extrémité N-terminale, ce domaine sert d'ancrage dans la membrane plasmique, le domaine C-terminal portant le site actif étant localisé dans le périplasme. La structure tridimensionnelle de CcmG de *B. japonicum* a été réalisée avec une résolution de 1,14 Å (Edeling *et al.*, 2002). BjCcmG adopte une structure proche du repliement thiorédoxine, caractérisé par un motif $\beta\alpha\beta$ lié par une hélice α à un motif $\beta\beta\alpha$, le tout formant un feuillet β de quatre brins entouré par trois hélices α . De plus deux insertions sont présentes dans BjCcmG, la première, dans le repliement thiorédoxine, ajoute une hélice α et un brin β au repliement thiorédoxine. La deuxième insertion est localisée entre le domaine

transmembranaire et le domaine thiorédoxine. La première insertion est nécessaire pour la formation de cytochromes *c* (Edeling *et al.*, 2002).

En plus du motif WCXXC, un deuxième motif est retrouvé chez tous les homologues bactériens de CcmG : le motif GVXGXPE localisé dans une boucle entre l'hélice α et le motif $\beta\beta\alpha$ (Fabianek *et al.*, 2000). Dans le repliement thiorédoxine, ce motif se trouve à proximité du site actif.

Le site actif de CcmG est relativement acide (Edeling *et al.*, 2004). Trois résidus acides (E86, E145, D162 chez BjCcmG) sont ainsi retrouvés à proximité du motif WCXXC. Ces résidus sont conservés dans tous les CcmG bactériens.

5.2.2. Recherche bioinformatique

La stratégie utilisée pour chercher un éventuel homologue de CcmG dans le génome d'*A. thaliana* s'est déroulée en deux temps. Tout d'abord, les thiorédoxines ou thiorédoxine-like possédant le motif GVXGXPE ou un motif proche ont été recherchées. Dans un deuxième temps, les protéines possédant le motif GVXGXPE codées par le génome nucléaire ont été recherchées et analysées pour la présence du motif thiorédoxine.

Analyse des thiorédoxines

En utilisant la banque de données InterPro, les protéines possédant le motif thiorédoxine-like (IPR011594) et thiorédoxine domain 2 (IPR006663) chez *A. thaliana* ont été recherchées. Ainsi une banque contenant 112 protéines a été construite. Ensuite, des recherches de motifs ont été réalisées dans les protéines de cette banque. Les motifs GVXGXPE, XVXGXPE, GVXGXPX et GVXGXXE ont été recherchés. Sept protéines ont été identifiées. Elles sont présentées dans le Tableau r3. Deux de ces protéines possèdent un site actif pour la fonction redox WCXXS, or aucune protéine CcmG ne possède un tel site. Ces deux protéines ne sont donc pas de bons candidats. Une autre est annotée comme une glutarédoxine possédant un site YCXXC. Quatre de ces protéines sont prédites dans le réticulum endoplasmique, elles ne sont donc pas de bonnes candidates. Sur les trois protéines restantes, deux possèdent le motif GVXGXPX en N-terminal du site actif WCXXC. Cette configuration ne correspond pas à une organisation de type CcmG. Le seul candidat possible est la protéine HCF164 codée par le gène *At4g37200*.

protéine	motif redox		motif CcmG		TM	taille (kDa)	localisation
	Séquence	position	séquence	position			
EcccmG	WCPTC	79-83	GVYGAPE	139-145	1	20,8	
At1gG04980	WCGHC	192-196	GVRGFPT	97-103		47,8	
At1g34780	WCDFS	92-96	GVHGFPT	132-138	1	35	ER
At2g47470	WCGHC	51-55	GVSGVPT	93-99	1	39,5	ER
	WCGHC	170-174	GVSGFPT	212-218			
At4g08930	WCDFS	85-89	GVHGFPT	125-131	4	37,2	ER
At4g37200	WCEVC	149-153	GVEGIPH	191-197		28,7	chloro
At5g20500	YCPYC	51-55	GVSGNKE	126-132	1	14,9	ER
At3g60080	WCHFC	21-25	TVHGEPE	"10-16		33,8	
At2g37970	/	/	GVFGKPE	60-66		23,7	mito
At4g10900	/	/	GVGGTPE	157-163	1	18,3	
At5g60870	/	/	GVPGIPE	399-405		47,3	mito
At5g47010	/	/	GVPGIPE	482-488		136,9	
At5g07390	/	/	GVTGWPE	148-154	4	103	

Tableau r3 : Recherche d'homologues potentiels de CcmG. Les résultats des deux stratégies (recherche d'une protéine avec un site redox possédant un motif de type GVXGXPE et recherche d'une protéine possédant le motif GVXGXPE) sont présentés.

TM : nombre de domaines transmembranaires prédits.

La localisation a été déterminée en utilisant les logiciels TargetP et Predotar

ER : réticulum endoplasmique

chloro : chloroplaste

mito : mitochondrie

HCF164

HCF164 est une protéine chloroplastique impliquée dans la biogenèse du complexe *bc₁* (Lennartz *et al.*, 2001). La localisation de cette protéine est prédite chloroplastique mais la prédiction de localisation mitochondriale n'est pas nulle (Tableau r4). Nous avons obtenus des anticorps dirigés contre cette protéine (du Dr Karin Meierhoff, Düsseldorf, Allemagne). Ces anticorps ont été testés contre des fractions cellulaires de cellules d'*A. thaliana* en culture. Ils reconnaissent une protéine chloroplastique de 31 kDa qui possède la taille d'HCF164 (poids moléculaire prédit : 29 kDa) (Figure r5.1). Les anticorps anti-HCF164 ne reconnaissent aucune protéine mitochondriale de la taille d'HCF164 mais différentes protéines de 97, 66, 35 et 20 kDa. HCF164 ne semble donc pas être localisée dans les mitochondries. D'autres méthodes telles que des tests d'import *in vitro* dans des mitochondries isolées ou des expériences de localisation *in vivo* après fusion à la GFP seraient nécessaires. Est-ce que la protéine de 35 kDa ou celle de 20 kDa est l'équivalent d'HCF164, c'est-à-dire CcmG, dans les mitochondries de plantes ? L'identification de cette protéine mitochondriale permettrait de répondre à cette question.

Recherche des protéines possédant le motif GVXGXPE

Les protéines codées par le génome d'*A. thaliana* possédant le motif GVXGXPE ont été recherchées par le programme de recherche de motif disponible sur le site PIR (Protein Information Resources, <http://pir.georgetown.edu/pirwww/search/patmatch.html>). Cinq protéines ont été identifiées possédant ce motif GVXGXPE (Tableau r3). Aucune d'entre elles ne possède un motif de réduction du genre CXXC. Deux de ces protéines sont prédites mitochondriales. L'une d'elle (At2g37970) est annotée comme une protéine appartenant à la famille des protéines liant l'hème de type SOUL (PFAM 04832), c'est la seule protéine possédant une fonction potentielle dans la maturation des cytochromes de type *c* mais ce n'est pas une fonction de réduction.

Aucun candidat pour CcmG n'a pu être identifié par les deux approches utilisées. La protéine réduisant AtCCMH n'est toujours pas caractérisée dans les mitochondries de plantes. Il est possible qu'aucun orthologue de CcmG ne soit présent dans les mitochondries végétales et qu'AtCCMH soit réduite par une autre voie impliquant un système différent de CcmG-

Logiciel	Mitochondries	Chloroplastes
MitoP	0,642	
Predotar	0,187	0,645
TargetP	0,306	0,456

Tableau r4 : Prédiction d'adressage aux organelles pour HCF164

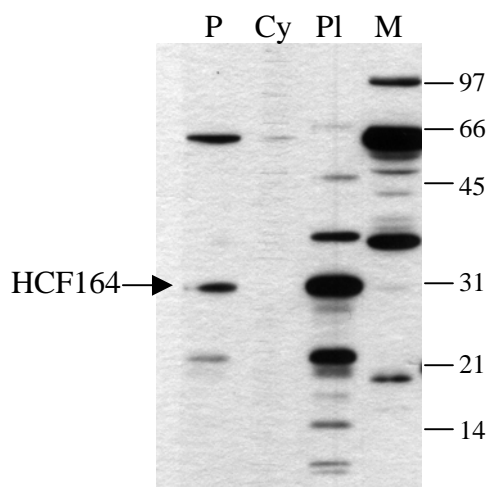


Figure r5.1 : Immunodétections avec les anticorps anti-HCF164 sur des fractions sous-cellulaires d'*A. thaliana*.

P : protoplastes

Cy : cytosol

Pl : plastes

M : mitochondries

Les poids moléculaires sont indiqués en kDa.

DsbD, autre protéine ne possédant pas d'orthologues identifiés dans les mitochondries végétales.

Les autres protéines impliquées dans la voie de réduction, si elles existent chez les plantes, devront être identifiées en utilisant une approche biochimique, génétique ou protéomique.



Conclusions –
Perspectives

Conclusions – Perspectives

L'objet de ma thèse était l'identification et l'étude d'AtCCMH : définir la structure de son gène, son expression, sa localisation cellulaire, sa fonction, ses propriétés biochimiques et ses interactions avec d'éventuels partenaires.

Les résultats obtenus : expression dans tous les organes, localisation mitochondriale, interaction avec EcCcmF et EcCcmG, fonction essentielle, motif RCXXC fonctionnel dans des réactions d'oxydoréduction suggèrent fortement que le gène identifié et appelé *AtCCMH* code bien pour l'homologue mitochondrial des protéines CcmH bactériennes.

Identification, expression et localisation d'AtCCMH

Le gène *AtCCMH* a été identifié sur le chromosome 1 du génome nucléaire d'*A. thaliana* par comparaison de séquences avec certains gènes *ccmH* bactériens connus. C'est le premier gène codant pour une protéine impliquée dans la voie de réduction à être identifié chez les plantes. CCMH possède, comme les protéines CcmH bactériennes, un domaine hydrophobe central et le motif conservé RCXXC dans le domaine N-terminal. Aucune extension N-terminale susceptible d'être une préséquence d'adressage mitochondrial n'est présente dans *AtCCMH*.

La recherche d'homologues eucaryotes d'AtCCMH en réalisant des BLAST sur des banques de données a permis d'identifier des protéines CCMH dans de nombreuses espèces végétales (des gymnospermes aux angiospermes). Par contre aucun homologue d'AtCCMH n'a été identifié chez d'autres eucaryotes tels les champignons, les invertébrés ou les vertébrés.

L'étude de l'expression d'*AtCCMH* montre que ce gène est faiblement exprimé (non détectable par Northern-blot). Par contre, par RT-PCR, des ARNm correspondants à *AtCCMH* ont été détectés dans tous les organes testés (racines, feuilles de rosette, tiges, feuilles caulinaires, fleurs, siliques). Cette étude de l'expression pourrait se poursuivre en réalisant des RT-PCR quantitatives pour quantifier le niveau d'expression dans chaque organe, ou sous différentes conditions de croissance. L'expression *in planta* pourrait être étudiée en réalisant des plantes transgéniques portant le promoteur d'*AtCCMH* en amont du gène *GUS* (Glucuronidase). L'étude du promoteur d'*AtCCMH* pourrait être initiée pour déterminer s'il contient une séquence permettant la coordination de l'expression d'*AtCCMH* avec les autres gènes *ccm* qu'ils soient nucléaires ou mitochondriaux.

Malgré l'absence de séquence d'adressage mitochondrial classique, AtCCMH a été localisée dans les mitochondries par immunodétections sur des fractions cellulaires. Cette localisation mitochondriale a été confirmée par import *in vitro* dans des mitochondries isolées. Par contre, les expériences de localisation *in vivo* par expression transitoire d'une protéine fusionnée à la GFP n'ont pas permis de détecter AtCCMH au niveau des mitochondries. Les fusions sont localisées au niveau de la membrane plasmique. Le signal d'adressage d'AtCCMH est soit incapable d'adresser une grosse protéine aux mitochondries, soit masqué par la structure de la fusion.

Etude de la fonction d'AtCCMH

Des études visant à mettre en évidence la fonction d'AtCCMH ont été réalisées dans *E. coli*. Une collaboration avec l'équipe du Prof. L. Thöny-Meyer (ETH, Zürich, Suisse) a été établie pour tester l'éventuelle complémentation fonctionnelle d'un mutant $\Delta ccmH$ d'*E. coli*. La protéine AtCCMH est incapable de compléter l'absence d'EcCcmH pour la formation d'holocytocromes *c*. Toutefois cette étude a permis de mettre en évidence qu'une interaction entre AtCCMH et EcCcmF est possible et qu'EcCcmG était capable de réduire AtCCMH *in vitro*. Malgré l'absence de complémentation, les résultats de cette étude ne permettent pas d'exclure un rôle pour AtCCMH dans la biogenèse des cytochromes de type *c*. De plus les complémentations des mutants $\Delta CcmA$ et $\Delta CcmE$ par AtCCMA et AtCCME ne permettent pas la production d'holocytochrome *c*, bien que AtCCME soit capable de fixer l'hème dans un système d'*E. coli* réduit ne comportant qu'EcCcmABCD. Cette approche est limitée par le manque de connaissance concernant les domaines protéiques et les facteurs essentiels pour les interactions entre les différents partenaires.

L'étude fonctionnelle d'AtCCMH a été poursuivie par la caractérisation de plantes transgéniques. Un mutant d'insertion dans *AtCCMH* a été identifié dans la banque créée au Salk Institute (La Jolla, Etats-Unis). Aucune plante homozygote pour l'insertion n'a été observée. L'analyse de la ségrégation de l'ADN-T a montré qu'il n'y avait qu'un seul locus d'insertion et qu'il n'existait pas de plantes *ccmH/ccmH*. La dissection des siliques a montré un quart de graines décolorées, ces graines contiennent des embryons décolorés qui stoppent leur développement au stade torpille. Une analyse PCR a montré que ces embryons décolorés sont homozygotes pour l'insertion. Au stade torpille, le cytoplasme des cellules des embryons décolorés est complètement désorganisé et aucune structure sous-cellulaire ne peut être

identifiée. Ces résultats indiquent qu'*AtCCMH* est un gène essentiel codant pour une protéine possédant une fonction essentielle.

Si *AtCCMH* était impliquée dans la maturation des cytochromes *c*, son absence entraînerait un arrêt de la formation d'holocytochromes *c* et donc un arrêt de la respiration mitochondriale. Des embryons de souris knock-out pour le cytochrome *c* meurent sept jours après la fécondation (J-M Cuezva, communication personnelle). Par analogie, chez les plantes des embryons déficients en cytochrome *c* mourront quelques jours après la fécondation. Pendant ces quelques jours, ces embryons auront le temps d'atteindre le stade torpille. Il a aussi été montré chez la souris qu'une absence du cytochrome *b* avait pour conséquence le non-assemblage du complexe III et cette absence du complexe III rendait le complexe I instable (Acin-Perez *et al.*, 2004). De façon similaire, si *AtCCMH* est absent, il résulterait une absence de cytochrome *c*₁ résultant de la non-fixation de l'hème. Cette absence pourrait avoir les mêmes effets que l'absence du cytochrome *b* c'est-à-dire un non-assemblage du complexe III et la déstabilisation du complexe I, la respiration mitochondriale serait impossible. Les embryons déficients en cytochrome *c*₁ mourraient rapidement. Les observations réalisées lors de l'analyse du mutant d'insertion dans *AtCCMH* vont dans le sens d'une implication d'*AtCCMH* dans la maturation des cytochromes *c* mitochondriaux.

Pour confirmer le rôle d'*AtCCMH* dans la maturation des cytochromes *c*, il faudrait montrer l'absence d'holocytochrome *c* dans les embryons *ccmH/ccmH*. Ceci pourrait se faire soit en réalisant un extrait protéique à partir de ces embryons et en réalisant une immunodétection avec un anticorps reconnaissant l'holocytochrome *c* ou en déterminant par l'immunocytochimie sur des coupes d'embryons décolorés si l'holocytochrome *c* est présent ou pas. Une autre approche serait de mesurer si ces embryons sont capables de respirer.

Limites actuelles de l'étude fonctionnelle

L'étude de la fonction des différentes protéines CCM est limitée par l'absence d'un test *in vitro* permettant de visualiser le bon assemblage des holocytochromes. Ce test pourrait être un test spectrométrique, un tel test a été développé chez les bactéries (Daltrop *et al.*, 2002) ou un test dans lequel l'incorporation d'hème marqué avec du ⁵⁵Fe dans les apocytochromes serait suivie.

Une autre limitation est l'impossibilité d'obtenir des mutants. Pour les gènes *ccm* codés par le génome mitochondrial, nous ne disposons pas de mutants car il est impossible de transformer le génome mitochondrial. Les mutants homozygotes des gènes *ccm* sont

probablement tous embryon-léthaux comme le mutant *ccmH*. Hormis le mutant *ccmH*, nous ne disposons que d'un mutant dans lequel l'expression d'un gène *ccm* (*AtCCME*) est modifiée. Chez ce mutant, il y a une baisse de la quantité de cytochromes *c* mitochondriaux. Une différence dans la taille et la densité des mitochondries a été observée au microscope électronique. Ceci peut être expliqué par une perturbation de la stoechiométrie des protéines impliquées dans le processus de maturation des cytochromes *c*. Une autre approche est de créer des mutants conditionnels, par exemple en créant un mutant RNAi (RNA interference) placé sous le contrôle d'un promoteur inductible. Ainsi il sera possible de moduler l'expression d'un gène à un moment donné.

Activité redox d'AtCCMH

L'étude de la fonction d'AtCCMH s'est poursuivie par une étude biochimique. La fonctionnalité du site RCXXC a été testée *in vitro*. Par un dosage des thiols libres d'AtCCMH purifié, un pont disulfure a été mis en évidence entre les deux cystéines du motif RCXXC. Ce pont disulfure a été mimé en marquant les thiols avec du DTNB. Les thiols du motif RCXXC peuvent être réduits par le système thiorédoxine, le système glutarédoxine et par EcCcmG. Le motif RCXXC d'AtCCMH semble donc être actif dans des réactions d'oxydoréduction. Le test de réduction d'insuline par AtCCMH est négatif. Mais ce résultat n'est pas surprenant puisque les homologues bactériens d'AtCCMH sont aussi inactifs dans les tests de réduction *in vitro* car les protéines CcmH possèdent une spécificité de substrat restreinte aux apocytochromes de type *c*. Cette étude devrait être complétée par un test de réduction de l'apocytochrome *c* *in vitro*, malheureusement, les apocytochromes sont très instables et pour l'instant nous n'avons pas réussi à en purifier.

S'il se confirme qu'AtCCMH est indispensable à la formation d'holocytochrome *c* et qu'AtCCMH joue un rôle dans la réduction des apocytochromes *c*, ceci implique que les apocytochromes sont oxydés. Or peu de données sont disponibles sur l'état redox de l'espace intermembranaire. Une sulfhydryl oxydase (Erv1) est présente dans ce compartiment. Cette protéine a une fonction d'oxydation avec une préférence pour les substrats thiorédoxine-like (Levitan *et al.*, 2004). Il est possible que le rôle de cette protéine soit d'oxyder les motifs CXXC des protéines présentes dans l'espace intermembranaire. Il serait intéressant de voir si Erv1 est capable d'oxyder les apocytochromes *c*.

Le rôle supposé d'AtCCMH est de réduire les cystéines du motif CXXCH des apocytochromes. Lorsque ceci est réalisé, le site actif d'AtCCMH se retrouve oxydé. Il faut

donc un système qui puisse réduire AtCCMH pour réactiver son site actif. Chez les bactéries, cette réduction est réalisée par CcmG, elle-même réduite par DsbD. Aucun homologue de CcmG et de DsbD n'a été identifié chez les plantes. Comment AtCCMH est-il réduit ? Deux hypothèses peuvent être émises. Premièrement, une cascade de réduction ressemblant à celle présente chez les bactéries impliquant des protéines à activité réductrice de type thiorédoxine pourrait exister. Mais pour l'instant, aucune protéine ayant ces caractéristiques n'a pu être identifiée au niveau de la membrane interne. Une deuxième hypothèse serait que les électrons proviennent de la chaîne respiratoire. En effet, il a été proposé que les complexes de la chaîne respiratoire s'organisent en respirasome (Schägger and Pfeiffer, 2000), c'est-à-dire qu'ils forment un supercomplexe contenant le complexe I, des complexes III et des complexes IV dans une stoechiométrie $I_1III_2IV_4$. Il est fort envisageable que les protéines CCM soient associées à ce respirasome. Ainsi AtCCMH pourrait être localisée à proximité de l'ubiquinol qui est potentiellement capable de réduire AtCCMH.

Partenaires d'AtCCMH

Des expériences ont été réalisées pour rechercher d'éventuels partenaires d'AtCCMH dans le but d'identifier l'espèce donnant des électrons à AtCCMH. Les expériences de far-western et de co-immunoprécipitation n'ont pas permis d'identifier des partenaires d'AtCCMH. Le pontage chimique *in vitro* a montré qu'AtCCMH se trouvait dans un ensemble de 46 kDa localisé sur la face externe de la membrane interne. Pour l'identifier les partenaires d'AtCCMH dans ce complexe artificiel, il faudrait immunoprécipiter ce complexe puis déterminer la nature des différents partenaires par spectrométrie de masse. L'ubiquinol ne peut pas interagir directement avec le DTSSP car elle ne possède pas de groupement amine primaire mais il est envisageable qu'elle fasse partie de ce composé. D'autres hypothèses seraient que ce complexe est composé d'une protéine à activité réductrice, d'un équivalent du domaine C-terminal d'EcCcmH, d'un apocytochrome ou d'une autre protéine de l'espace intermembranaire.

Une autre approche utilisée pour identifier d'éventuels partenaires d'AtCCMH a été l'utilisation des gels Bleu-Natifs. Grâce à cette technique, AtCCMH a été identifiée dans un complexe de haut poids moléculaire (environ 600 kDa). Les autres protéines CCM dont les anticorps sont disponibles (CCMA, CcmF_{N1}, CcmF_{N2}) ne sont pas présentes dans le même complexe qu'AtCCMH. Ces observations peuvent s'interpréter de deux manières, soit des

problèmes techniques rendent impossible la purification d'un éventuel complexe CCM, soit les protéines CCM interagissent entre-elles de manière transitoire. Le complexe CCM unique est, peut-être, peu stable et se dissocie lors de la préparation des extraits membranaires. Ce complexe pourrait être associé aux autres complexes de la chaîne respiratoire par exemple dans le respirasome. Les différents complexes de la chaîne respiratoire étant solubilisés puis séparés en première dimension selon leur taille, il est possible que le complexe CCM puisse être détaché des autres complexes puis disloqué lors de ce processus. Ainsi le noyau de ce complexe pourrait être constitué par CcmF_{N1}, CcmF_{N2}, CcmF_C et d'autres protéines et aurait une taille d'environ 150 kDa. Aucune protéine de la chaîne respiratoire ne semble présente dans le même complexe qu'AtCCMH, ce complexe pourrait contenir un ensemble de protéines à activité redox, le tout ayant une taille d'environ 600 kDa. Pour confirmer cette hypothèse, il faudrait immunopurifier le complexe avec les anticorps anti-AtCCMH. Comme AtCCMH est détecté en première dimension, elle est accessible aux anticorps. Une autre option pour purifier ce complexe serait d'utiliser la technologie de purification TAP (Tandem Affinity Purification) (Puig *et al.*, 2001). Pour cela il faudrait produire des plantes transgéniques exprimant une version d'AtCCMH marquée par un TAP. Lorsque le complexe aura été purifié, ses constituants pourront être identifiés par spectrométrie de masse.

Il est aussi possible que les protéines CCM soient associées dans différents complexes et qu'elles interagissent entre-elles de manière transitoire, comme cela semble le cas chez *E. coli* (Ahuja and Thöny-Meyer, 2003).

Il serait intéressant d'essayer de séparer les complexes dans d'autres conditions d'électrophorèse en Bleu-Natif (autre détergent, moins de sels, différentes concentrations de détergent) ou d'utiliser une autre technique telle la filtration sur gel ou la séparation des complexes sur gradient de saccharose. Ainsi il sera peut-être possible d'observer les protéines CCM dans des associations différentes avec les complexes de la chaîne respiratoire. D'autres supercomplexes pourraient aussi être observés car les interactions entre le(s) complexe(s) CCM et les complexes de la chaîne respiratoire sont sans doute faibles.

Import d'AtCCMH

AtCCMH est importée dans les mitochondries selon un mécanisme particulier. Une autre protéine CCM, AtCCMA est aussi importée sans maturation dans les mitochondries. Existe-t-il une voie d'importation particulière des protéines CCM ? Il est fort possible que de nombreuses protéines soient importées dans les mitochondries sans maturation. Mais

l'importation de ces protéines est pas ou peu étudiée car leur adressage mitochondrial n'est pas prédit.

Pour continuer l'étude de l'importation d'AtCCMH, il faudrait déterminer quelle est la véritable séquence d'adressage ou le domaine responsable de l'adressage. Il serait fort intéressant de déterminer si AtCCMH utilise les complexes de translocation TOM et TIM lors de son importation. Ceci peut se faire en tentant de bloquer l'import d'AtCCMH avec des anticorps dirigés contre les protéines TOM40 et TIM23, les protéines qui forment les pores dans les membranes. Enfin, il faudrait étudier comment AtCCMH est intégrée dans la membrane, déterminer si la protéine est entièrement importée dans la matrice puis ré-exportée dans la membrane interne ou si c'est un mécanisme de stop-transfert qui a lieu.

Coordination de l'expression des gènes *ccm* avec d'autres mécanismes

Chez les plantes deux systèmes de maturation des cytochromes *c* coexistent, le système I dans les mitochondries et le système II dans les chloroplastes. Chez les bactéries, les gènes impliqués dans la maturation des cytochromes *c* sont regroupés en opérons, chez les plantes certains gènes *ccm/ccs* sont présents sur les génomes mitochondriaux/chloroplastiques et d'autres sur le génome nucléaire. Ceci pose un certain nombre de questions :

Est-ce que l'expression des gènes *ccm/ccs* est régulée ?

Existe-t-il une coordination de l'expression des génomes des organelles et du génome nucléaire ? A quel niveau a lieu cette régulation (transcription, traduction ou assemblage des complexes) ?

Y a-t-il des interactions entre les deux mécanismes ?

Ainsi, l'étude de l'expression des gènes nucléaires et des gènes des organelles par des techniques comme les puces à ADN semble indispensable. Les techniques de protéomique semblent moins adaptées car les protéines CCM sont des protéines membranaires peu abondantes. Différentes conditions de culture, des traitements avec des inhibiteurs de la voie des cytochromes ou des plantes transgéniques possédant un gène *ccm* avec une expression modifiée pourraient être testés. Une éventuelle régulation de la voie de maturation des cytochromes *c* pourrait être mise en évidence, ainsi qu'une possible régulation rétrograde induite par la sous- ou sur-expression d'un composant de cette voie.

Aspect évolutif de la maturation des cytochromes *c*

Enfin, un certain nombre de questions se posent quant à l'évolution des mécanismes de maturation des cytochromes *c*. Pourquoi les mitochondries de plantes ont-elles conservé un système aussi complexe pour la maturation des cytochromes *c* ? Pourquoi deux systèmes différents ont-ils évolués dans les mitochondries ? Est-ce que les mitochondries des organismes photosynthétiques ont une autre origine que celles des organismes non photosynthétiques ? L'ancêtre des mitochondries semble être une α -protéobactérie, où les cytochromes *c* sont maturés selon le système I. Pourquoi les mitochondries des organismes non photosynthétiques ont-ils abandonné le système I ? Quelle est l'origine des hèmes lyases retrouvés chez ces mitochondries ? La nature des systèmes utilisés chez des eucaryotes primitifs et chez les algues devrait être étudiée. Elle permettrait peut-être de mettre en évidence un système intermédiaire entre le système III et les systèmes I et II. Les connaissances des trois systèmes sont loin d'être complètes. Par exemple, récemment, une protéine impliquée dans le système III vient d'être identifiée chez la levure (Bernard *et al.*, 2003) alors que pendant des années, il était admis que seule l'hème lyase était nécessaire. Une meilleure connaissance des différents systèmes décrit pour la maturation des cytochromes de type *c* permettra de résoudre les énigmes posées telles l'origine du système III, les raisons de la rétention du système I dans les mitochondries de plantes ou la coexistence de deux systèmes différents dans une cellule végétale.

Annexes

Annexes

ccmX : gène bactérien ou mitochondrial

CCMX : gène nucléaire

CcmX : protéine bactérienne ou codée par la mitochondrie

CCMX : protéine codée par le noyau

Annexe 1 : Nomenclature

code	taille	gène	sequence	remarque
z303	21	AtCCMH	aaCaATGGAGAAACAAGCAAGAG	amorce 5' avec site Nco I pour clonage
z304	30	AtCCMH	aaGGatccATAAAATTTGGGGCATAAAGC	amorce 3' avec site BamH I pour clonage
z305	19	AtCCMH	aaccatgTTTTACCAGAAACACAGGC	amorce 5' avec site Nco I pour clonage
z306	17	AtCCMH	aaggatcccGGTTGAGCCATCTCC	amorce 3' avec site BamH I pour clonage
z307	30	AtCCMH	aagaattcTGAATTTGTCAGCGCAATGGAG	amorce 5' avec site EcoR I pour clonage
z308	27	AtCCMH	aaggatccAAGGAGACACGGGAACTAC	amorce 3' avec site BamHI pour clonage
z317	19	AtCCMH	GCCTGTGCTTCTGGTAAAC	amorce 3' pour RT-PCR (5'-RACE)
z318	18	AtCCMH	CCTGCAGCGGTACCTCCA	amorce 3' pour 5'-RACE
z326	19	AtCCMH	aagaattcTTCCCTCCACCCAGCG	amorce 5' avec site EcoR I pour clonage
z370	20	AtCCMH	ACATCATGGCGTTGAACCTT	amorce 5' dans AtCCMH
z371	20	AtCCMH	CGAGCCAAAGAACAAGAGAGC	amorce 3' dans AtCCMH
z373	37	AtCCMH	aAaaGcgTGgcGAccAtgGACGGAAGAGGGAAGAAG	amorce 5' pour fusionner EcCcmH et AtCCMH
z388	27	AtCCMH	aagaattcGAAGATCCACCGCATCTT	amorce 5' avec site EcoR I pour clonage
z393	28	AtCCMH	aagtcgaccTACCGGTTGAGCCATCTCC	amorce 3' avec site Sal I pour clonage
z394	33	AtCCMH	aagtagacAGCTCAGCTAATTAAGCTTAGTGAT	amorce 3' avec site Sal I pour clonage
z395	25	AtCCMH	AGAGATCTACAGTAGCTGGAGGAT	amorce 3' dans AtCCMH
z431	26	AtCYCca	acgcgtCGCTCGTTTGATGAAGCACC	amorce 5' avec site Mlu I pour clonage
z433	22	Arab'	TCTGGATGGAGTAAGACGATGG	amorce 5' pour clonage
z434	26	BJCytc550	acgcgtGGACGCTGCGGCGATCATGG	amorce 3' avec site Mlu I pour clonage
z435	33	AtCYCca	actagtfcgacTCACTTAGCGGCAGTAGATTCC	amorce 3' avec sites Kpn I et Sal I pour clonage
p123	45		gccggagctctgcagaattcTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	amorce poly-T + adaptateur
p118	20		gccggagctctgcagaattc	amorce adaptateur
LB1a	22		TGGTTTCACGTTAGTGGGCCATCG	amorce dans la bordure gauche du T-DNA
RB1a	20		AATAGCCCTCCACCCAAGC	amorce dans la bordure droite du T-DNA

Annexe 2 : Liste des amorces utilisées

protéine	localisation	organisme	type d'anticorps	dilution	référence/sources
AtCCMA	Mt-IM	A. thaliana	polyclonal, lapin	1000	Rayapuram N.
AtCCME	Mt-IM	A. thaliana	polyclonal, lapin	5000	Spielewoy et al. 2001
AtCcmF _{N1}	Mt-IM	A. thaliana	polyclonal, lapin	10000	Rayapuram N.
AtCcmF _{N2}	Mt-IM	A. thaliana	polyclonal, lapin	10000	Rayapuram N.
AtCCMH	Mt-IM	A. thaliana	polyclonal, lapin	500	Ces travaux
Cyc c 1	Mt-IM	Levure	polyclonal, lapin	50000	Schatz G.
EcCcmF	B-mp	E. coli	polyclonal, lapin	10000	Thöny-Meyer L
HCF164	Cp-th	A. thaliana	polyclonal, lapin	20000	Meierhoff K.
His-tag			monoclonal, souris	5000	Olagen
MnSOD	Mt-Ma	Tabac	polyclonal, lapin	10000	Bowler et al. 1989
NAD9	Mt-IM	Blé	polyclonal, lapin	50000	Lamattina et al. 1993
Rubisco LSU	Cp-st	Epinard	polyclonal, lapin	10000	Camara B.
TOM40	Mt-OM	Fève	polyclonal, lapin	10000	Harmey MA.
TRX3	cytosol	A. thaliana	polyclonal, lapin	40000	Meyer Y.

Annexe 3 : Liste des anticorps utilisés

Mt : mitochondrie, Cp : chloroplast, B : bactérie

IM : membrane interne, OM ; membrane externe, mp, membrane plasmique, th, thylakoïdes, Ma : matrice st : stroma

ibliographie

Bibliographie

- A**cin-Perez, R., Bayona-Bafaluy, M.P., Fernandez-Silva, P., Moreno-Loshuertos, R., Perez-Martos, A., Bruno, C., Moraes, C.T., and Enriquez, J.A. (2004). Respiratory complex III is required to maintain complex I in mammalian mitochondria. *Mol Cell* **13**, 805-815.
- Ahuja, U., and Thöny-Meyer, L. (2003). Dynamic features of a heme delivery system for cytochrome C maturation. *J Biol Chem* **278**, 52061-52070.
- Allen, J.W., Daltrop, O., Stevens, J.M., and Ferguson, S.J. (2003). C-type cytochromes: diverse structures and biogenesis systems pose evolutionary problems. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **358**, 255-266.
- Andersen, C.L., Matthey-Dupraz, A., Missiakas, D., and Raina, S. (1997). A new *Escherichia coli* gene, dsbG, encodes a periplasmic protein involved in disulphide bond formation, required for recycling DsbA/DsbB and DsbC redox proteins. *Mol Microbiol* **26**, 121-132.
- Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., de Bruijn, M.H., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F., Schreier, P.H., Smith, A.J., Staden, R., and Young, I.G. (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* **290**, 457-465.
- Andersson, S.G., Zomorodipour, A., Andersson, J.O., Sicheritz-Ponten, T., Alsmark, U.C., Podowski, R.M., Naslund, A.K., Eriksson, A.S., Winkler, H.H., and Kurland, C.G. (1998). The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature* **396**, 133-140.
- Anthony, C. (1992). The c-type cytochromes of methylotrophic bacteria. *Biochim Biophys Acta* **1099**, 1-15.
- Arabidopsis Genome Initiative. (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**, 796-815.
- B**ader, M., Muse, W., Zander, T., and Bardwell, J. (1998). Reconstitution of a protein disulfide catalytic system. *J Biol Chem* **273**, 10302-10307.
- Balk, J., and Leaver, C.J. (2001). The PET1-CMS Mitochondrial Mutation in Sunflower Is Associated with Premature Programmed Cell Death and Cytochrome c Release. *Plant Cell* **13**, 1803-1818.
- Balk, J., Leaver, C.J., and McCabe, P.F. (1999). Translocation of cytochrome c from the mitochondria to the cytosol occurs during heat-induced programmed cell death in cucumber plants. *FEBS Lett* **463**, 151-154.
- Balk, J., Chew, S.K., Leaver, C.J., and McCabe, P.F. (2003). The intermembrane space of plant mitochondria contains a DNase activity that may be involved in programmed cell death. *Plant J* **34**, 573-583.
- Balmer, Y., Vensel, W.H., Tanaka, C.K., Hurkman, W.J., Gelhaye, E., Rouhier, N., Jacquot, J.P., Manieri, W., Schurmann, P., Droux, M., and Buchanan, B.B. (2004). Thioredoxin links redox to the regulation of fundamental processes of plant mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 2642-2647.
- Banze, M., and Follmann, H. (2000). Organelle-specific NADPH thioredoxin reductase in plant mitochondria. *J. plant physiol.* **156**, 126-129.
- Bardwell, J.C., McGovern, K., and Beckwith, J. (1991). Identification of a protein required for disulfide bond formation *in vivo*. *Cell* **67**, 581-589.

- Barrett, E.L., and Clark, M.A.** (1987). Tetrathionate reduction and production of hydrogen sulfide from thiosulfate. *Microbiol Rev* **51**, 192-205.
- Beckman, D.L., and Kranz, R.G.** (1993). Cytochromes c biogenesis in a photosynthetic bacterium requires a periplasmic thioredoxin-like protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 2179-2183.
- Beckman, D.L., Trawick, D.R., and Kranz, R.G.** (1992). Bacterial cytochromes c biogenesis. *Genes Dev.* **6**, 268-283.
- Beers, E.P., Woffenden, B.J., and Zhao, C.** (2000). Plant proteolytic enzymes: possible roles during programmed cell death. *Plant Mol Biol* **44**, 399-415.
- Berg, O.G., and Kurland, C.G.** (2000). Why mitochondrial genes are most often found in nuclei. *Mol Biol Evol* **17**, 951-961.
- Bernard, D.G., Gabilly, S.T., Dujardin, G., Merchant, S., and Hamel, P.P.** (2003). Overlapping specificities of the mitochondrial cytochrome c and c1 heme lyases. *J Biol Chem* **278**, 49732-49742.
- Bibb, M.J., Von Etten, R.A., Wright, C.T., Walberg, M.W., and Clayton, D.A.** (1981). Sequence and gene organization of mouse mitochondrial DNA. *Cell* **26**, 167-180.
- Bodenstein-Lang, J., Buch, A., and Follmann, H.** (1989). Animal and plant mitochondria contain specific thioredoxins. *FEBS Lett* **258**, 22-26.
- Bonnard, G., and Grienenberger, J.M.** (1995). A gene proposed to encode a transmembrane domain of an ABC transporter is expressed in wheat mitochondria. *Mol. Gen. Genet.* **246**, 81-99.
- Bott, M., Ritz, D., and Hennecke, H.** (1991). The *Bradyrhizobium japonicum* cycM gene encodes a membrane-anchored homolog of mitochondrial cytochrome c. *J Bacteriol* **173**, 6766-6772.
- Bower, M.S., Matias, D.D., Fernandes-Carvalho, E., Mazzurco, M., Gu, T., Rothstein, S.J., and Goring, D.R.** (1996). Two members of the thioredoxin-h family interact with the kinase domain of a Brassica S locus receptor kinase. *Plant Cell* **8**, 1641-1650.
- Bowler, C., Alliot, T., De Loose, M., Van Montagu, M., and Inzé, D.** (1989). The induction of manganese superoxide dismutase in response to stress in *Nicotiana plumbaginifolia*. *EMBO J.* **8**, 31-38.
- Boyes, D.C., Zayed, A.M., Ascenzi, R., McCaskill, A.J., Hoffman, N.E., Davis, K.R., and Gorkach, J.** (2001). Growth stage-based phenotypic analysis of *Arabidopsis*: a model for high throughput functional genomics in plants. *Plant Cell* **13**, 1499-1510.
- Bradford, M.M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- 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.
- Buchanan, B.B., Gruissem, W., and Russell, L.J.** (2000). *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. (American Society of Plant Physiologists; Rockville, Maryland).
- Burger, G., Zhu, Y., Littlejohn, T.G., Greenwood, S.J., Schnare, M.N., Lang, B.F., and Gray, M.W.** (2000). Complete sequence of the mitochondrial genome of *Tetrahymena pyriformis* and comparison with *Paramecium aurelia* mitochondrial DNA. *J Mol Biol* **297**, 365-380.
- Cabrillac, D., Cock, J.M., Dumas, C., and Gaude, T.** (2001). The S-locus receptor kinase is inhibited by thioredoxins and activated by pollen coat proteins. *Nature* **410**, 220-223.

- Capitani, G., Markovic-Housley, Z., DelVal, G., Morris, M., Jansonius, J.N., and Schurmann, P.** (2000). Crystal structures of two functionally different thioredoxins in spinach chloroplasts. *J Mol Biol* **302**, 135-154.
- Chivers, P.T., and Raines, R.T.** (1997). General acid/base catalysis in the active site of *Escherichia coli* thioredoxin. *Biochemistry* **36**, 15810-15816.
- Chung, J., Chen, T., and Missiakas, D.** (2000). Transfer of electrons across the cytoplasmic membrane by DsbD, a membrane protein involved in thiol-disulphide exchange and protein folding in the bacterial periplasm. *Mol Microbiol* **35**, 1099-1109.
- Cinege, G., Kereszt, A., Kertesz, S., Balogh, G., and Dusha, I.** (2004). The roles of different regions of the CycH protein in c-type cytochrome biogenesis in *Sinorhizobium meliloti*. *Mol Genet Genomics* **271**, 171-179.
- Claros, M.G., and von Heijne, G.** (1994). TopPred II: an improved software for membrane protein structure predictions. *Comput Appl Biosci* **10**, 685-686.
- Clemens, S., Kim, E.J., Neumann, D., and Schroeder, J.I.** (1999). Tolerance to toxic metals by a gene family of phytochelatin synthases from plants and yeast. *Embo J* **18**, 3325-3333.
- Cobbett, C.S.** (2000). Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification. *Plant Physiol* **123**, 825-832.
- Cotgreave, I.A., and Gerdes, R.G.** (1998). Recent trends in glutathione biochemistry-- glutathione-protein interactions: a molecular link between oxidative stress and cell proliferation? *Biochem Biophys Res Commun* **242**, 1-9.
- Coupric, J., Vinci, F., Dugave, C., Qu, E., and Moutiez, M.** (2000). Investigation of the DsbA mechanism through the synthesis and analysis of an irreversible enzyme-ligand complex. *Biochemistry* **39**, 6732-6742.
- Covello, P.S., and Gray, M.W.** (1989). RNA editing in plant mitochondria. *Nature* **341**, 662-666.
- Covello, P.S., and Gray, M.W.** (1992). Silent mitochondrial and active nuclear genes for subunit-2 of cytochrome-c oxidase (cox2) in soybean - evidence for RNA-mediated gene transfer. *EMBO J.* **11**, 3815-3820.
- Creissen, G., Reynolds, H., Xue, Y., and Mullineaux, P.** (1995). Simultaneous targeting of pea glutathione reductase and of a bacterial fusion protein to chloroplasts and mitochondria in transgenic tobacco. *Plant J.* **8**, 167-175.
- Daltrop, O., and Ferguson, S.J.** (2003). Cytochrome c maturation. The in vitro reactions of horse heart apocytochrome c and *Paracoccus denitrificans* apocytochrome c550 with heme. *J Biol Chem* **278**, 4404-4409.
- Daltrop, O., Allen, J.W., Willis, A.C., and Ferguson, S.J.** (2002). In vitro formation of a c-type cytochrome. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 7872-7876.
- Darby, N.J., and Creighton, T.E.** (1995). Characterization of the active site cysteine residues of the thioredoxin-like domains of protein disulfide isomerase. *Biochemistry* **34**, 16770-16780.
- Darwin, A., Hussain, H., Griffiths, L., Grove, J., Sambongi, Y., Busby, S., and Cole, J.** (1993). Regulation and sequence of the structural gene for cytochrome c₅₅₂ from *Escherichia coli* : not a hexahaem but a 50 kDa tetrahaem nitrite reductase. *Mol. Microbiol.* **9**, 1255-1265.
- Dellaporta, S.L., Wood, J., and Hicks, J.B.** (1983). A plant DNA mipreparation : version II. *Plant Mol Biol Rep* **1**, 19-21.

- Deshmukh, M., May, M., Zhang, Y., Gabbert, K.K., Karberg, K.A., Kranz, R.G., and Daldal, F.** (2002). Overexpression of *ccl1-2* can bypass the need for the putative apocytochrome chaperone CycH during the biogenesis of c-type cytochromes. *Mol Microbiol* **46**, 1069-1080.
- Diekert, K., de Kroon, A.I., Ahting, U., Niggemeyer, B., Neupert, W., de Kruijff, B., and Lill, R.** (2001). Apocytochrome c requires the TOM complex for translocation across the mitochondrial outer membrane. *Embo J* **20**, 5626-5635.
- Donzeau, M., Kaldi, K., Adam, A., Paschen, S., Wanner, G., Guiard, B., Bauer, M.F., Neupert, W., and Brunner, M.** (2000). Tim23 links the inner and outer mitochondrial membranes. *Cell* **101**, 401-412.
- Dreyfuss, B.W., Hamel, P.P., Nakamoto, S.S., and Merchant, S.** (2003). Functional analysis of a divergent system II protein, Ccs1, involved in c-type cytochrome biogenesis. *J Biol Chem* **278**, 2604-2613.
- Dumont, M.E., Ernst, J.F., and Sherman, F.** (1988). Coupling of heme attachment to import of cytochrome c into yeast mitochondria. Studies with heme lyase-deficient mitochondria and altered apocytochromes c. *J Biol Chem* **263**, 15928-15937.
- Dumont, M.E., Ernst, J.F., Hampsey, D.M., and Sherman, F.** (1987). Identification and sequence of the gene encoding cytochrome c heme lyase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* **6**, 235-241.
- Dumont, M.E., Cardillo, T.S., Hayes, M.K., and Sherman, F.** (1991). Role of cytochrome c heme lyase in mitochondrial import and accumulation of cytochrome c in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **11**, 5487-5496.
- Dyson, H.J., Gippert, G.P., Case, D.A., Holmgren, A., and Wright, P.E.** (1990). Three-dimensional solution structure of the reduced form of *Escherichia coli* thioredoxin determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry* **29**, 4129-4136.
- Edeling, M.A., Guddat, L.W., Fabianek, R.A., Thöny-Meyer, L., and Martin, J.L.** (2002). Structure of CcmG/DsbE at 1.14 Å resolution: high-fidelity reducing activity in an indiscriminately oxidizing environment. *Structure (Camb)* **10**, 973-979.
- Edeling, M.A., Ahuja, U., Heras, B., Thöny-Meyer, L., and Martin, J.L.** (2004). The acidic nature of the CcmG redox-active center is important for cytochrome c maturation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **186**, 4030-4033.
- Eklund, H., Cambillau, C., Sjöberg, B.M., Holmgren, A., Jornvall, H., Hoog, J.O., and Branden, C.I.** (1984). Conformational and functional similarities between glutaredoxin and thioredoxins. *Embo J* **3**, 1443-1449.
- Fabianek, R., Hofer, T., and Thöny-Meyer, L.** (1999). Characterization of the *Escherichia coli* CcmH protein reveals new insights into the redox pathway required for cytochrome c maturation. *Arch. Microbiol.* **171**, 92-100.
- Fabianek, R.A., Hennecke, H., and Thöny-Meyer, L.** (2000). Periplasmic protein thiol:disulfide oxidoreductases of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**, 303-316.
- Fabianek, R.A., Huber-Wunderlich, M., Glockshuber, R., Künzler, P., Hennecke, H., and Thöny-Meyer, L.** (1997). Characterization of the *Bradyrhizobium japonicum* CycY protein, a membrane-anchored periplasmic thioredoxin that may play a role as a reductant in the biogenesis of c-type cytochromes. *J. Biol. Chem.* **272**, 4467-4473.

- Faivre-Nitschke, E., Nazoa, P., Gualberto, J.M., Grienenberger, J.M., and Bonnard, G.** (2001). Wheat mitochondria ccmB encodes the membrane domain of a putative ABC transporter involved in cytochromes c biogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* **1519**, 199-208.
- Fauron, C., Allen, J.W., Clifton, S., and Newton, K.** (2004). Plant Mitochondrial Genomes. In *Molecular Biology and Biotechnology of Plant Organelles*, H. Daniell and C. Chase, (eds), in press.
- Ferguson, S.J.** (2001). Keilin's cytochromes: how bacteria use them, vary them and make them. *Biochem Soc Trans* **29**, 629-640.
- Ferrari, D.M., and Soling, H.D.** (1999). The protein disulphide-isomerase family: unravelling a string of folds. *Biochem J* **339**, 1-10.
- Flory, J.E., and Donohue, T.J.** (1995). Organization and expression of the *Rhodobacter sphaeroides* cycFG operon. *J Bacteriol* **177**, 4311-4320.
- Folsch, H., Guiard, B., Neupert, W., and Stuart, R.A.** (1996). Internal targeting signal of the BCS1 protein: a novel mechanism of import into mitochondria. *Embo J* **15**, 479-487.
- Forman-Kay, J.D., Clore, G.M., Stahl, S.J., and Gronenborn, A.M.** (1992). ¹H and ¹⁵N resonance assignments and secondary structure of the human thioredoxin C62A, C69A, C73A mutant. *J Biomol NMR* **2**, 431-445.
- Foury, F., Roganti, T., Lecrenier, N., and Purnelle, B.** (1998). The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **440**, 325-331.
- Fujiki, Y., Fowler, S., Shio, H., Hubbard, A.L., and Lazarow, P.B.** (1982). Polypeptide and phospholipid composition of the membrane of rat liver peroxisomes : Comparison with endoplasmic reticulum and mitochondrial membranes. *J. Cell Biol.* **93**, 103-110.
- Fujita, T., and Sato, R.** (1966). Studies on soluble cytochromes in Enterobacteriaceae. IV. Possible involvement of cytochrome c-552 in anaerobic nitrite metabolism. *J Biochem (Tokyo)* **60**, 691-700.
- Gaballa, A., Koedam, N., and Cornelis, P.** (1996). A cytochrome c biogenesis gene involved in pyoverdine production in *Pseudomonas fluorescens* ATCC17400. *Mol. Microbiol.* **21**, 777-785.
- Gaballa, A., Baysse, C., Koedam, N., Muyldermans, S., and Cornelis, P.** (1998). Different residues in periplasmic domains of the CcmC inner membrane protein of *Pseudomonas fluorescens* ATCC 17400 are critical for cytochrome c biogenesis and pyoverdine-mediated iron uptake. *Mol Microbiol* **30**, 547-555.
- Gelhaye, E., Rouhier, N., and Jacquot, J.P.** (2003). Evidence for a subgroup of thioredoxin h that requires GSH/Grx for its reduction. *FEBS Lett* **555**, 443-448.
- Gelhaye, E., Rouhier, N., and Jacquot, J.P.** (2004). The thioredoxin h system of higher plants. *Plant Physiol Biochem* **42**, 265-271.
- Giege, P., Rayapuram, N., Meyer, E.H., Grienenberger, J.M., and Bonnard, G.** (2004). CcmF(C) involved in cytochrome c maturation is present in a large sized complex in wheat mitochondria. *FEBS Lett* **563**, 165-169.
- Giegé, P., and Brennicke, A.** (1999). RNA editing in *Arabidopsis* mitochondria effects 441 C to U changes in ORFs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 15324-15329.
- Giegé, P., Heazlewood, J.L., Roessner-Tunali, U., Millar, A.H., Fernie, A.R., Leaver, C.J., and Sweetlove, L.J.** (2003). Enzymes of glycolysis are functionally associated with the mitochondrion in *Arabidopsis* cells. *Plant Cell* **15**, 2140-2151.
- Glick, B.S., Brandt, A., Cunningham, K., Muller, S., Hallberg, R.L., and Schatz, G.** (1992). Cytochromes c1 and b2 are sorted to the intermembrane space of yeast mitochondria by a stop-transfer mechanism. *Cell* **69**, 809-822.

- Goldman, B.S., Beck, D.L., Monika, E.M., and Kranz, R.G.** (1998). Transmembrane heme delivery systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 5003-5008.
- Goldman, B.S., Beckman, D.L., Bali, A., Monika, E.M., Gabbert, K.K., and Kranz, R.G.** (1997). Molecular and immunological analysis of an ABC transporter complex required for cytochrome c biogenesis. *J. Mol. Biol.* **268**, 724-738.
- Gonzalez, D.H., Bonnard, G., and Grienenberger, J.M.** (1993). A gene involved in the biogenesis of c-type cytochromes is co-transcribed with a ribosomal protein gene in wheat mitochondria. *Curr. Genet.* **21**, 248-255.
- Goodall, G.J., Wiebauer, K., and Filipowicz, W.** (1990). Analysis of pre-mRNA processing in transfected plant protoplasts. *Methods Enzymol.* **181**, 148-161.
- Gray, M.W.** (2000). Mitochondrial genes on the move. *Nature* **408**, 302-303, 305.
- Gray, M.W., and Doolittle, W.F.** (1982). Has the endosymbiot hypothesis been proven ? *Microbiol. Rev.* **46**, 1-42.
- Gray, M.W., Burger, G., and Lang, B.F.** (1999). Mitochondrial evolution. *Science* **283**, 1476-1481.
- Grovc, J., Busby, S., and Cole, J.** (1996). The role of the genes *nrf* EFG and *ccmFH* in cytochrome c biosynthesis in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* **252**, 332-341.
- Gruska, I., Jekabsons, W., and Schuster, W.** (1995). *Oenothera* mitochondrial orf454, a gene involved in cytochrome c biogenesis corresponds to orf169 and orf322 of *Marchantia*. *Mol. Gen. Genet.* **247**, 529-536.
- Gualberto, J.M., Lamattina, L., Bonnard, G., Weil, J.H., and Grienenberger, J.M.** (1989). RNA editing in wheat mitochondria results in the conservation of protein sequences. *Nature* **341**, 660-662.
- Gupta, R., He, Z., and Luan, S.** (2002). Functional relationship of cytochrome c(6) and plastocyanin in *Arabidopsis*. *Nature* **417**, 567-571.
- Ha, S.B., Smith, A.P., Howden, R., Dietrich, W.M., Bugg, S., O'Connell, M.J., Goldsbrough, P.B., and Cobbett, C.S.** (1999). Phytochelatin synthase genes from *Arabidopsis* and the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Plant Cell* **11**, 1153-1164.
- Hamel, P.P., Dreyfuss, B.W., Xie, Z., Gabilly, S.T., and Merchant, S.** (2003). Essential histidine and tryptophan residues in CcsA, a system II polytopic cytochrome c biogenesis protein. *J Biol Chem* **278**, 2593-2603.
- 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.
- Handa, H., Bonnard, G., and Grienenberger, J.M.** (1996). The rapeseed mitochondrial gene encoding a homologue of the bacterial Ccl₁ is divided into two independently transcribed reading frames. *Mol. Gen. Genet.* **252**, 292-302.
- Hartman, H., Syvanen, M., and Buchanan, B.B.** (1990). Contrasting evolutionary histories of chloroplast thioredoxins f and m. *Mol Biol Evol* **7**, 247-254.
- Henze, K., and Martin, W.** (2001). How do mitochondrial genes get into the nucleus? *Trends Genet* **17**, 383-387.
- Herrmann, J.M., Neupert, W., and Stuart, R.A.** (1997). Insertion into the mitochondrial inner membrane of a polytopic protein, the nuclear-encoded Oxa1p. *Embo J* **16**, 2217-2226.
- Hochkoeppler, A., Jenney, F.E., Jr., Lang, S.E., Zannoni, D., and Daldal, F.** (1995). Membrane-associated cytochrome cy of *Rhodobacter capsulatus* is an electron carrier from the cytochrome bc₁ complex to the cytochrome c oxidase during respiration. *J Bacteriol* **177**, 608-613.

- Holmgren, A.** (1979). Thioredoxin catalyzes the reduction of insulin disulfides by dithiothreitol and dihydrolipoamide. *J Biol Chem* **254**, 9627-9632.
- Holmgren, A.** (1985). Thioredoxin. *Annu Rev Biochem* **54**, 237-271.
- Holmgren, A., Soderberg, B.O., Eklund, H., and Branden, C.I.** (1975). Three-dimensional structure of *Escherichia coli* thioredoxin-S2 to 2.8 Å resolution. *Proc Natl Acad Sci USA* **72**, 2305-2309.
- Howe, G., and Merchant, S.** (1992). The biosynthesis of membrane and soluble plastidic c-type cytochromes of *Chlamydomonas reinhardtii* is dependent on multiple common gene products. *Embo J* **11**, 2789-2801.
- Hussain, H., Grove, J., Griffiths, L., Busby, S., and Cole, J.** (1994). A seven-gene operon essential for formate-dependent nitrite reduction to ammonia by enteric bacteria. *Mol Microbiol* **12**, 153-163.
- Hwang, C., Sinskey, A.J., and Lodish, H.F.** (1992). Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum. *Science* **257**, 1496-1502.
- Ibbi-Nivol, C., Crooke, H., Griffiths, L., Grove, J., Hussain, H., Pommier, J., Mejean, V., and Cole, J.A.** (1994). A reassessment of the range of c-type cytochromes synthesized by *Escherichia coli* K-12. *FEMS Microbiol. Lett.* **119**, 89-94.
- Itani, K., and Handa, H.** (1998). Rapeseed mitochondrial ccb206, a gene involved in cytochrome c biogenesis, is co-transcribed with the nad3 and rps12 genes: organization, transcription, and RNA editing of the nad3/rps12/ccb206 locus. *Curr. Genet.* **34**, 318-325.
- Iwata, S., Lee, J.W., Okada, K., Lee, J.K., Iwata, M., Rasmussen, B., Link, T.A., Ramaswamy, S., and Jap, B.K.** (1998). Complete structure of the 11-subunit bovine mitochondrial cytochrome bc₁ complex. *Science* **281**, 64-71.
- Jacquot, J.P., Lancelin, J.M., and Meyer, Y.** (1997). Thioredoxins : structure and function in plant cells. *New Physiol.* **136**, 543-570.
- Jacquot, J.P., Rivera-Madrid, R., Marinho, P., Kollarova, M., Le Marechal, P., Miginiac-Maslow, M., and Meyer, Y.** (1994). *Arabidopsis thaliana* NAPHP thioredoxin reductase. cDNA characterization and expression of the recombinant protein in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **235**, 1357-1363.
- Jansch, L., Kruff, V., Schmitz, U.K., and Braun, H.P.** (1996). New insights into the composition, molecular mass and stoichiometry of the protein complexes of plant mitochondria. *Plant J.* **9**, 357-368.
- Jekabsons, W., and Schuster, W.** (1995). orf250 encodes a second subunit of an ABC-type heme transporter in *Oenothera* mitochondria. *Mol. Gen. Genet.* **246**, 166-173.
- Jeng, M.F., Campbell, A.P., Begley, T., Holmgren, A., Case, D.A., Wright, P.E., and Dyson, H.J.** (1994). High-resolution solution structures of oxidized and reduced *Escherichia coli* thioredoxin. *Structure* **2**, 853-868.
- Jenney, F.E., Jr., and Daldal, F.** (1993). A novel membrane-associated c-type cytochrome, cyt cy, can mediate the photosynthetic growth of *Rhodobacter capsulatus* and *Rhodobacter sphaeroides*. *Embo J* **12**, 1283-1292.
- Jung, C.H., and Thomas, J.A.** (1996). S-glutathiolated hepatocyte proteins and insulin disulfides as substrates for reduction by glutaredoxin, thioredoxin, protein disulfide isomerase, and glutathione. *Arch Biochem Biophys* **335**, 61-72.
- Kamitani, S., Akiyama, Y., and Ito, K.** (1992). Identification and characterization of an *Escherichia coli* gene required for the formation of correctly folded alkaline phosphatase, a periplasmic enzyme. *Embo J* **11**, 57-62.

- Kereszt, A., Slaska-Kiss, K., Putnoky, P., Banfalvi, Z., and Kondorosi, A.** (1995). The cycHJKL genes of *Rhizobium meliloti* involved in cytochrome c biogenesis are required for "respiratory" nitrate reduction ex planta and for nitrogen fixation during symbiosis. *Mol Gen Genet* **247**, 39-47.
- Kobayashi, T., and Ito, K.** (1999). Respiratory chain strongly oxidizes the CXXC motif of DsbB in the *Escherichia coli* disulfide bond formation pathway. *Embo J* **18**, 1192-1198.
- Koehler, C.M., Jarosch, E., Tokatlidis, K., Schmid, K., Schweyen, R.J., and Schatz, G.** (1998). Import of mitochondrial carriers mediated by essential proteins of the intermembrane space. *Science* **279**, 369-373.
- Konrad, A., Banze, M., and Follmann, H.** (1996). Mitochondria of plant leaves contain two thioredoxins. Completion of the thioredoxin profile of higher plant. *J. plant physiol.* **149**, 317-321.
- Kranz, R.G., Lill, R., Goldman, B., Bonnard, G., and Merchant, S.** (1998). Molecular mechanisms of cytochrome c biogenesis: three distinct systems. *Mol. Microbiol.* **29**, 383-396.
- Kranz, R.G.** (1989). Isolation of mutants and genes involved in cytochromes c biosynthesis in *Rhodobacter capsulatus*. *Journal of Bacteriology* **171**, 456-464.
- Kranz, R.G., Beckett, C.S., and Goldman, B.S.** (2002). Genomic analyses of bacterial respiratory and cytochrome c assembly systems: *Bordetella* as a model for the system II cytochrome c biogenesis pathway. *Res Microbiol* **153**, 1-6.
- Krause, G., Lundstrom, J., Barea, J.L., Pueyo de la Cuesta, C., and Holmgren, A.** (1991). Mimicking the active site of protein disulfide-isomerase by substitution of proline 34 in *Escherichia coli* thioredoxin. *J Biol Chem* **266**, 9494-9500.
- Kubo, T., Nishizawa, S., Sugawara, A., Itchoda, N., Estiati, A., and Mikami, T.** (2000). The complete nucleotide sequence of the mitochondrial genome of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) reveals a novel gene for tRNA(Cys)(GCA). *Nucleic Acids Res* **28**, 2571-2576.
- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage and structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Laloi, C., Rayapuram, N., Chartier, Y., Grienberger, J.M., Bonnard, G., and Meyer, Y.** (2001). Identification and characterization of a mitochondrial thioredoxin system in plants. *Proc Natl Acad Sci USA.* **98**, 14144-14149.
- Lam, E., and del Pozo, O.** (2000). Caspase-like protease involvement in the control of plant cell death. *Plant Mol Biol* **44**, 417-428.
- Lamattina, L., Gonzalez, D., Gualberto, J.M., and Grienberger, J.M.** (1993). Higher plant mitochondria encode an homologue of the nuclear-coded 30 kDa subunit of bovine mitochondrial complex I. *Eur. J. Biochem.* **217**, 831-838.
- Lancelin, J.M., Guilhaudis, L., Krimm, I., Blackledge, M.J., Marion, D., and Jacquot, J.P.** (2000). NMR structures of thioredoxin m from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proteins* **41**, 334-349.
- Lang, B.F., Seif, E., Gray, M.W., O'Kelly, C.J., and Burger, G.** (1999). A comparative genomics approach to the evolution of eukaryotes and their mitochondria. *J Eukaryot Microbiol* **46**, 320-326.
- Lang, B.F., Burger, G., O'Kelly, C.J., Cedergren, R., Golding, G.B., Lemieux, C., Sankoff, D., Turmel, M., and Gray, M.W.** (1997). An ancestral mitochondrial DNA resembling a eubacterial genome in miniature. *Nature* **387**, 493-496.

- Lang, S.E., Jenney, F.E.J., and Daldal, F.** (1996). *Rhodobacter capsulatus* Cych : a bipartite gene product with pleiotropic effects on the biogenesis of structurally different c-type cytochromes. *Journal of Bacteriology* **178**, 5279-5290.
- Leblanc, C., Boyen, C., Richard, O., Bonnard, G., Grienenberger, J.M., and Kloareg, B.** (1995). Complete sequence of the mitochondrial DNA of the rhodophyte *Chondrus crispus* (Gigartinales). gene content and genome organization. *J. Mol. Biol.* **250**, 484-495.
- Lennartz, K., Plucken, H., Seidler, A., Westhoff, P., Bechtold, N., and Meierhoff, K.** (2001). HCF164 encodes a thioredoxin-like protein involved in the biogenesis of the cytochrome b(6)f complex in Arabidopsis. *Plant Cell* **13**, 2539-2551.
- Levitan, A., Danon, A., and Lisowsky, T.** (2004). Unique features of plant mitochondrial sulfhydryl oxidase. *J Biol Chem* **279**, 20002-20008.
- Li, L.Y., Luo, X., and Wang, X.** (2001). Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* **412**, 95-99.
- Lin, X., Kaul, S., Rounsley, S., Shea, T.P., Benito, M.I., Town, C.D., Fujii, C.Y., Mason, T., Bowman, C.L., Barnstead, M., Feldblyum, T.V., Buell, C.R., Ketchum, K.A., Lee, J., Ronning, C.M., Koo, H.L., Moffat, K.S., Cronin, L.A., Shen, M., Pai, G., Van Aken, S., Umayam, L., Tallon, L.J., Gill, J.E., Venter, J.C., et al.** (1999). Sequence and analysis of chromosome 2 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **402**, 761-768.
- Liu, X., Kim, C.N., Yang, J., Jemmerson, R., and Wang, X.** (1996). Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* **86**, 147-157.
- Mackenzie, S.A., and McIntosh, L.** (1999). Higher Plant Mitochondria. *Plant Cell* **11**, 571-585.
- Marcus, F., Chamberlain, S.H., Chu, C., Masiarz, F.R., Shin, S., Yee, B.C., and Buchanan, B.B.** (1991). Plant thioredoxin h: an animal-like thioredoxin occurring in multiple cell compartments. *Arch Biochem Biophys* **287**, 195-198.
- Martin, J., Mahlke, K., and Pfanner, N.** (1991). Role of an energized inner membrane in mitochondrial protein import. Delta psi drives the movement of presequences. *J Biol Chem* **266**, 18051-18057.
- McCoubrey, W.K., Jr., Huang, T.J., and Maines, M.D.** (1997). Heme oxygenase-2 is a hemoprotein and binds heme through heme regulatory motifs that are not involved in heme catalysis. *J Biol Chem* **272**, 12568-12574.
- Meinke, D.W.** (1994). Seed development in *Arabidopsis thaliana*. In *Arabidopsis*, E.M. Meyerowitz and C.R. Somerville, eds (New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press), pp. 253-295.
- Meister, A., and Anderson, M.E.** (1983). Glutathione. *Annu Rev Biochem* **52**, 711-760.
- Menand, B., Marechal-Drouard, L., Sakamoto, W., Dietrich, A., and Wintz, H.** (1998). A single gene of chloroplast origin codes for mitochondrial and chloroplastic methionyl-tRNA synthetase in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 11014-11019.
- Menassa, R., El-Rouby, N., and Brown, G.G.** (1997). An open reading frame for a protein involved in cytochrome c biogenesis is split into two parts in *Brassica* mitochondria. *Curr. Genet.* **31**, 70-79.
- Mestres-Ortega, D., and Meyer, Y.** (1999). The *Arabidopsis thaliana* genome encodes at least four thioredoxins m and a new prokaryotic-like thioredoxin. *Gene* **240**, 307-316.

- Metheringham, R., Tyson, K.L., Crooke, H., Missiakas, D., Raina, S., and Cole, J.A.** (1996). Effects of mutations in genes for proteins involved in disulphide bond formation in the periplasm on the activities of anaerobically induced electron transfer chains in *Escherichia coli* K12. *Mol Gen Genet* **253**, 95-102.
- Meyer, Y., Vignols, F., and Reichheld, J.P.** (2002). Classification of plant thioredoxins by sequence similarity and intron position. *Methods Enzymol* **347**, 394-402.
- Missiakas, D., Georgopoulos, C., and Raina, S.** (1994). The *Escherichia coli* dsbC (xprA) gene encodes a periplasmic protein involved in disulfide bond formation. *Embo J* **13**, 2013-2020.
- Mittard, V., Blackledge, M.J., Stein, M., Jacquot, J.P., Marion, D., and Lancelin, J.M.** (1997). NMR solution structure of an oxidised thioredoxin h from the eukaryotic green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eur J Biochem* **243**, 374-383.
- Moller, I.M.** (2002). A new dawn for plant mitochondrial NAD(P)H dehydrogenases. *Trends Plant Sci* **7**, 235-237.
- Monika, E.M., Goldman, B.S., Beckman, D.L., and Kranz, R.G.** (1997). A thiorreduction pathway tethered to the membrane for periplasmic cytochromes c biogenesis; in vitro and in vivo studies. *J. Mol. Biol.* **271**, 679-692.
- Myers, C.R., and Myers, J.M.** (1992). Localization of cytochromes to the outer membrane of anaerobically grown *Shewanella putrefaciens* MR-1. *J Bacteriol* **174**, 3429-3438.
- Nakamoto, S.S., Hamel, P., and Merchant, S.** (2000). Assembly of chloroplast cytochromes b and c. *Biochimie* **82**, 603-614.
- Nakazono, M., Ito, Y., Tsutsumi, N., and Hirai, A.** (1996). The gene for a subunit of an ABC-type heme transporter is transcribed together with the gene for subunit 6 of NADH dehydrogenase in rice mitochondria. *Curr. Genet.* **29**, 412-416.
- Nargang, F.E., Drygas, M.E., Kwong, P.L., Nicholson, D.W., and Neupert, W.** (1988). A mutant of *Neurospora crassa* deficient in cytochrome c heme lyase activity cannot import cytochrome c into mitochondria. *J Biol Chem* **263**, 9388-9394.
- Neuburger, M., Journet, E.P., Bligny, R., Carde, J.P., and Douce, R.** (1982). Purification of plant mitochondria by isopycnic centrifugation in density gradients of Percoll. *Arch. Biochem. Biophys.* **217**, 312-323.
- Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D., and Ehrhardt, W.** (1988). Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* **9**, 255-262.
- Nicastro, G., De Chiara, C., Pedone, E., Tato, M., Rossi, M., and Bartolucci, S.** (2000). NMR solution structure of a novel thioredoxin from *Bacillus acidocaldarius* possible determinants of protein stability. *Eur J Biochem* **267**, 403-413.
- Nicholson, D.W., and Neupert, W.** (1989). Import of cytochrome c into mitochondria : Reduction of heme mediated by NADH and flavin nucleotides, is obligatory for its covalent linkage to apocytochrome c. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 4340-4344.
- Noctor, G., and Foyer, C.H.** (1998). Ascorbate and Glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **49**, 249-279.
- Notsu, Y., Masood, S., Nishikawa, T., Kubo, N., Akiduki, G., Nakazono, M., Hirai, A., and Kadowaki, K.** (2002). The complete sequence of the rice (*Oryza sativa* L.) mitochondrial genome: frequent DNA sequence acquisition and loss during the evolution of flowering plants. *Mol Genet Genomics* **268**, 434-445.
- Nugent, J.M., and Palmer, J.D.** (1991). RNA-mediated transfer of the gene coxII from the mitochondrion to the nucleus during flowering plant evolution. *Cell* **66**, 473-481.

- Oda, K., Yamato, K., Ohta, E., Nakamura, Y., Takemura, M., Nozato, N., Akashi, K., Kanegae, T., Ogura, Y., Kohchi, T., and Ohyama, K.** (1992). Gene organization deduced from the complete sequence of liverwort *Marchantia polymorpha* mitochondrial DNA - A primitive form of plant mitochondrial genome. *J. Mol. Biol.* **223**, 1-7.
- Ohta, N., Sato, N., and Kuroiwa, T.** (1998). Structure and organization of the mitochondrial genome of the unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae* deduced from the complete nucleotide sequence. *Nucleic Acids Res.* **26**, 5190-5298.
- Okimoto, R., Macfarlane, J.L., Clary, D.O., and Wolstenholme, D.R.** (1992). The mitochondrial genomes of two nematodes, *Caenorhabditis elegans* and *Ascaris suum*. *Genetics* **130**, 471-498.
- Page, M., D., Sambongi, Y., and Ferguson, S., J.** (1998). Contrasting routes of c-type cytochrome assembly in mitochondria, chloroplasts and bacteria. *Trends Biochem. Sci.* **23**, 103-108.
- Page, M.D., and Ferguson, S.J.** (1995). Cloning and sequence analysis of *cycH* gene from *Paracoccus denitrificans*: the *cycH* gene product is required for assembly of all c-type cytochromes, including cytochrome c1. *Mol Microbiol* **15**, 307-318.
- Page, M.D., and Ferguson, S.J.** (1997). *Paracoccus denitrificans* CcmG is a periplasmic protein-disulfide oxidoreductase required for c- and aa3-type cytochrome biogenesis; evidence for a reductase role in vivo. *Mol. Microbiol.* **24**, 977-990.
- Page, M.D., Pearce, D.A., Norris, H.A., and Ferguson, S.J.** (1997). The *Paracoccus denitrificans* *ccmA*, *B* and *C* genes: cloning and sequencing, and analysis of the potential of their products to form a haem or apo- c-type cytochrome transporter. *Microbiology - UK* **143**, 563-576.
- Page, M.L., Hamel, P.P., Gabilly, S.T., Zegzouti, H., Perea, J.V., Alonso, J.M., Ecker, J.R., Theg, S.M., Christensen, S.K., and Merchant, S.** (2004). A homolog of prokaryotic thiol disulfide transporter CcdA is required for the assembly of the cytochrome b6f complex in *Arabidopsis chloroplasts*. *J Biol Chem* **279**, 32474-32482.
- Pritchard, A.E., Seihlamer, J.J., Mahalingam, R., Sable, C.L., Venuti, S.E., and Cummings, D.J.** (1990). Nucleotide sequence of the mitochondrial genome of *Paramecium*. *Nucleic Acids Res.* **18**, 173-180.
- Puig, O., Caspary, F., Rigaut, G. Rutz, B. Bouveret E, Bragado-Nilsson, E., Wilm, M., Seraphin, B.** (2001). The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods.* **24**, 218-229.
- Ramseier, T.M., Winteler, H.V., and Hennecke, H.** (1991). Discovery and sequence analysis of bacterial genes involved in the biogenesis of c-type cytochromes. *J. Biol. Chem.* **266**, 7793-7803.
- Rayapuram, N.** (2003). Insights into understanding the maturation of c-type cytochromes in plant mitochondria (Strasbourg: ULP).
- Reichheld, J.P., Mestres-Ortega, D., Laloi, C., and Meyer, Y.** (2002). The multigenic family of thioredoxin h in *Arabidopsis thaliana* : specific expression and stress response. *Plant Physiol. Biochem* **40**, 685-690.
- Reid, E., Cole, J., and Eaves, D.J.** (2001). The *Escherichia coli* CcmG protein fulfils a specific role in cytochrome c assembly. *Biochem J* **355**, 51-58.
- Ren, Q., and Thöny-Meyer, L.** (2001). Physical Interaction of CcmC with Heme and the Heme Chaperone CcmE during Cytochrome c Maturation. *J Biol Chem* **276**, 32591-32596.

- Ren, Q., Ahuja, U., and Thöny-Meyer, L.** (2002). A bacterial cytochrome c heme lyase. CcmF forms a complex with the heme chaperone CcmE and CcmH but not with apocytochrome c. *J Biol Chem* **277**, 7657-7663.
- Rietsch, A., Belin, D., Martin, N., and Beckwith, J.** (1996). An in vivo pathway for disulfide bond isomerization in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 13048-13053.
- Ritz, D., Bott, M., and Hennecke, H.** (1993). Formation of several bacterial C-Type cytochromes requires a novel membrane-anchored protein that faces the periplasm. *Mol. Microbiol.* **9**, 729-740.
- Ritz, D., Thöny-Meyer, L., and Hennecke, H.** (1995). The cychJKL gene cluster plays an essential role in the biogenesis of c-type cytochromes in *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol. Gen. Genet.* **247**, 27-38.
- Rivera-Madrid, R., Mestres, D., Marinho, P., Jacquot, J.P., Decottignies, P., Miginiac-Maslow, M., and Meyer, Y.** (1995). Evidence for five divergent thioredoxin h sequences in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 5620-5624.
- Ruelland, E., and Miginiac-Maslow, M.** (1999). Regulation of chloroplast enzyme activities by thioredoxins: activation or relief from inhibition? *Trends Plant Sci* **4**, 136-141.
- Saarinen, M., Gleason, F.K., and Eklund, H.** (1995). Crystal structure of thioredoxin-2 from *Anabaena*. *Structure* **3**, 1097-1108.
- Sabahi, A., and Wittung-Stafshede, P.** (2002). Unfolding the unique c-type heme protein, *Chlamydomonas reinhardtii* cytochrome f. *Biochim Biophys Acta* **1596**, 163-171.
- Sadowski, J., Gaubier, P., Delseny, M., and Quiros, C.F.** (1996). Genetic and physical mapping in Brassica diploid species of a gene cluster defined in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.* **251**, 298-306.
- Sahrawy, M., Hecht, V., Lopez-Jaramillo, J., Chueca, A., Chartier, Y., and Meyer, Y.** (1996). Intron position as an evolutionary marker of thioredoxins and thioredoxin domains. *J Mol Evol* **42**, 422-431.
- Sakamoto, W., Spielewoy, N., Bonnard, G., Murata, M., and Wintz, H.** (2000). Mitochondrial localization of AtOXA1, an *Arabidopsis* homologue of yeast Oxa1p involved in the insertion and assembly of protein complexes in mitochondrial inner membrane. *Plant Cell Physiol.* **41**, 1157-1163.
- Sambongi, Y., and Ferguson, S.J.** (1994a). Specific thiol compounds complement deficiency in c-type cytochrome biogenesis in *Escherichia coli* carrying a mutation in a membrane-bound disulphide isomerase-like protein. *FEBS Lett* **353**, 235-238.
- Sambongi, Y., and Ferguson, S.J.** (1994b). Synthesis of holo *Paracoccus denitrificans* cytochrome c550 requires targeting to the periplasm whereas that of holo *Hydrogenobacter thermophilus* cytochrome c552 does not. Implications for c-type cytochrome biogenesis. *FEBS Lett* **340**, 65-70.
- Sambongi, Y., and Ferguson, S.J.** (1996). Mutants of *Escherichia coli* lacking disulphide oxidoreductases DsbA and DsbB cannot synthesise an exogenous monohaem c-type cytochrome except in the presence of disulphide compounds. *FEBS Lett* **398**, 265-268.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T.** (1989). *Molecular cloning : A laboratory manual.*
- Sanchez-Fernandez, R., Davies, T.G., Coleman, J.O., and Rea, P.A.** (2001). The *Arabidopsis thaliana* ABC protein superfamily, a complete inventory. *J Biol Chem* **276**, 30231-30244.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.

- Schägger, H., and von Jagow, G.** (1991). Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal. Biochem.* **199**, 223-231.
- Schägger, H., and Pfeiffer, K.** (2000). Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *Embo J* **19**, 1777-1783.
- Schiott, T., Throne-Holst, M., and Hederstedt, L.** (1997a). *Bacillus subtilis* CcdA-defective mutants are blocked in a late step of cytochrome c biogenesis. *J Bacteriol* **179**, 4523-4529.
- Schiott, T., von Wachenfeldt, C., and Hederstedt, L.** (1997b). Identification and characterization of the ccdA gene, required for cytochrome c synthesis in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **179**, 1962-1973.
- Schulenberg, B., Goodman, T.N., Aggeler, R., Capaldi, R.A., and Patton, W.F.** (2004). Characterization of dynamic and steady-state protein phosphorylation using a fluorescent phosphoprotein gel stain and mass spectrometry. *Electrophoresis* **25**, 2526-2532.
- Schulz, H., Hennecke, H., and Thöny-Meyer, L.** (1998). Prototype of a heme chaperone essential for cytochrome c maturation. *Science* **281**, 1197-1200.
- Schulz, H., Fabianek, R., Pellicoli, E., Hennecke, H., and Thöny-Meyer, L.** (1999). Heme transfer to the heme chaperone CcmE during cytochrome c maturation requires the CcmC protein, which may function independently of the ABC-transporter CcmAB. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 6462-6467.
- Schurmann, P., and Jacquot, J.P.** (2000). Plant Thioredoxin Systems Revisited. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **51**, 371-400.
- Schuster, W.** (1994). The highly edited orf206 in *Oenothera* mitochondria may encode a component of a heme transporter involved in cytochrome c biogenesis. *Plant Mol Biol* **25**, 33-42.
- Schuster, W., Combettes, B., Flieger, K., and Brennicke, A.** (1993). A plant mitochondrial gene encodes a protein involved in cytochrome-c biogenesis. *Mol. Gen. Genet.* **239**, 49-57.
- Serrato, A.J., and Cejudo, F.J.** (2003). Type-h thioredoxins accumulate in the nucleus of developing wheat seed tissues suffering oxidative stress. *Planta* **217**, 392-399.
- Setterdahl, A.T., Goldman, B.S., Hirasawa, M., Jacquot, P., Smith, A.J., Kranz, R.G., and Knaff, D.B.** (2000). Oxidation-reduction properties of disulfide-containing proteins of the *Rhodobacter capsulatus* cytochrome c biogenesis system. *Biochemistry* **39**, 10172-10176.
- Shikanai, T., Nakata, S., Harada, K., and Watanabe, K.** (1996). Analysis of the heterogeneous transcripts of the highly edited orf206 in tomato mitochondria. *Plant Cell Physiol* **37**, 692-696.
- Sies, H.** (1999). Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic Biol Med* **27**, 916-921.
- Singh, M., Hamel, N., Menassa, R., Li, X.Q., Young, B., Jean, M., Landry, B.S., and Brown, G.G.** (1996). Nuclear genes associated with a single *Brassica* CMS restorer locus influence transcript of three different mitochondrial gene regions. *Genetics* **143**, 505-516.
- Sinha, N., and Ferguson, S.J.** (1998). An *Escherichia coli* ccm (cytochrome c maturation) deletion strain substantially expresses *Hydrogenobacter thermophilus* cytochrome c552 in the cytoplasm: availability of haem influences cytochrome c552 maturation. *FEMS Microbiol Lett* **161**, 1-6.

- Sodano, P., Xia, T.H., Bushweller, J.H., Bjornberg, O., Holmgren, A., Billeter, M., and Wuthrich, K.** (1991). Sequence-specific ¹H n.m.r. assignments and determination of the three-dimensional structure of reduced *Escherichia coli* glutaredoxin. *J Mol Biol* **221**, 1311-1324.
- Soriano, G.M., Ponamarev, M.V., Carrell, C.J., Xia, D., Smith, J.L., and Cramer, W.A.** (1999). Comparison of the cytochrome bc₁ complex with the anticipated structure of the cytochrome b₆f complex: Le plus ca change le plus c'est la meme chose. *J Bioenerg Biomembr* **31**, 201-213.
- Spielewoy, N., Schulz, H., Grienenberger, J.M., Thöny-Meyer, L., and Bonnard, G.** (2001). CCME, a nuclear-encoded heme-binding protein involved in cytochrome c maturation in plant mitochondria. *J. Biol. Chem.* **276**, 5491-5497.
- Stein, J.C., and Hansen, G.** (1999). Mannose induces an endonuclease responsible for DNA laddering in plant cells. *Plant Physiol* **121**, 71-80.
- Steiner, H., Zollner, A., Haid, A., Neupert, W., and Lill, R.** (1996). Heme binding to a conserved Cys-Pro-Val motif is crucial for the catalytic function of mitochondrial heme lyases. *J. Biol. Chem.* **271**, 32605-32611.
- Struglics, A., Fredlund, K.M., Rasmusson, A.G., and Moller, I.M.** (1993). The presence of a short redox chain in membrane of intact potato tuber peroxisome and the association of malate dehydrogenase with the peroxisomal membrane. *Physiologia Plantarum* **88**, 19-28.
- Stuart, R.A., Nicholson, D.W., Wienhues, U., and Neupert, W.** (1990). Import of apocytochrome c into the mitochondrial intermembrane space along a cytochrome c₁ sorting pathway. *J Biol Chem* **265**, 20210-20219.
- Stüber, D., Matile, H., and Garotta, G.** (1990). System for high-level production in *Escherichia coli* and rapid purification of recombinant proteins : application to epitope mapping, preparation of antibodies, and structure-function analysis. *Immunological Methods IV*, 121-152.
- 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. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 5099-5103.
- Sun, C., Berardi, M.J., and Bushweller, J.H.** (1998). The NMR solution structure of human glutaredoxin in the fully reduced form. *J Mol Biol* **280**, 687-701.
- Sun, Y.L., Zhao, Y., Hong, X., and Zhai, Z.H.** (1999). Cytochrome c release and caspase activation during menadione-induced apoptosis in plants. *FEBS Lett* **462**, 317-321.
- Thomas, J.A., Poland, B., and Honzatko, R.** (1995). Protein sulfhydryls and their role in the antioxidant function of protein S-thiolation. *Arch Biochem Biophys* **319**, 1-9.
- Thöny-Meyer, L.** (2002). Cytochrome c maturation: a complex pathway for a simple task? *Biochem Soc Trans* **30**, 633-638.
- Thöny-Meyer, L.** (1997). Biogenesis of respiratory cytochromes in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**, 337-376.
- Thöny-Meyer, L.** (2000). Haem-polypeptide interactions during cytochrome c maturation. *Biochim. Biophys. Acta* **1459**, 316-324.
- Thöny-Meyer, L., Loferer, H., Ritz, D., and Hennecke, H.** (1994). Bacterial genes and proteins involved in the biogenesis of c-type cytochromes and terminal oxidases. *Biochem. Biophys. Acta* **1187**, 260-263.
- Thöny-Meyer, L., Fischer, F., Kunzler, P., Ritz, D., and Hennecke, H.** (1995). *Escherichia coli* genes required for cytochrome c maturation. *Journal of Bacteriology* **177**, 4321-4326.

- Tomlinson, E.J., and Ferguson, S.J.** (2000). Conversion of a c type cytochrome to a b type that spontaneously forms in vitro from apo protein and heme: implications for c type cytochrome biogenesis and folding. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 5156-5160.
- Tong, J., and Margoliash, E.** (1998). Cytochrome c heme lyase activity of yeast mitochondria. *J Biol Chem* **273**, 25695-25702.
- Truscott, K.N., Brandner, K., and Pfanner, N.** (2003). Mechanisms of protein import into mitochondria. *Curr Biol* **13**, R326-337.
- Turba, A., Jetzek, M., and Ludwig, B.** (1995). Purification of *Paracoccus denitrificans* cytochrome c552 and sequence analysis of the gene. *Eur J Biochem* **231**, 259-265.
- Turmel, M., Otis, C., and Lemieux, C.** (2003). The mitochondrial genome of *Chara vulgaris*: insights into the mitochondrial DNA architecture of the last common ancestor of green algae and land plants. *Plant Cell* **15**, 1888-1903.
- Unseld, M., Marienfeld, J.R., Brandt, P., and Brennicke, A.** (1997). The mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana* contains 57 genes in 366,924 nucleotides. *Nature Genet.* **15**, 57-61.
- Uren, A.G., O'Rourke, K., Aravind, L.A., Pisabarro, M.T., Seshagiri, S., Koonin, E.V., and Dixit, V.M.** (2000). Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma. *Mol Cell* **6**, 961-967.
- Vanlerberghe, G.C., Day, D.A., Wiskich, J.T., Vanlerberghe, A.E., and McIntosh, L.** (1995). Alternative Oxidase Activity in Tobacco Leaf Mitochondria (Dependence on Tricarboxylic Acid Cycle-Mediated Redox Regulation and Pyruvate Activation). *Plant Physiol* **109**, 353-361.
- Vatamaniuk, O.K., Mari, S., Lu, Y.P., and Rea, P.A.** (1999). AtPCS1, a phytochelatin synthase from *Arabidopsis*: isolation and in vitro reconstitution. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 7110-7115.
- Vermel, M., Guermann, B., Delage, L., Grienenberger, J.M., Marechal-Drouard, L., and Gualberto, J.M.** (2002). A family of RRM-type RNA-binding proteins specific to plant mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 5866-5871.
- von Heijne, G., Steppuhn, J., and Herrmann, R.G.** (1989). Domain structure of mitochondrial and chloroplast targeting peptides. *Eur J Biochem* **180**, 535-545.
- von Wachenfeldt, C., and Hederstedt, L.** (1990). Bacillus subtilis 13-kilodalton cytochrome c-550 encoded by cccA consists of a membrane-anchor and a heme domain. *J Biol Chem* **265**, 13939-13948.
- Wain, R., Pertinhez, T.A., Tomlinson, E.J., Hong, L., Dobson, C.M., Ferguson, S.J., and Smith, L.J.** (2001). The cytochrome c fold can be attained from a compact apo state by occupancy of a nascent heme binding site. *J Biol Chem* **276**, 45813-45817.
- Walker, K.W., and Gilbert, H.F.** (1995). Oxidation of kinetically trapped thiols by protein disulfide isomerase. *Biochemistry* **34**, 13642-13650.
- Wang, X.** (2001). The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* **15**, 2922-2933.
- Weichsel, A., Gasdaska, J.R., Powis, G., and Montfort, W.R.** (1996). Crystal structures of reduced, oxidized, and mutated human thioredoxins: evidence for a regulatory homodimer. *Structure* **4**, 735-751.
- Weiss, H., Friedrich, T., Hofhaus, G., and Preis, D.** (1991). The respiratory-chain NADH dehydrogenase (complex I) of mitochondria. *Eur. J. Biochem.* **197**, 563-576.

- Werhahn, W., and Braun, H.P.** (2002). Biochemical dissection of the mitochondrial proteome from *Arabidopsis thaliana* by three-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis* **23**, 640-646.
- Werhahn, W., Niemeyer, A., Jansch, L., Kruff, V.V., Schmitz, U.K., and Braun, H.P.** (2001). Purification and Characterization of the Preprotein Translocase of the Outer Mitochondrial Membrane from *Arabidopsis*. Identification of Multiple Forms of TOM20. *Plant Physiol* **125**, 943-954.
- Wiedemann, N., Frazier, A.E., and Pfanner, N.** (2004). The protein import machinery of mitochondria. *J Biol Chem* **279**, 14473-14476.
- Wolff, G., Plante, I., Lang, B., Kück, U., and Burger, G.** (1994). Complete sequence of the mitochondrial DNA of the chlorophyte alga *Prototheca wickerhamii*. *J. Mol. Biol.* **237**, 75-86.
- Wolosiuk, R.A., Crawford, N.A., Yee, B.C., and Buchanan, B.B.** (1979). Isolation of three thioredoxins from spinach leaves. *J Biol Chem* **254**, 1627-1632.
- Wong, J.H., Kim, Y.B., Ren, P.H., Cai, N., Cho, M.J., Hedden, P., Lemaux, P.G., and Buchanan, B.B.** (2002). Transgenic barley grain overexpressing thioredoxin shows evidence that the starchy endosperm communicates with the embryo and the aleurone. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 16325-16330.
- Wood, P.M.** (1991). Why do c-type cytochromes exist? Reprise. *Biochim Biophys Acta* **1058**, 5-7.
- Wu, G., Delgado, M.J., Vargas, C., Davies, A.E., Poole, R.K., and Downie, J.A.** (1996). The cytochrome bc₁ complex but not CycM is necessary for symbiotic nitrogen fixation by *Rhizobium leguminosarum*. *Microbiology - UK* **142**, 3381-3388.
- Xia, B., Vlamis-Gardikas, A., Holmgren, A., Wright, P.E., and Dyson, H.J.** (2001). Solution structure of *Escherichia coli* glutaredoxin-2 shows similarity to mammalian glutathione-S-transferases. *J Mol Biol* **310**, 907-918.
- Xie, Z., and Merchant, S.** (1996). The plastid-encoded ccsA gene is required for heme attachment to chloroplast c-type cytochromes. *J. Biol. Chem.* **271**, 4632-4639.
- Xie, Z., Culler, D., Dreyfuss, B., W., Kuras, R., Wollman, F.-A., Girard-Bascou, J., and Merchant, S.** (1998). Genetic analysis of chloroplast c-type cytochrome assembly in *Chlamydomonas reinhardtii*: one chloroplast locus and at least four nuclear loci are required for heme attachment. *Genetics* **148**, 681-692.
- Yanish-Perron, C., Vieira, J., and Messing, J.** (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**, 109-119.
- Zapun, A., Bardwell, J.C., and Creighton, T.E.** (1993). The reactive and destabilizing disulfide bond of DsbA, a protein required for protein disulfide bond formation in vivo. *Biochemistry* **32**, 5083-5092.
- Zhang, L., and Guarente, L.** (1995). Heme binds to a short sequence that serves a regulatory function in diverse proteins. *EMBO J.* **14**, 313-320.
- Zhuo, D., Nguyen-Lowe, H.T., Subramanian, S., and Bonen, L.** (1999). The S7 ribosomal protein gene is truncated and overlaps a cytochrome c biogenesis gene in pea mitochondria. *Plant Mol Biol* **40**, 91-97.
- Zollner, A., Rodel, G., and Haid, A.** (1992). Molecular cloning and characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* CYT2 gene encoding cytochrome-c1-heme lyase. *Eur J Biochem* **207**, 1093-1100.