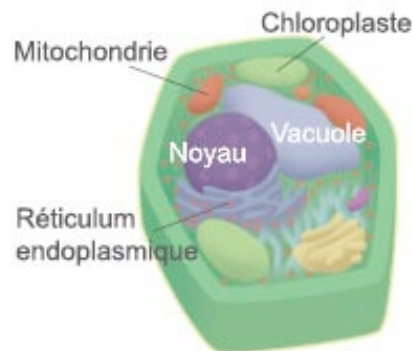


THÈSE DE DOCTORAT

présentée par **Romary Perrin** pour obtenir le titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ LOUIS PASTEUR
DANS LE DOMAINE
BIOLOGIE MOLÉCULAIRE VÉGÉTALE



Rôle de la polyadénylation dans la dégradation et la maturation des ARN des mitochondries de plantes supérieures

Soutenue le 19 octobre 2005 devant le jury composé de :

M. Mario Keller	Président
Mme Eliane Hajnsdorf	Rapporteur
M. Ian Small	Rapporteur
Mme Laurence Drouard	Directeur de thèse
M. Dominique Gagliardi	Membre invité

Discipline : Biologie moléculaire et cellulaire

Laboratoire : Institut de Biologie Moléculaire des Plantes

UPR 2357 CNRS, 12 rue du général Zimmer

RÔLE DE LA POLYADENYLATION DANS LA DÉGRADATION ET LA MATURATION DES ARN DES MITOCHONDRIES DE PLANTES SUPÉRIEURES

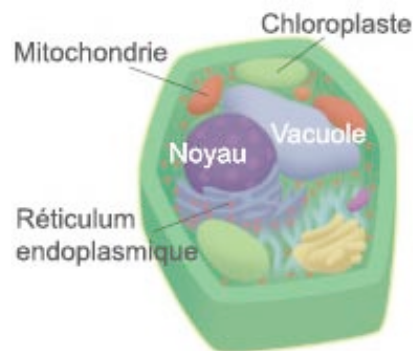
La mitochondrie, organite semi-autonome de la cellule eucaryotique, comporte son propre système génétique. Chez les plantes, la régulation du génome mitochondrial a principalement lieu au niveau post-transcriptionnel. Pour devenir fonctionnels, les transcrits précurseurs mitochondriaux sont intensivement modifiés par maturation des extrémités 5' et 3', épissage, et édition. En revanche, ils ne sont pas polyadénylés de façon constitutive. Or, il a été montré qu'un transcrit mitochondrial pouvait être polyadénylé et que sa polyadénylation était corrélée à sa déstabilisation *in vitro* et *in vivo*. Notre objectif était de mieux caractériser la polyadénylation des transcrits de la mitochondrie de plante et d'étudier son implication dans un mécanisme de dégradation des ARN mitochondriaux. Ce travail de thèse s'est déroulé selon trois axes : la cartographie des sites de polyadénylation des transcrits du gène *atp9* de la mitochondrie de *Solanum tuberosum*, l'identification de RNases impliquées dans la maturation et la dégradation des ARN mitochondriaux chez *Arabidopsis thaliana*, et l'étude de la maturation et la dégradation des ARN ribosomiques 18S à l'aide de plantes transgéniques modifiées dans l'expression de ces exonucléases.

En cartographiant les sites de polyadénylation par RT-PCR, nous avons montré que pour les transcrits du gène *atp9* de *S. tuberosum*, la majorité de ces sites sont situés aux extrémités 3' matures. Par une stratégie de génétique inverse, nous avons montré que deux exonucléases adressées à la mitochondrie et homologues de la PNPase et de la RNase II d'*E. coli* sont impliquées dans la maturation et la dégradation des ARN messagers mitochondriaux. Enfin, la caractérisation des intermédiaires de maturation et de dégradation des ARN ribosomiques 18S dans les plantes pour lesquelles l'expression de la PNPase était supprimée nous a permis de montrer que la polyadénylation joue un rôle dans leur maturation et leur dégradation.

Par ce travail, nous avons montré que la polyadénylation est impliquée non seulement dans la maturation et la dégradation des ARN messagers mitochondriaux, mais aussi d'un ARN ribosomique. Dans tous les cas, la polyadénylation permet le recrutement et l'attaque des extrémités 3' des ARN par la PNPase. Cette dernière caractéristique est commune aux systèmes procaryotiques et d'origine procaryotique possédant une PNPase. Récemment, il a été montré que l'exosome est recruté par un complexe responsable de la polyadénylation de certains ARN nucléaires de levure pour les dégrader. Il semble que le rôle originel de la polyadénylation dans le recrutement de complexes exonucléolytiques soit conservé dans des systèmes génétiques divers.

THÈSE DE DOCTORAT

présentée par **Romary Perrin** pour obtenir le titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ LOUIS PASTEUR
DANS LE DOMAINE
BIOLOGIE MOLÉCULAIRE VÉGÉTALE



Rôle de la polyadénylation dans la dégradation et la maturation des ARN des mitochondries de plantes supérieures

Soutenue le 19 octobre 2005 devant le jury composé de :

M. Mario Keller	Président
Mme Eliane Hajnsdorf	Rapporteur
M. Ian Small	Rapporteur
Mme Laurence Drouard	Directeur de thèse
M. Dominique Gagliardi	Membre invité

SOMMAIRE

I/INTRODUCTION GENERALE	1
I.1.Origine et diversité des génomes mitochondriaux	2
I.2.Fonctions de la mitochondrie dans le métabolisme cellulaire	3
I.3.Évolution et caractéristiques actuelles du génome mitochondrial de plante	4
I.3.1.Taille et capacité codante	5
I.3.2.Structure physique et gènes codés	6
I.4.Expression du génome mitochondrial de plante	9
I.4.1.Transcription des gènes mitochondriaux de plante	9
I.4.1.1.Unités transcriptionnelles	9
I.4.1.2.Les promoteurs des mitochondries de plante	10
I.4.1.3.Les ARN polymérase de mitochondries de plante	12
I.4.1.4.Cofacteurs de l'ARN polymérase mitochondriale	12
I.4.2.Mécanismes post-transcriptionnels	13
I.4.2.1.Epissage de l'ARN dans la mitochondrie de plante	14
I.4.2.2.L'édition des ARN de la mitochondrie de plante	15
I.4.2.3.Maturation en 5' et 3' des ARN mitochondriaux de plante	19
I.4.2.3.1.Maturation des ARNt	21
I.4.2.3.2.Maturation des ARNr	21
I.4.2.3.3.Maturation des ARNm	21
I.4.2.4.Addition aux extrémités 3' de nucléotides qui ne sont pas codés par le génome	23
I.4.2.5.Polyadénylation et stabilité des transcrits mitochondriaux	24
I.5.Dégradation des ARN et polyadénylation	26
I.5.1.Machinerie de dégradation et polyadénylation chez E. coli	26
I.5.1.1.Mécanismes de dégradation des ARN chez E. coli	26
I.5.1.1.1.La RNaseE	27

I.5.1.1.2. Le dégradosome d' <i>E. coli</i>	28
I.5.1.1.3. Rôle structural de la RNase E dans le dégradosome	29
I.5.1.1.4. Rôle de l'hélicase RhlB	30
I.5.1.1.5. La PNPase et la RNase II	31
I.5.1.1.6. D'autres partenaires protéiques du dégradosome	32
I.5.1.2. Polyadénylation des ARN chez <i>E. coli</i>	33
I.5.1.2.1. Fonction de la polyadénylation chez <i>E. coli</i>	34
I.5.1.2.2. Modulation de la polyadénylation chez <i>E. coli</i>	36
I.5.1.3. Mécanismes de dégradation et polyadénylation des ARN chez <i>E. coli</i> : résumé	37
I.5.2. Stabilité et polyadénylation des ARN dans le chloroplaste	38
I.5.2.1. Régulation de la stabilité des ARN chloroplastiques par la lumière	38
I.5.2.2. Modes de dégradation des ARN chloroplastiques	39
I.5.2.3. Polyadénylation des ARN chloroplastiques	40
I.5.2.3.1. Caractéristiques de la polyadénylation chloroplastique	41
I.5.2.3.2. Rôle de la polyadénylation dans le mécanisme de dégradation des ARN chloroplastiques	41
I.5.2.4. Endoribonucléases chloroplastiques	43
I.5.2.4.1. La RNase E/G	43
I.5.2.4.2. CSP41a	45
I.5.2.5. Enzyme(s) responsable(s) de la polyadénylation dans le chloroplaste	45
I.5.2.6. Exonucléases chloroplastiques	47
I.5.2.6.1. Polynucléotide phosphorylase (PNPase)	47
I.5.2.6.2. La Ribonucléase II/R	49
I.5.3. Machinerie de dégradation des ARN dans la mitochondrie de levure	49
I.5.4. Rôles de la polyadénylation des ARN dans la mitochondrie humaine	51
I.5.5. Rôle de la polyadénylation dans les mitochondries de trypanosomes	53
I.6. Travaux de thèse	54

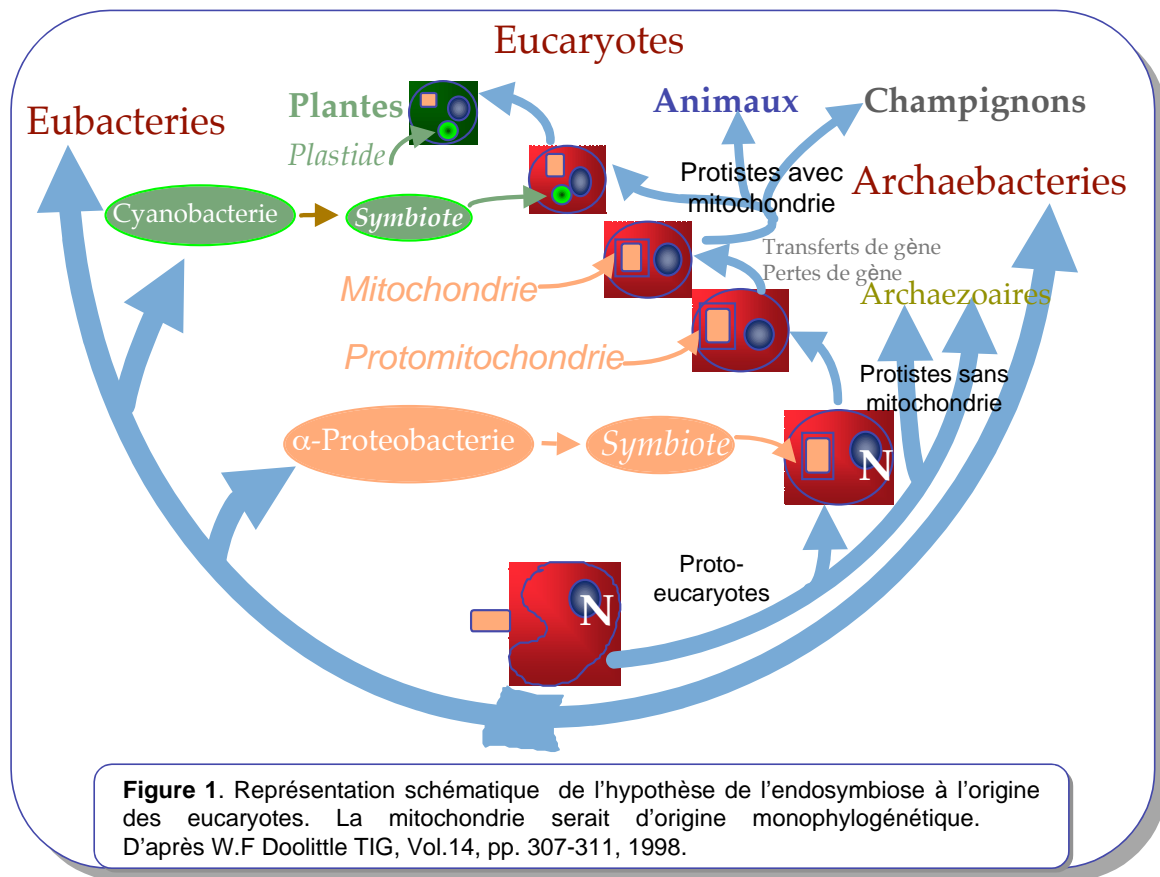
II/MATERIEL ET METHODES	58
II.1.MATERIEL	59
II.1.1.Matériel végétal	59
II.1.2.Oligonucléotides	59
II.1.3.Plasmide	59
II.1.4.Outils informatiques	60
II.2.METHODES	60
II.2.1.Techniques relatives à l'ADN	60
II.2.1.1.Electrophorèse non-dénaturante	60
II.2.1.2.Amplification d'ADN par PCR (« Polymerase Chain Reaction »)	61
II.2.1.3.Criblage de colonies par PCR	61
II.2.1.4.Purification de produits de PCR	62
II.2.1.5.Clonage direct d'un produit PCR	62
II.2.1.6.Préparation d'ADN plasmidique	63
II.2.1.7.Séquençage d'ADN	64
II.2.1.8.Marquage radioactif d'oligonucléotides	64
II.2.1.9.Southern Blot	65
II.2.1.10.Hybridation	65
II.2.1.11.Méthode de quantification des acides nucléiques	65
II.2.2.Techniques relatives à l'ARN	65
II.2.2.1.Extraction d'ARN mitochondriaux	65
II.2.2.2.Extraction d'ARN totaux	66
II.2.2.3.Traitement à la RNase H	66
II.2.2.4.Traitement à la DNase	66
II.2.2.5.Synthèse d'ADNc	67
II.2.2.6.cRT-PCR	67

II.2.2.7.cRT-PCR sur transcrits primaires	69
II.2.2.8.Synthèse d'ARN par transcription in vitro	70
II.2.2.9.Marquage de transcrits en 5'	71
II.2.2.10.Fractionnement par électrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes	71
II.2.2.11.Fractionnement par électrophorèse en gel d'agarose en conditions dénaturantes	72
II.2.2.12.Northern Blot	72
II.2.2.13.Hybridation	73
II.2.3.Techniques relatives aux mitochondries et aux protéines	73
II.2.3.1.Purification de mitochondries	73
II.2.3.2.Activité mitochondriale de dégradation d'ARN messenger	74
II.2.3.3.Chromatographie en couche mince	75
II.2.4.Techniques relatives aux plantes et à la purification de protéines surexprimées dans les plantes	76
II.2.4.1.Production de plantes transgéniques	76
II.2.4.2.Purification de protéines par la méthode TAP (Tandem Affinity Purification)	76
II.2.4.3.Test d'activité de la protéine RNase II-Tag	79
II.2.4.4.Localisation sub-cellulaire de protéines	79
II.2.4.5.Semis de graines d'Arabidopsis thaliana	79
III/Résultats	81
III.1.Les ARN messagers polyadénylés de mitochondries de plante supérieure sont dégradés par une activité exoribonucléasique 3'-5' qui progresse sans être gênée par des structures secondaires stables.	82
III.1.1Introduction	82
III.1.2.Identification d'ARN polyadénylés de la mitochondrie de <i>S. tuberosum</i>	83
III.1.2.1.Stratégie d'étude	83
III.1.2.2.Caractérisation de la polyadénylation de transcrits mitochondriaux	84
III.1.2.2.1.Polyadénylation des ARN messagers mitochondriaux	85

III.1.2.2.2.Polyadénylation des ARN de transfert et des ARN ribosomiques	87
III.1.2.2.3.Caractérisation des ARNm polyadénylés du gène atp9	89
III.1.3.Article 1	90
III.1.4.Eléments de discussion	97
III.1.4.1.Caractéristiques de la polyadénylation des ARN du gène atp9 de Solanum tuberosum	97
III.1.4.2.L'extension poly(A) doit être accessible à l'extrémité 3' pour que l'activité RNase 2 dégrade le substrat ARN	98
III.1.4.3.Il existe une taille optimale de l'extension poly(A) pour induire la dégradation d'un substrat ARN polyadénylé	100
III.1.4.4.Vers l'identification des éléments protéiques de l'activité RNase 2	101
III.2.Deux exonucléases agissent séquentiellement pour maturer les extrémités 3' des ARN messagers du gène mitochondrial atp9 d'Arabidopsis thaliana	104
III.2.1.Choix du matériel végétal	104
III.2.2.Gènes candidats	104
III.2.3.Stratégie d'étude	107
III.2.4.Article 2	108
III.2.5.Résultats complémentaires	116
III.2.5.1.Phénotype des plantes PNP-	116
III.2.5.2.Phénotype des plantes mutantes rnaII-1	118
III.2.5.3.Analyses moléculaires des ARN mitochondriaux des mutants PNP-	120
III.2.5.4.Schéma des rôles de AtmtPNPase et AtmtRNaseII dans la maturation des ARN mitochondriaux	121
III.3.AtmtPNPase est requise pour de multiples aspects du métabolisme de l'ARNr 18S chez les mitochondries d'Arabidopsis thaliana	123
III.3.1.Introduction	123

III.3.3.Retour sur la cartographie des sites de polyadénylation de l'unité de transcription 18S-5S chez Arabidopsis thaliana dans les plantes sauvages et les plantes PNP-138	
III.3.4.Résultats complémentaires	140
III.3.4.1.Redéfinition de l'initiation de la transcription de l'ARN ribosomique 18S chez Arabidopsis thaliana	140
III.3.4.2.L'extrémité 3' du 5S serait générée par une activité exonucléase	141
III.3.4.3.Schématisation de l'ensemble des résultats obtenus pour le co-transcrit 18S-5S chez Arabidopsis thaliana	142
IV.DISCUSSION	144
IV.1.Introduction	145
IV.2.La polyadénylation est un signal suffisant pour déclencher une voie de dégradation exonucléolytique des ARN messagers dans la mitochondrie de plante.	145
IV.3.Cartographie des sites de polyadénylation	147
IV.4.Acteurs et caractéristiques de la polyadénylation de systèmes procaryotiques et d'origine procaryotique	150
IV.5.Fonction de la polyadénylation des ARNm dans les mitochondries de plante	152
IV.6.Le(s) rôle(s) de la polyadénylation chez les mitochondries d'autres organismes	157
IV.7.La maturation des ARN mitochondriaux de plante	160
IV.8.Machinerie de dégradation des ARN et maturation des ARN ribosomiques nucléaires de levure	164
V.Conclusion générale/Perspectives	167
V.1.Conclusion générale	168
V.2.Perspectives	169
VI.Bibliographie	171

I / INTRODUCTION GENERALE



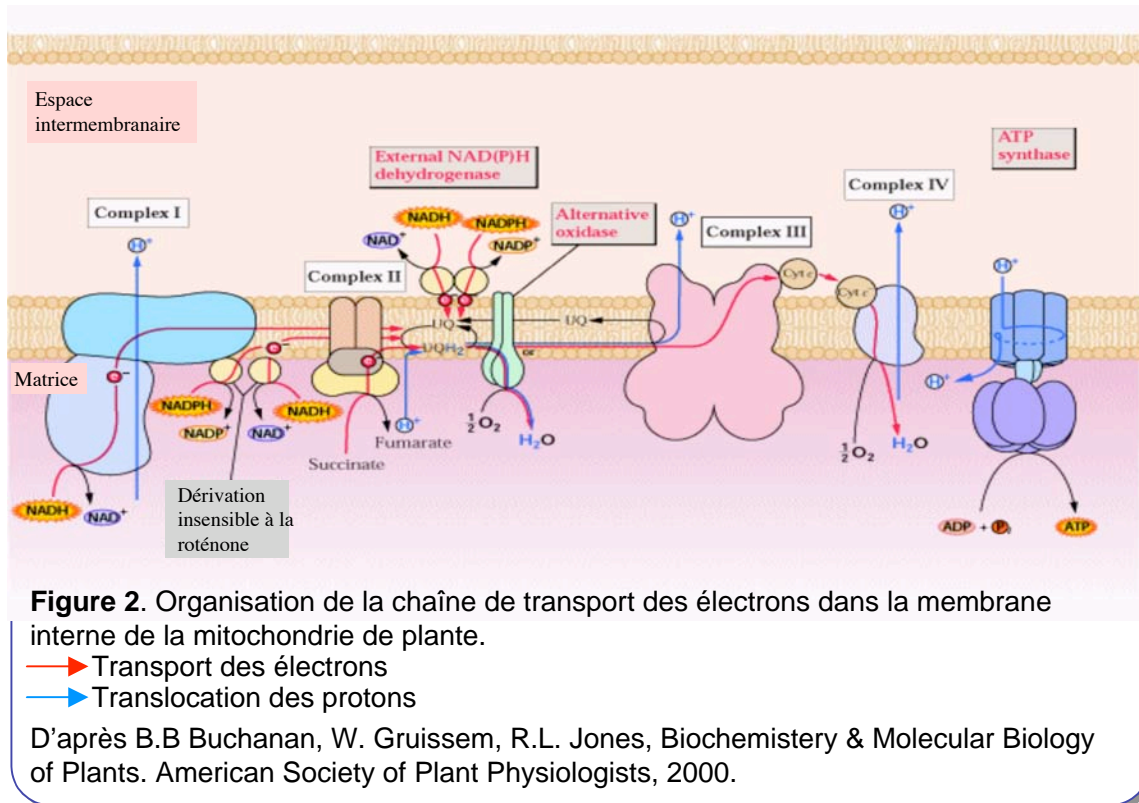
I.1. Origine et diversité des génomes mitochondriaux

Les mitochondries sont des organites intracellulaires pourvus d'une double membrane et qui comportent leur propre système génétique. La majorité des eucaryotes en sont pourvus, et, d'après les études les plus récentes, la mitochondrie serait d'origine unique, issue de l'endosymbiose d'une bactérie dont les plus proches contemporaines se trouvent parmi les α -protéobactéries (Gray *et al.* 1999). Bien qu'apparemment d'origine monophylogénétique (**figure 1**), le génome mitochondrial est très variable en taille et en structure suivant l'espèce considérée. Ainsi, si le génome mitochondrial le plus petit connu est de moins de 6 kb chez *Plasmodium falciparum*, il est de 16 kb chez l'homme et peut varier de 200 à plus de 600 kb chez les plantes supérieures. Beaucoup de génomes mitochondriaux se présentent sous forme circulaire bien qu'il existe des formes linéaires par exemple chez *Chlamydomonas reinhardtii* ou bien chez *Tetrahymena pyriformis* (Burger *et al.*

2003). Malgré cette diversité, le génome mitochondrial a un rôle commun à tous les eucaryotes qui en contiennent : il code pour un nombre limité d'ARN et de protéines indispensables à la biogenèse d'une mitochondrie fonctionnelle. Pourtant la plupart de l'information génétique nécessaire à cette biogenèse réside dans le noyau, ce qui implique un transport ciblé dans les organelles de protéines codées par le noyau et dans certains cas de petits ARN, particulièrement d'ARNt.

I.2.Fonctions de la mitochondrie dans le métabolisme cellulaire

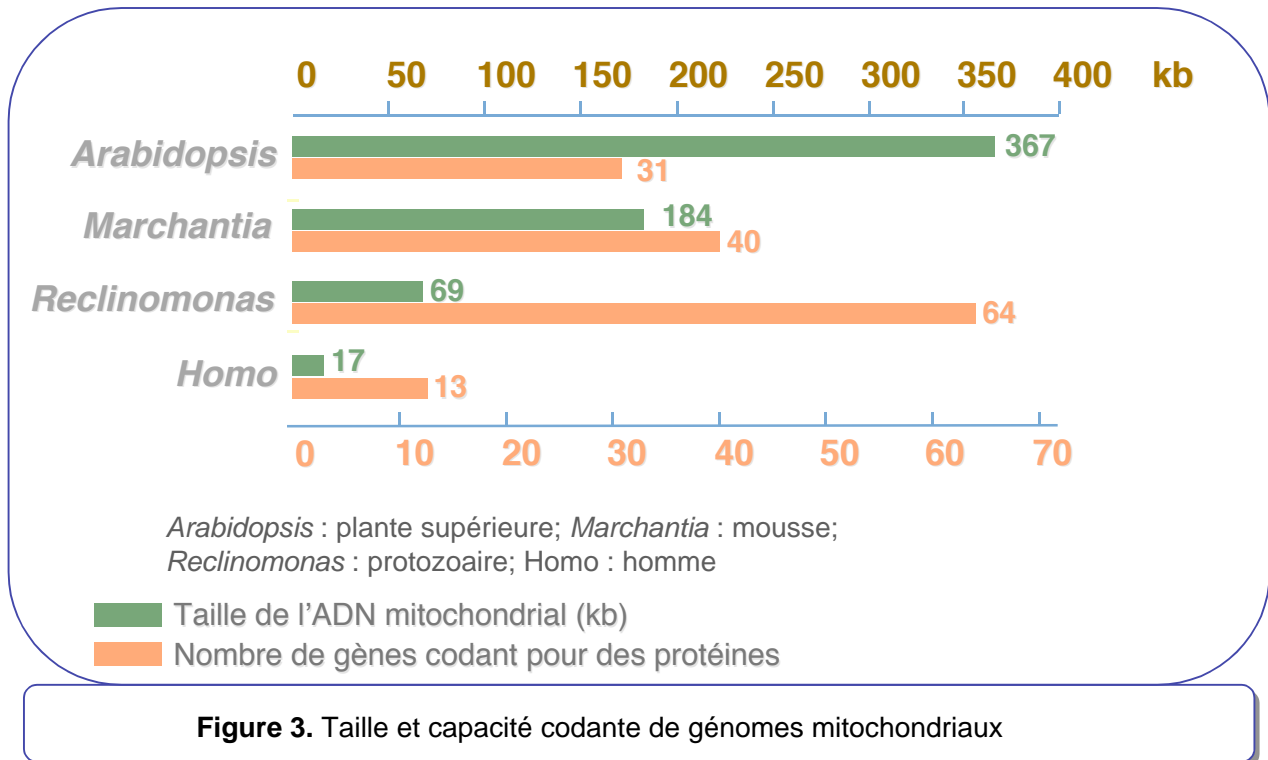
La mitochondrie participe à plusieurs fonctions importantes dans la cellule comme l'homéostasie ionique, le métabolisme intermédiaire et l'apoptose. La capacité codante du génome mitochondrial est principalement réservée à la fonction respiratoire et à l'expression de son génome (transcription, mécanismes post-transcriptionnels, traduction) ainsi qu'au transport des protéines. Mais la mitochondrie joue aussi un rôle dans le métabolisme des lipides, des nucléotides, des acides aminés, ainsi que dans le métabolisme primaire du carbone, la synthèse de l'hème, la synthèse des complexes fer-soufre, la synthèse de co-facteurs, en particulier l'acide lipoidique, la biotine et le folate, dans la mitochondrie de plante. Une des fonctions majeures de la mitochondrie dans la cellule est la production d'ATP, source d'énergie pour la cellule, qui utilise le transport d'électrons couplé à la phosphorylation oxydative (**figure 2**). La chaîne de transport des électrons comporte cinq complexes majeurs : le complexe I ou NADH-ubiquinone oxydoréductase, le complexe II ou succinate déshydrogénase, le complexe III ou ubiquinone-cytochrome c oxydoréductase, le complexe IV ou cytochrome c oxydase, le complexe V ou F1F0-type H⁺ ATP synthétase. Mais ce qui caractérise les mitochondries de plante est la présence de dérivations de la chaîne respiratoire classique par la présence d'une NADH déshydrogénase insensible à la roténone et d'une oxydase alternative qui joue un rôle antioxydant (Heazlewood *et al.* 2004).



I.3.Évolution et caractéristiques actuelles du génome mitochondrial de plante

D'un point de vue évolutif, en comparant le génome mitochondrial plus ancestral de *Marchantia polymorpha* à celui plus récent d'*Arabidopsis thaliana* (**figure 3**), on s'aperçoit que le génome mitochondrial des angiospermes a évolué par des recombinaisons qui ont conduit à des réarrangements génomiques extensifs. Ces réarrangements peuvent générer des gènes chimériques ou des ORF ("Open Reading Frame") nouvelles à partir de morceaux de gènes connus. Chez les plantes, ces gènes chimériques peuvent parfois être associés à la stérilité mâle cytoplasmique qui est caractérisée par l'incapacité à produire du pollen fonctionnel. Par ailleurs on constate l'apparition de l'édition des ARN et la détérioration progressive du caractère ancestral de l'ADN mitochondrial. Cette dégénérescence a pour conséquences la cassure d'opéron de type bactérien, la fragmentation et la dispersion des gènes codant pour des protéines provoquant l'émergence du trans-spli-

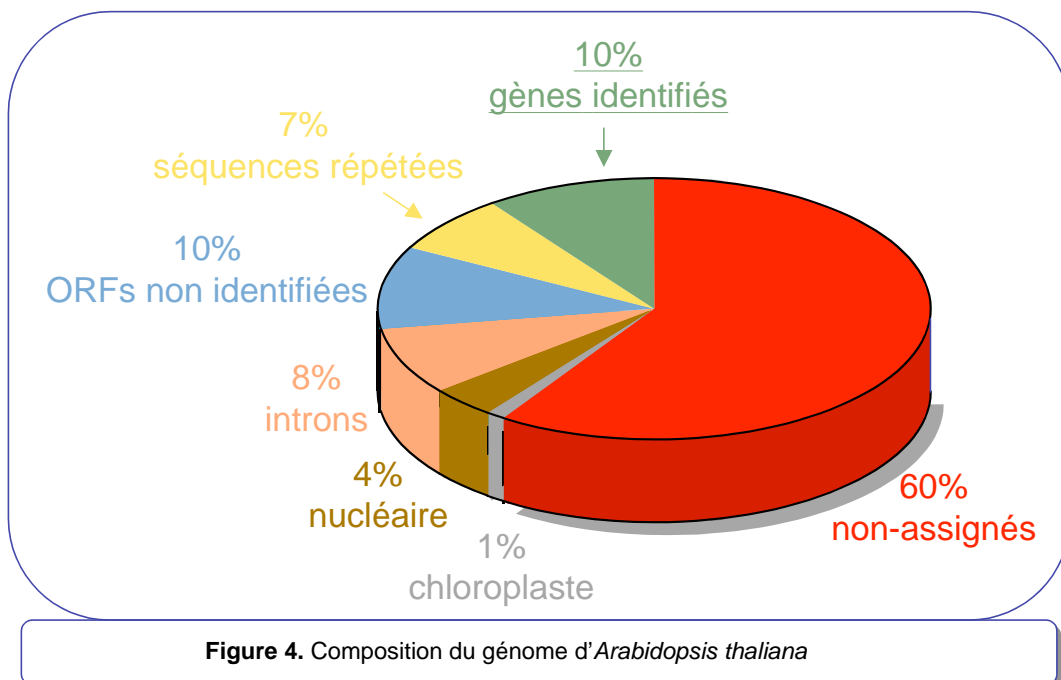
cing, la perte de gènes au profit du noyau, l'intégration d'ADN provenant d'autres génomes (nucléaires et chloroplastiques), la perte progressive des gènes d'ARNt compensée par le transport du cytosol d'ARNt codés par le génome nucléaire et, enfin, la modification de la structure physique du génome (Gray *et al.* 1999).



1.3.1. Taille et capacité codante

Le génome mitochondrial de plante supérieure est caractérisé par sa grande taille qui est par exemple de 369 kb pour la betterave sucrière, de 490 kb pour le riz et de 367 kb chez *Arabidopsis thaliana*, ce qui représente un tiers de la taille du génome de *Rickettsia prowazekii*, l' α -protéobactérie qui se rapproche le plus de la mitochondrie contemporaine. Pourtant, le génome mitochondrial d'*Arabidopsis thaliana* ne code que pour 4% de la quantité de protéines codées par le génome de *Rickettsia*. Cette faible capacité codante s'explique par le fait que le génome mitochondrial d'*Arabidopsis thaliana* comporte un pourcentage élevé de séquences non codantes (plus de 80%) (figure 4) alors qu'il n'est que de 24 % pour *Rickettsia*. Le génome mitochondrial d'*Arabidopsis thaliana* est 22 fois plus grand que celui de la mitochondrie humaine qui ne code que pour 2,5 fois plus de

protéines que celui-ci (32 contre 13). A noter que l'ADN mitochondrial végétal code pour les trois ARN ribosomiques (26S, 18S, 5S) alors que l'ADN de la mitochondrie humaine ne code que pour les deux premiers, le troisième étant importé du cytosol. Bien que le 5S soit présent dans la matrice mitochondriale humaine, il ne paraît pas associé au ribosome et sa fonction reste inconnue. En revanche, le génome mitochondrial d'*Arabidopsis thaliana* ne comporte pas un ensemble suffisant d'ARNt pour traduire tous les codons contrairement à celui de la mitochondrie humaine, d'autant que quatre gènes de ARNt exprimés du génome mitochondrial d'*Arabidopsis thaliana* sont issus du génome du chloroplaste dont les insertions représentent 1% du génome mitochondrial de cette plante. Ainsi une autre caractéristique du génome mitochondrial de plante supérieure, outre sa taille importante, est sa composition mosaïque, due en partie à l'acquisition d'ADN d'origine chloroplastique, nucléaire, virale et mais aussi d'origine inconnue (Burger *et al.* 2003).



1.3.2. Structure physique et gènes codés

Si l'ADN mitochondrial de plante peut être assemblé sous la forme théorique d'un chromosome circulaire appelé aussi cercle maître (**figure 5**), une structure qui a été observée effectivement chez *Marchantia polymorpha* (Oda *et al.* 1992), il apparaît plus généralement sous les formes plus complexes d'un ensemble de molécules circulaires et linéaires

subgénomiques. De fait, le génome de la mitochondrie végétale est une structure dynamique multipartite sujette à de nombreuses recombinaisons homologues impliquant des séquences répétées. La réorganisation du cercle maître peut se faire par “flip-flop” si les séquences répétées sont en orientation inverse, ou par “loop-out” formant deux molécules sub-génomique si les séquences répétées sont en orientation directe. Chez la mitochondrie de plante, certaines molécules sub-génomiques possèdent leur propre origine de réplication et se répliquent de manière autonome (Backert *et al.* 1997), ce qui augmente encore la complexité physique des génomes mitochondriaux de plante. Les mécanismes qui régissent la réplication, la ségrégation et le contrôle du nombre de copies de molécules sub-génomiques restent actuellement très peu connus.

Bien que la taille et la structure des génomes mitochondriaux de plante soient très diverses, les séquences codantes sont, quant à elles, particulièrement conservées et le nombre peu variable de gènes est généralement compris entre 50 et 60. Ces gènes sont espacés par des régions non codantes de 2 à 60 kb. Ils codent pour des sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire, pour des protéines impliquées dans la biogenèse des cytochromes de type c, pour un nombre variable de protéines ribosomales, pour trois ARN ribosomiques (5S, 18S et 26S) et pour un ensemble d’une quinzaine d’ARNt.

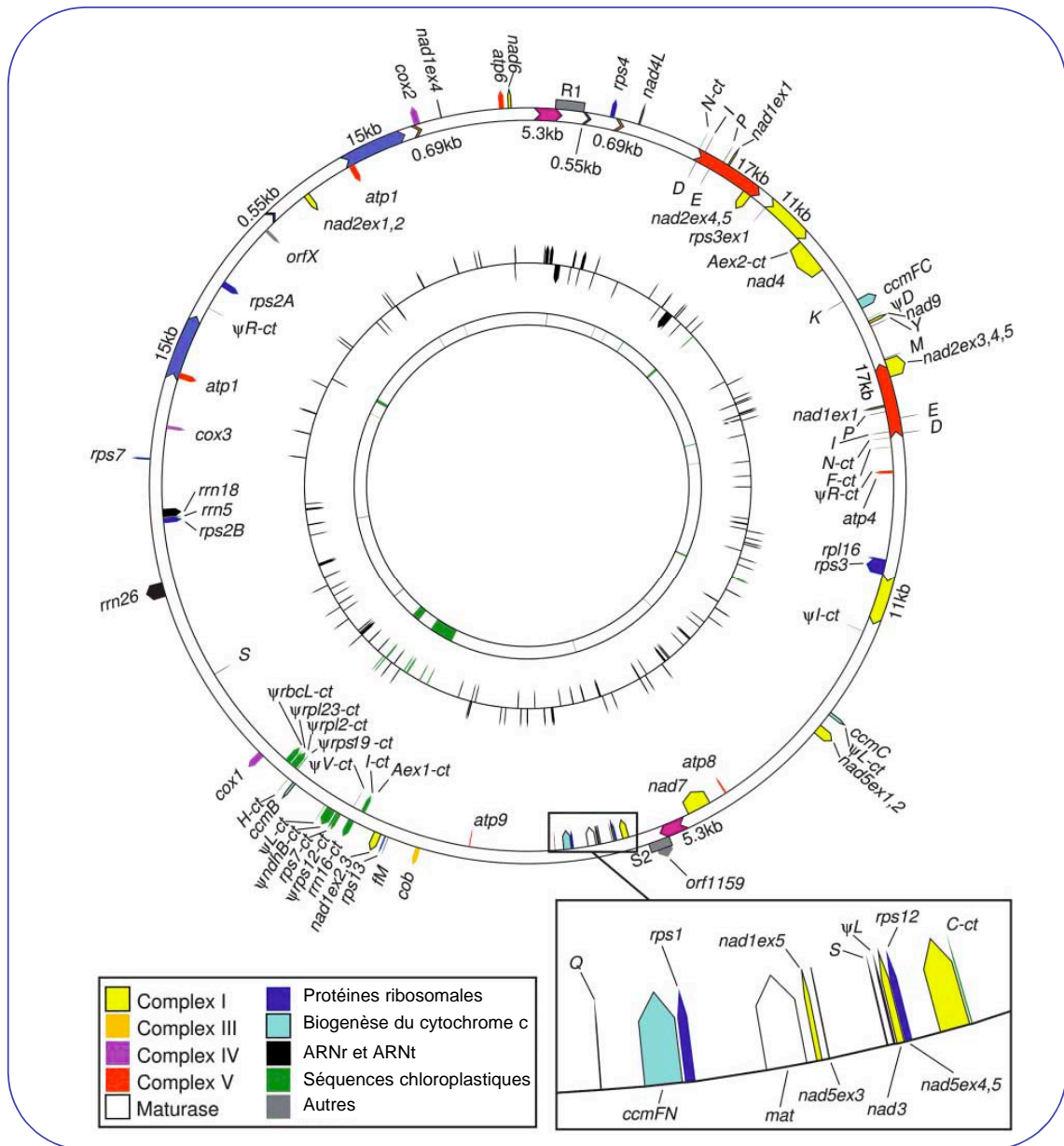


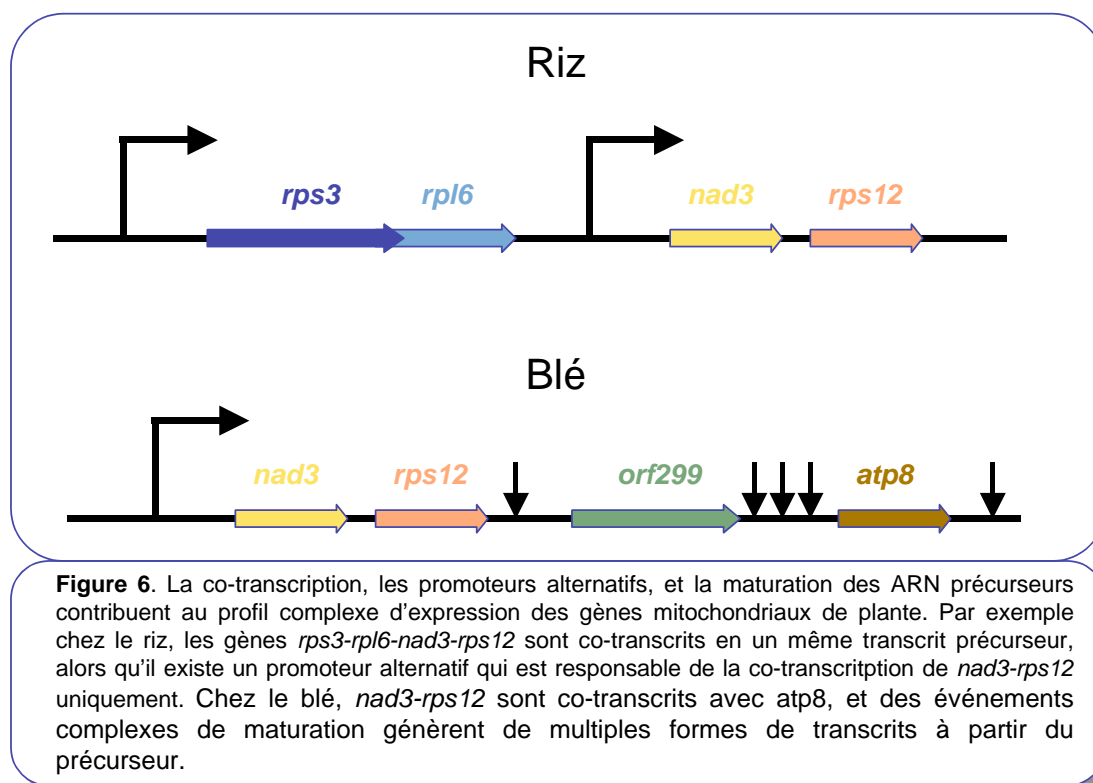
Figure 5. Carte circulaire du génome mitochondrial du maïs NB. Les séquences répétées sont colorées dans le cercle externe. Le cercle médian indique l'emplacement des ORFs (prédites de taille \geq à 99 amino acides). Le cercle interne montre en vert les régions avec au moins 80% d'identités avec des séquences du génome chloroplastique. D'après Sandra W. Clifton et al, Plant Physiology, 2004, Vol. 136, pp. 3486-3503.

I.4.Expression du génome mitochondrial de plante

I.4.1.Transcription des gènes mitochondriaux de plante

I.4.1.1.Unités transcriptionnelles

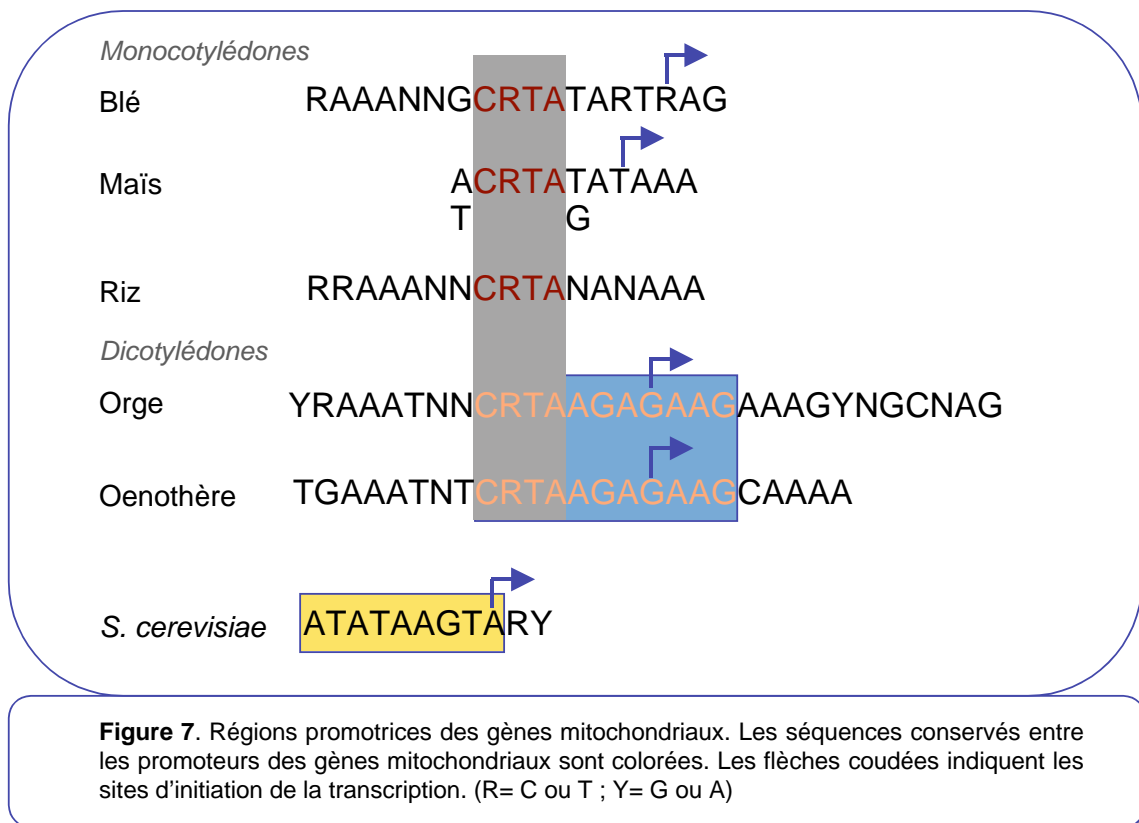
Chez les plantes supérieures, l'analyse des transcrits montre qu'il existe aussi bien des cas parfois simples avec un seul ARN mature pour un seul gène exprimé, que des profils d'expression souvent complexes comprenant plusieurs gènes co-transcrits. Bien que la densité des séquences codantes soit faible par rapport à la grande taille du génome, il semble que la répartition en "clusters" de gènes définissant des unités de co-transcription soit la règle dans les mitochondries de plantes supérieures. Cette organisation reflète probablement l'ascendance procaryotique de la mitochondrie. Les gènes procaryotiques sont, en effet, organisés en opérons qui conduisent à la synthèse de transcrits polycistroniques comprenant des gènes impliqués dans des fonctions liées entre elles. Toutefois les unités de transcription mitochondriale de plante ne sont pas conservées entre espèces, et ne ressemblent en rien à celles qui sont observées dans les bactéries contemporaines. Par exemple les gènes co-transcrits ne codent pas pour des protéines dont les fonctions sont reliées, ce qui est là encore une conséquence possible des réarrangements massifs ayant eu lieu durant l'évolution de la mitochondrie de plante. Le séquençage de plusieurs génomes mitochondriaux de plante permet de constater que l'assemblage en "clusters" de gènes est une caractéristique commune, mais que les combinaisons de gènes de ces "clusters" sont différentes d'une espèce à l'autre (**figure 6**). Toutefois, quelques associations sont conservées dans la plupart des espèces de plantes supérieures, par exemple le co-transcrit *rps3-rpl6* codant pour des protéines de la petite et la grande sous-unité du ribosome mitochondrial (Takemura *et al.* 1992). Cette conservation entre espèces concerne aussi l'association des ARN ribosomiques 18S et 5S exprimés sous forme d'un co-transcrit (Maloney et Walbot 1990).



I.4.1.2. Les promoteurs des mitochondries de plante

Les études de l'initiation de la transcription montrent que les profils complexes d'expression des gènes ne sont pas seulement dus à de nombreux mécanismes post-transcriptionnels mais aussi à l'existence de sites multiples de l'initiation de la transcription comme c'est le cas pour les gènes *atp9* et *cox 2* de maïs (Mulligan *et al.* 1988; Lupold *et al.* 1999). La confrontation des séquences entourant les sites d'initiation de la transcription a mis en lumière l'existence de séquences "consensus" qui sont considérées comme promotrices de la transcription dans les mitochondries de plantes (**figure 7**) (Binder et Brennicke 2003). Ces séquences "consensus" redéfinis récemment (Kuhn *et al.* 2005), comportent un noyau CRTA inclus dans deux motifs nonanucléotides différents chez les dicotylédones : CRTAAGAGA et CGTATATAA. Le noyau CRTA se retrouve chez les monocotylédones aussi bien en amont des sites d'initiation de la transcription d'ARN messagers que d'ARNt et d'ARNr. D'autre part, il existe des gènes qui possèdent des promoteurs dont la séquence est éloignée du motif "consensus", comme l'ARNr 26S de pomme de terre et plusieurs ARNt (Fey et Marechal-Drouard 1999; Fey et Marechal-

Drouard 1999). Par ailleurs, contrairement aux promoteurs de type CRTA, ces promoteurs non canoniques sont inexploitable dans les systèmes de transcription *in vitro* établis jusqu'à présent. Environ 30 promoteurs avec un motif relativement conservé ont été identifiés dans le génome mitochondrial d'*Arabidopsis thaliana* (Brennicke *et al.* 1999). Plus récemment, il a été montré que plusieurs gènes sont transcrits à partir de promoteurs multiples (Kuhn *et al.* 2005). Ce nombre de promoteurs rapproche le système de la mitochondrie de plante de celui de la mitochondrie de la levure *S. cerevisiae* qui possède 20 promoteurs au motif hautement conservé, le nonanucléotide : ATATAAGTA (figure 7) (Matsunaga et Jaehning 2004). Alors que celui de la mitochondrie humaine ne comporte que 2 promoteurs, LSP et HSP, pour transcrire respectivement le brin léger et le brin lourd, produisant ainsi deux grands précurseurs polycistroniques (Gaspari *et al.* 2004).



I.4.1.3. Les ARN polymérase de mitochondries de plante

Trois gènes codés dans le génome nucléaire d'*Arabidopsis thaliana* ont une similarité significative avec l'ARN polymérase de type phagique T3/T7 de la mitochondrie de levure (Rpo41). Un gène code pour une protéine adressée à la mitochondrie, un autre pour une protéine adressée au chloroplaste et un dernier pour une protéine doublement adressée à la mitochondrie et au chloroplaste (Hedtke *et al.* 2000). Chez les monocotylédones, il semble qu'il n'existe que deux enzymes de type bactériophagique exclusivement adressées respectivement à la mitochondrie et au chloroplaste. Le chloroplaste contient au moins deux types d'activités : une polymérase codée par le génome plastidial de type bactérien à multiples sous-unités (PEP) et une polymérase de type phagique à sous-unité unique codée par le génome nucléaire (NEP) (Serino et Maliga 1998; Kabeya *et al.* 2002). Du fait de l'origine endosymbiotique de la mitochondrie, on pouvait s'attendre à ce qu'elle possède aussi une activité de type bactérien, or seul le protozoaire *Reclinomonas americana* dont le génome mitochondrial se rapproche le plus du symbiote ancestral parmi tous les organismes étudiés à ce jour, possède une polymérase bactérienne codée par l'ADN mitochondrial (Lang *et al.* 1997). Aucune enzyme similaire n'a été identifiée dans une autre espèce. Il semble donc qu'au cours de l'évolution, l'enzyme de type bactériophagique a fonctionnellement remplacé la polymérase de type bactérien dans la mitochondrie de plante.

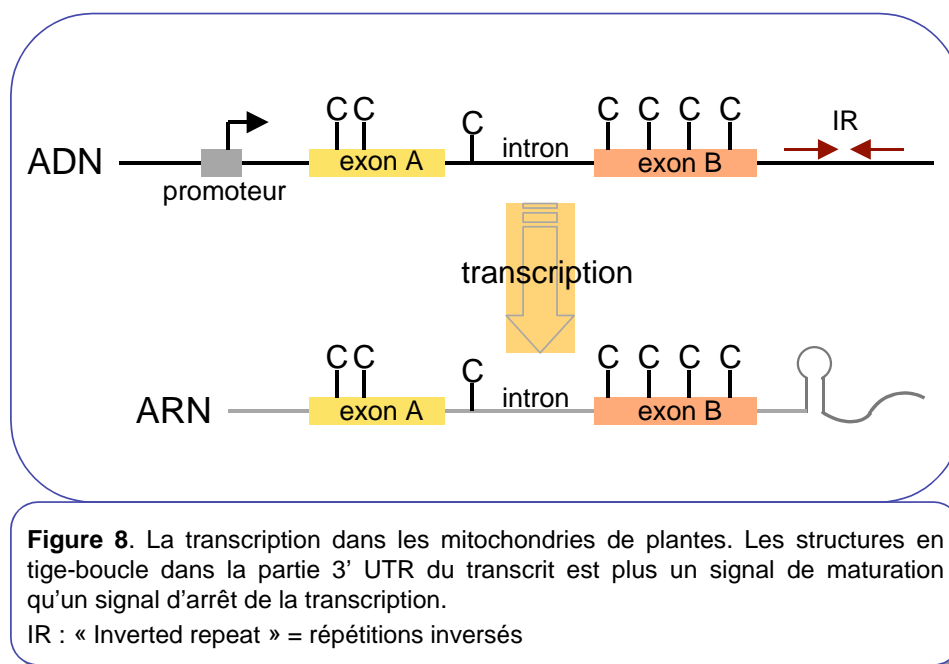
I.4.1.4. Cofacteurs de l'ARN polymérase mitochondriale

Pour que l'activité ARN polymérase de mitochondries de plante reconnaisse à la fois les promoteurs à motif nonanucléotidique conservé et les promoteurs non canoniques, il est possible que des facteurs complémentaires interviennent. C'est le cas pour la polymérase de type phagique de la mitochondrie de levure et de la mitochondrie humaine qui possèdent toutes deux des co-facteurs mtTFB et mtTFA. Chez les plantes, une

protéine de blé a été identifiée comme ayant une affinité pour le promoteur de *cox2* (Ikeda et Gray 1999). Elle présente une similarité limitée avec les facteurs sigma bactériens. En revanche la protéine recombinante correspondante stimule l'initiation de la transcription *in vitro* et son expression durant la germination est corrélée à la transcription *de novo* des gènes mitochondriaux, ce qui correspond aux caractéristiques d'un véritable facteur de transcription mitochondrial. La relation récente établie entre le facteur humain mtTFB et les ARN adénine méthyltransférases a conduit à rechercher dans le génome d'*A. thaliana* des gènes codant pour de telles enzymes. L'un de ceux-ci est prédit comme codant une enzyme adressée exclusivement à la mitochondrie par tous les programmes de prédiction. Cependant il n'est pas prouvé expérimentalement si cette enzyme peut jouer un rôle de co-facteur des polymérases de type RpoT mitochondriales.

1.4.2. Mécanismes post-transcriptionnels

Dans un organisme, la majorité des ARN sont transcrits sous forme de précurseurs biologiquement inactifs (**figure 8**), qui, pour jouer leurs rôles biologiques, requièrent une maturation importante qu'elle soit interne ou à leurs extrémités. Ceci est particulièrement vrai dans la mitochondrie de plante dans laquelle, après la transcription, les ARN, pour devenir fonctionnels, doivent passer à travers un nombre important de modifications post-transcriptionnelles complexes. Parmi ces processus, on peut citer : l'édition (**figure 9, 13**), l'épissage en *cis* et en *trans* des introns (**figures 10, 11, 12**), la maturation aux extrémités 3' et 5' (**figure 14, 15**), l'addition de nucléotides non codés par le génome. Sauf pour la maturation de certains ARNt, il ne semble pas qu'il y ait d'ordre séquentiel à ces événements post-transcriptionnels impliqués dans le contrôle de l'expression des gènes mitochondriaux de plante. Le dernier point de régulation du taux de transcrits fonctionnels est finalement le processus de dégradation de ces ARN.



I.4.2.1. Epissage de l'ARN dans la mitochondrie de plante

Il existe dans les organelles de plante des introns de groupe I et de groupe II, classés selon leurs caractéristiques structurales (Michel *et al.* 1982). Ceux de la mitochondrie de plante appartiennent en grande majorité au groupe II. Les introns de groupe II sont composés de 6 domaines distincts conservés (D1 à D6). La voie classique d'épissage se déroule en deux étapes : le site d'épissage en 5' est attaqué par un groupe hydroxyle d'une adénosine qui se situe dans le domaine D6. Puis le groupe hydroxyle en 3' de l'exon attaque le site d'épissage en 3'. L'intron est alors relargué sous forme de lasso.

Les introns du groupe II sont tous situés dans les gènes codant pour des protéines chez les plantes supérieures. Chez *A. thaliana* et le riz, les gènes *nad1*, *nad2*, *nad4*, *nad5*, *nad7*, *ccb452*, *cox2*, *rps3*, et *rpl2* sont interrompus par des introns allant de 485 à 4000 nucléotides (Unsold *et al.* 1997; Notsu *et al.* 2002). La plupart de ces introns sont en conformation cis : l'intron et les exons le flanquant appartiennent à une unique molécule d'ARN (**figure 10**). Cependant quelques introns en trans ont été caractérisés pour les gènes *nad1*, *nad2* et *nad5* (Chapdelaine et Bonen 1991; Knoop *et al.* 1991; Pereira de Souza *et al.* 1991; Wissinger *et al.* 1991; Sutton *et al.* 1995; Unseld *et al.* 1997; Kubo *et al.* 2000). Dans ce cas, l'épissage intervient entre deux molécules d'ARN différentes pour ne générer qu'un seul

ARNm mature (**figures 11, 12**). Les introns de groupe II des mitochondries de plante sont incapables d'effectuer un auto-épissage *in vitro*. L'étude du mécanisme d'épissage n'a débuté que grâce au développement d'une technique d'expression transitoire de gène utilisant l'électroporation de mitochondries de plante purifiées (Farre et Araya 2001; Farre et Araya 2002). Mais aucune protéine n'a formellement été identifiée comme appartenant à la machinerie d'épissage dans les mitochondries de plante jusqu'à présent. Cependant une protéine putative (mat-r) relative aux maturases de bactéries, de chloroplastes et de champignons, est codée par un gène situé dans un intron entre les exons d et e de *nad1* chez les plantes à fleurs (Wahleithner *et al.* 1990). Mais le rôle biologique de cette protéine n'est pas encore caractérisé. Alors que pour le chloroplaste, les facteurs d'épissage des introns du groupe II (CRS1, CAF1, CAF2) ont récemment été identifiés. Les paralogues putatifs de ces protéines existent pour la mitochondrie d'*A. thaliana* (Ostheimer *et al.* 2003). Ils sont donc de bons candidats à être des facteurs d'épissage de la mitochondrie végétale.

I.4.2.2.L'édition des ARN de la mitochondrie de plante

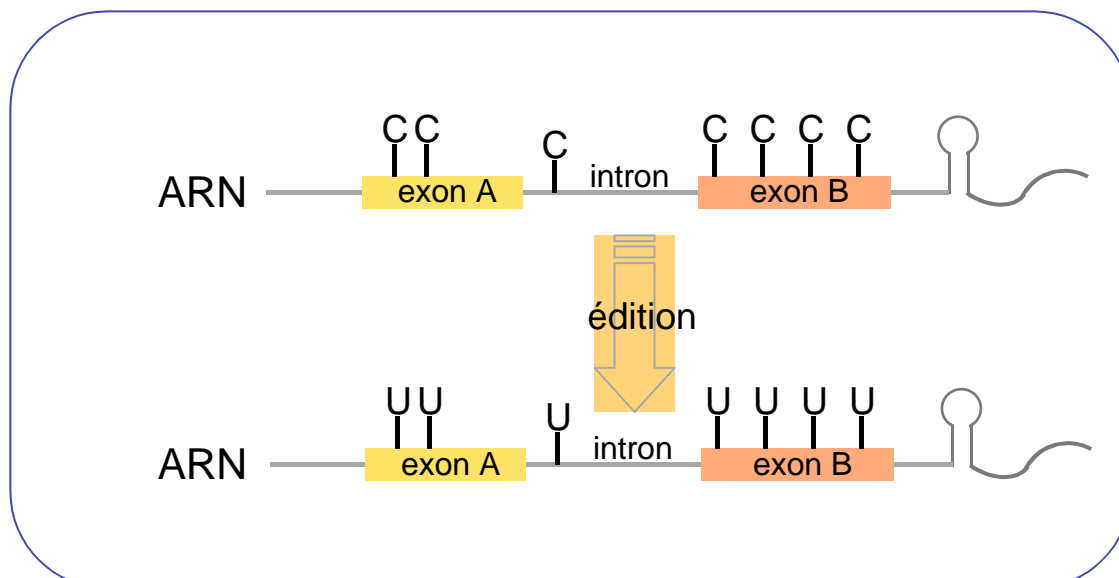


Figure 9. Représentation schématique de l'édition dans les mitochondries de plantes. Les cytidines sont converties en uridines par déamination.

L'édition désigne toute modification de la séquence transcrite par rapport à la séquence de l'ADN matrice (Gott et Emeson 2000; Bass 2002). L'édition comme l'épissage est un mécanisme qui remet en question la relation directe entre un gène et une protéine. Dans les mitochondries de plante, l'édition des ARN consiste principalement en la conversion de cytidines en uridines (**figure 9**), ce phénomène a été décrit également chez les chloroplastes (Hoch *et al.* 1991). Cette découverte a mis fin à la polémique sur le code génétique utilisé par la mitochondrie de plante (Covello et Gray 1989; Gualberto *et al.* 1989; Hiesel *et al.* 1989), qui s'est révélé être universel. L'apparition de l'édition au cours de l'évolution semble coïncider avec le passage des plantes du milieu aquatique au milieu terrestre, car à l'exception de *Marchantia* et de quelques mousses, l'édition des ARN a été trouvée chez toutes les plantes terrestres testées alors qu'elle est absente chez les algues (Malek *et al.* 1996).

L'analyse des transcriptomes des mitochondries d'*A. thaliana* et de riz montre respectivement 441 et 491 sites d'édition dans les ORF, (Giege et Brennicke 1999; Notsu *et al.* 2002). Si l'édition dans la mitochondrie de plante affecte particulièrement la partie traduite des transcrits, elle peut concerner aussi les ARNt, les introns, les régions 5' et 3' UTR des ARNm. Si le taux d'édition des Cs codants est rarement de 0%, il peut atteindre plus de 25% pour certains transcrits. Ceci est bien plus conséquent comparé aux transcrits chloroplastiques qui ne comportent, dans leur ensemble, qu'une trentaine de sites d'édition (Maier *et al.* 1995; Lutz et Maliga 2001; Tsudzuki *et al.* 2001).

L'édition est un processus indispensable à l'expression des protéines mitochondriales puisqu'il est requis pour l'incorporation d'acides aminés essentiels à la fonction de protéines, ou pour créer des codons d'initiation et de terminaison de la traduction (Begu *et al.* 1990; Chapdelaine et Bonen 1991; Quinones *et al.* 1995; Zanlungo *et al.* 1995) (**figure 13**).

Quelques sites d'édition se trouvent dans des introns du groupe II. Mais si ces modifications renforcent le repliement correct de l'intron en augmentant l'appariement de bases, et peuvent donc améliorer l'efficacité de l'épissage, elles ne semblent pas essentielles puisqu'on peut trouver des introns excisés partiellement ou pas du tout édités

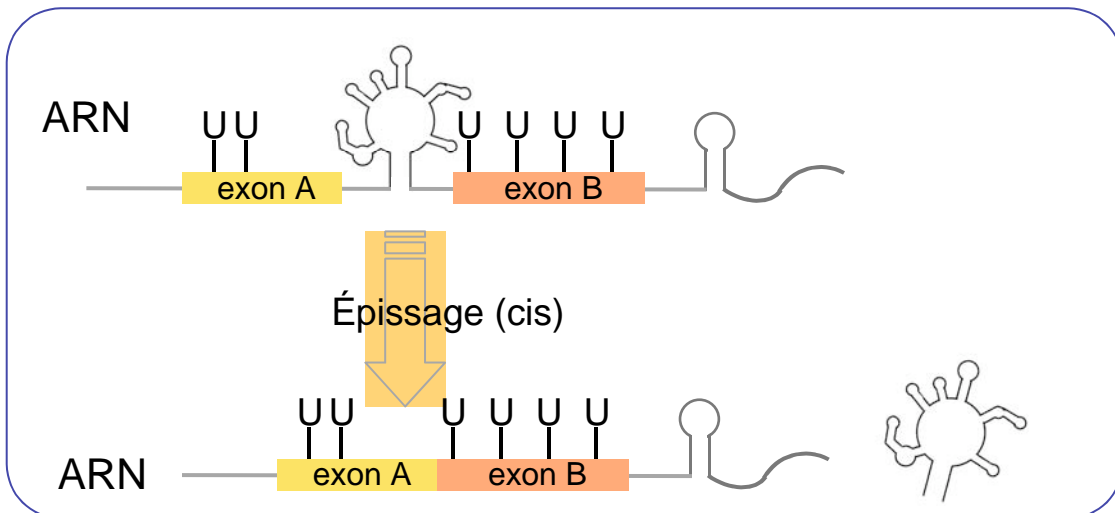


Figure 10. Représentation schématique de l'épissage en cis des introns de groupe II dans les mitochondries de plantes.

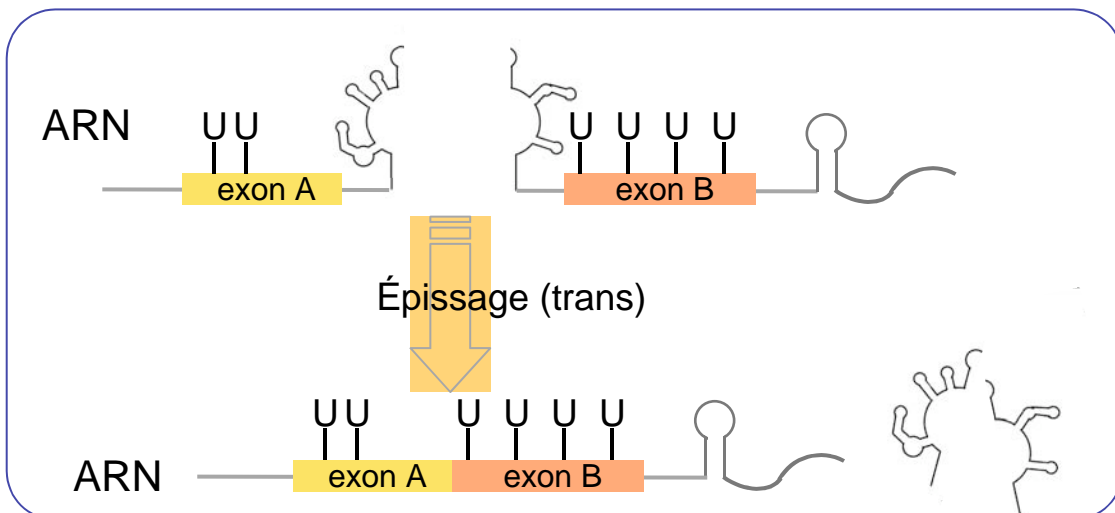


Figure 11. Représentation schématique de l'épissage en trans des introns de groupe II dans les mitochondries de plantes.

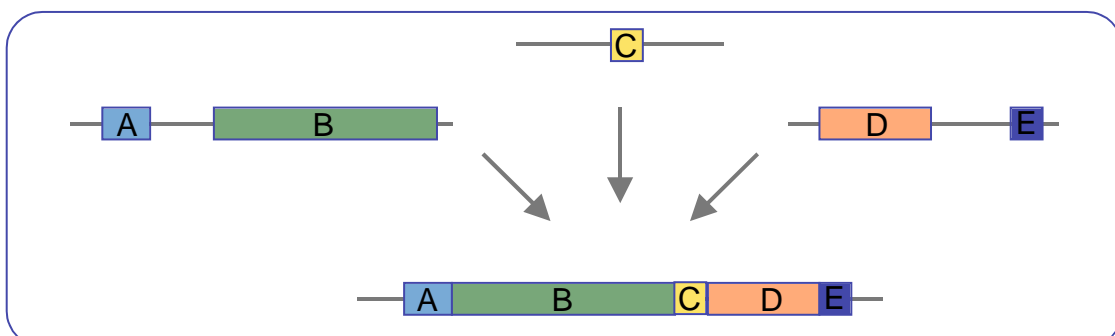
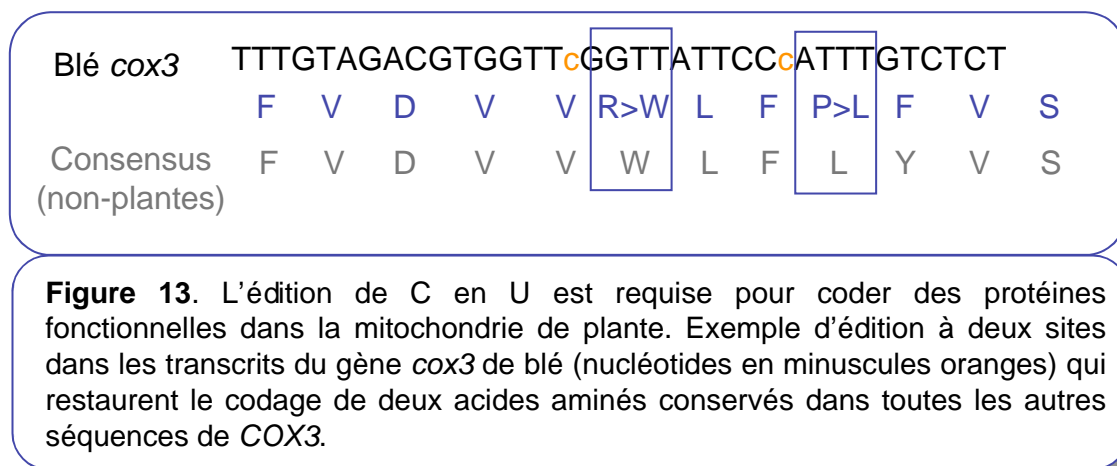


Figure 12. Représentation schématique de cis et trans splicing: cas des transcrits *nad5*. Les transcrits *nad5* matures sont générés à partir de trois molécules d'ARN précurseurs différentes, codés par des régions du génome mitochondrial relativement éloignées les unes des autres.

(Carrillo et Bonen 1997; Carrillo *et al.* 2001). Alors qu'il ne semble pas y avoir de sites d'édition dans les trois ARN ribosomiques (5S, 18S et 26S), l'édition des ARNt conditionne parfois leur maturation (Marchfelder *et al.* 1996; Marechal-Drouard *et al.* 1996).

Il n'y a pas de polarité 5'-3' de l'édition. Elle ne semble donc pas liée à la traduction. Même s'il existe un taux variable de transcrits partiellement édités en fonction des conditions de culture ou du stade de développement de la plante, ces variations seraient dues à la stabilité relative des transcrits plutôt qu'à une régulation de l'édition.



Le développement récent de systèmes d'édition *in vitro* (Takenaka et Brennicke 2003) et *in organello* (Farre et Araya 2001) a ouvert des perspectives inédites pour étudier les caractéristiques de l'édition dans les mitochondries de plante. Ainsi, la conversion de C en U ne se fait pas par substitution de nucléotide mais plus probablement par déamination ou transamination. Si le génome nucléaire d'*A. thaliana* comporte 9 gènes de cytidine déaminases putatives, aucun n'a été montré comme codant une protéine adressée aux organelles.

Quant à la spécificité de l'édition, ni structure commune et ni motif "consensus" au niveau des séquences des sites d'édition n'a été identifié. Pourtant des déterminants essentiels *in cis* ont pu être mis en évidence grâce à la transfection de mitochondries par électroporation pour plusieurs sites d'édition du gène *cox2* de blé (Farre et Araya 2001). Il est donc probable que chaque site d'édition soit spécifiquement reconnu par un transfacteur. Ces facteurs de spécificité pourraient être des petits ARN antisens appelés ARN guides comme il en existe dans le système d'édition de la mitochondrie de trypanosome

(Smith *et al.* 1997). A ce jour, aucun de ces petits ARN putatifs n'a pu être mis en évidence dans les mitochondries végétales. L'absence d'implication d'ARN (à part l'ARNm) dans le mécanisme d'édition joue actuellement plutôt en faveur de l'existence dans le génome nucléaire de plante d'une grande famille de gènes codant pour des protéines liant l'ARN et adressées à la mitochondrie. Une famille de gènes répondant à ces critères est la famille des protéines à motifs PPR qui représente 1 à 2% du total des gènes codant pour des protéines d' *A. thaliana* (Small et Peeters 2000; Lurin *et al.* 2004). L'étude, en cours, de la fonction de ces protéines pourra confirmer leur implication dans l'édition et plus particulièrement dans la reconnaissance spécifique des sites d'édition pour les ARN mitochondriaux. En effet, chez le chloroplaste il a récemment été montré qu'une protéine à motif PPR était impliquée dans l'édition d'un ARN (Kotera *et al.* 2005).

I.4.2.3. Maturation en 5' et 3' des ARN mitochondriaux de plante

Les ARN de la mitochondrie de plante sont synthétisés sous forme de précurseurs. C'est-à-dire que le site d'initiation de la transcription ne correspond généralement pas à l'extrémité 5' mature et il semble qu'aucune extrémité 3' mature ne soit établie par terminaison de la transcription. La taille de ces transcrits primaires instables peut être relativement grande, pour preuve la détection de 21 kb de séquences non codantes flanquant les ARNr transcrits dans la mitochondrie de maïs (Finnegan et Brown 1990). De plus dans la mitochondrie de plante, certains gènes sont co-transcrits et sont ainsi souvent maturés en unités codantes monocistroniques. La maturation en 5' et en 3' des ARNs, en plus d'être essentielle à l'expression du génome mitochondrial est aussi un point important de régulation de cette expression.

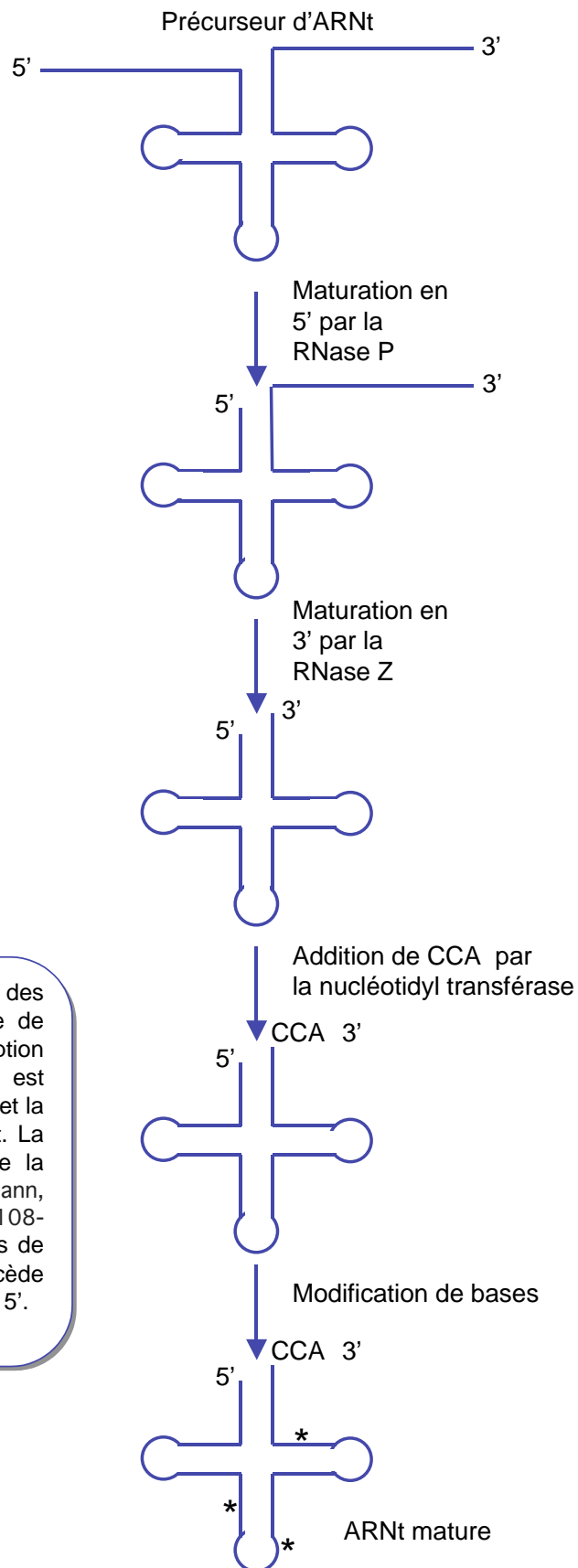


Figure 14. Maturation des ARNt de la mitochondrie de plante. Après la transcription la maturation en 5' et 3' est effectuée par la RNase P et la RNase Z, respectivement. La maturation en 5' précède la maturation en 3' (Kunzmann, A., PNAS, Vol. 95, pp 108-113), 1998). Dans le cas de l'ARNt Phe l'édition précède la maturation à l'extrémité 5'.

1.4.2.3.1. Maturation des ARNt

La maturation des ARNt est à l'heure actuelle le processus du métabolisme des ARN de la mitochondrie de plante supérieure le mieux caractérisé. L'utilisation de systèmes *in vitro* a montré que deux activités endonucléolytiques étaient impliquées dans l'excision d'ARNt d'une molécule d'ARN précurseur. L'extrémité 5' est maturée par la RNase P (Hanic-Joyce et Gray 1990; Marchfelder *et al.* 1990), alors que l'extrémité 3' est coupée par la RNase Z après la base discriminatrice (Kunzmann *et al.* 1998). Les gènes des ARNt des mitochondries de plante ne codent pas pour le CCA terminal, qui est donc ajouté par une ARNt nucléotidyltransférase (Hanic-Joyce et Gray 1990) (**figure 14**). Par ailleurs, l'édition d'un ARNt, lorsqu'elle a lieu, précède sa maturation (Marechal-Drouard *et al.* 1996; Kunzmann *et al.* 1998).

1.4.2.3.2. Maturation des ARNr

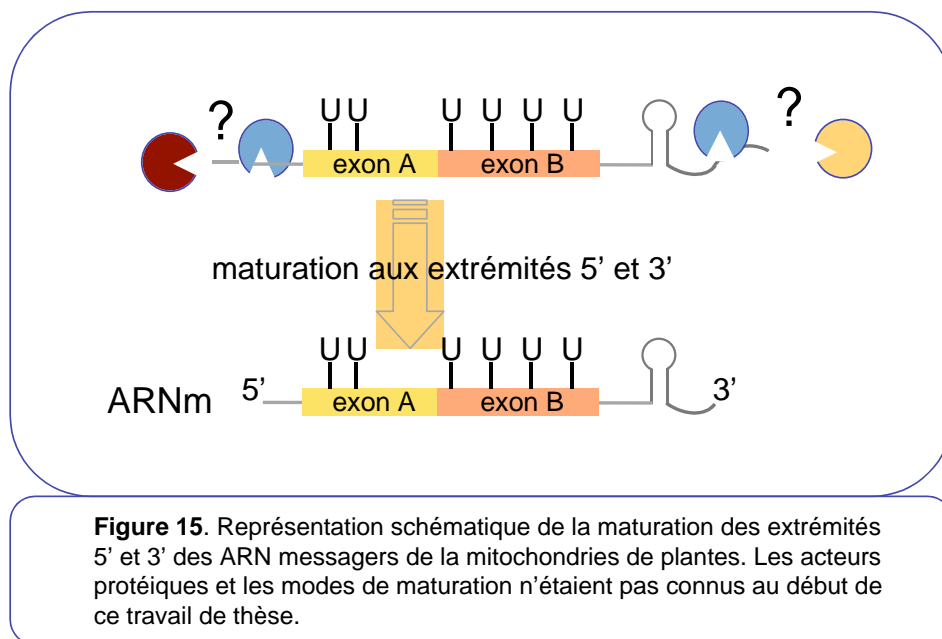
L'organisation des gènes d'ARN ribosomiques est généralement commune aux plantes supérieures. Le 18S et le 5S sont proches et co-transcrits, alors que le 26S est isolé. De même que les ARNt, les ARNr matures proviennent de la maturation de longs précurseurs (Mulligan *et al.* 1988; Maloney *et al.* 1989). Par contre, aucun système *in vitro* fiable n'a permis à ce jour l'analyse détaillée de la maturation des ARNr des mitochondries de plante. Il est possible que le système d'expression transitoire de gènes récemment mis au point (Farre *et al.* 2001) apporte des informations nouvelles quant aux mécanismes de maturation de ces ARNs.

1.4.2.3.3. Maturation des ARNm

Le profil d'expression des ARNm est extrêmement complexe. Cette complexité est due majoritairement aux extrémités 5' et 3' multiples, à la présence d'intermédiaires non épissés ou à la co-expression de certains gènes qui sont ensuite maturés en ARNm mono-

cistroniques (**figure 15**). Pour commencer l'étude de la maturation des ARNm, il est nécessaire de cartographier précisément les extrémités 5' et 3' des ARN avec diverses techniques dont celle qui consiste à circulariser les transcrits (Kuhn et Binder 2002).

Plusieurs extrémités 3' ont été localisées directement en aval de répétitions inversées qui peuvent se replier en des structures secondaires stables (Hoffmann *et al.* 1999). Ces structures secondaires représentent plutôt des signaux de maturation que des terminateurs de la transcription (Dombrowski *et al.* 1997). La maturation de longs précurseurs jusqu'aux extrémités 3' matures serait effectuée par une exonucléase 3'-5'. Une telle exonucléase n'a pas encore été caractérisée, bien que des gènes candidats existent dans le génome nucléaire d'*Arabidopsis thaliana* et soient actuellement à l'étude. Deux de ces gènes candidats ont fait l'objet d'une attention particulière durant le travail de cette thèse. Toutefois tous les transcrits ne possèdent pas de structures secondaires particulières à leur extrémité 3', suggérant l'existence de mécanisme(s) additionnel(s) pour expliquer la formation de l'extrémité 3' mature de ces transcrits mitochondriaux.



Il existe beaucoup moins d'informations disponibles sur la formation des extrémités 5' matures. L'identification de gènes impliqués dans la maturation en 5' des transcrits mitochondriaux bénéficiera certainement des études de la restauration de la fertilité de mutants mâles stériles cytoplasmiques (CMS). Dans plusieurs cas, l'expression des

gènes restaurateurs de la fertilité (Rf) modifie le profil d'expression de l'ARNm associé au phénotype de CMS (Monéger *et al.* 1994; Tang *et al.* 1996; Menassa *et al.* 1999). Récemment des gènes restaurateurs affectant le profil d'expression de transcrits associés à la CMS chez le pétunia et le riz ont été identifiés (Bentolila *et al.* 2002; Kazama et Toriyama 2003). Ces gènes codent des protéines adressées à la mitochondrie appartenant à une large famille de protéines ayant des répétitions de pentatricopeptide (PPR) (Small et Peeters 2000; Lurin *et al.* 2004). Mais il reste à déterminer leurs modes d'action dans la maturation des ARNm mitochondriaux.

I.4.2.4. Addition aux extrémités 3' de nucléotides qui ne sont pas codés par le génome

Les techniques classiques de cartographie des extrémités 3' des transcrits comme les protections à la RNase ou à la nucléase S1 ne prennent pas en compte le fait qu'il peut exister une addition post-transcriptionnelle de nucléotides dans les mitochondries. Pourtant récemment, deux groupes, en utilisant l'ancrage d'un oligonucléotide en 3' des ARN suivi d'une synthèse de cDNA, puis d'une amplification PCR, ont observé des nucléotides non codés par le génome à l'extrémité 3' d'ARN mitochondriaux (Williams *et al.* 2000), (Kuhn *et al.* 2001)). C'est le cas notamment pour *rps12*, *cox2*, et *atp9* de maïs. Pour les transcrits du gène *rps12*, 90% des clones analysés comportent 1 à 4 C ou A supplémentaires, la majorité se terminant par CCA. La prévalence de ce triplet de nucléotides suggère son ajout par une activité ARNt nucléotidyl transférase. Cependant ces nucléotides ajoutés pourraient jouer un rôle biologique qui reste à déterminer. Une étude similaire a été effectuée chez le chloroplaste pour un transcrit et les résultats ont montré que les extensions de nucléotides non codés par le génome trouvées en 3' correspondaient à la séquence complémentaire de l'extrémité 3'. Cette observation pourrait être liée à la présence d'une activité RNA polymérase RNA-dépendante (RdRp) (Zanduetta-Criado et Bock 2004).

I.4.2.5. Polyadénylation et stabilité des transcrits mitochondriaux

Le niveau d'expression d'un gène résulte d'un équilibre entre ses taux de transcription, de stabilisation et de dégradation. En effet, l'abondance relative d'un transcrit fonctionnel à un moment donné n'est due qu'en partie seulement à son taux initial de synthèse. Mais l'accumulation d'un transcrit particulier est aussi le résultat de son taux de dégradation propre. Or les transcrits matures des mitochondries de plantes présentent une variabilité importante de leur niveau d'expression et de leur taux de dégradation (Giege *et al.* 2000). La stabilité des ARN paraît donc être un point de contrôle important de l'expression des gènes de la mitochondrie de plante.

Comme nous l'avons vu ci-dessus, la structure de l'extrémité 3' d'un transcrit est déterminante pour sa stabilité. Par exemple cela a été montré *in vivo* pour les ARNs de l'*orf138* associée à la stérilité mâle cytoplasmique Ogura chez le colza (Bellaoui *et al.* 1997). Les structures en tige-boucle à l'extrémité 3' peuvent stabiliser un transcrit soit en empêchant la progression d'exoribonucléases 3'-5', soit en étant reconnues par des protéines liant l'ARN qui protégeraient les transcrits de leur dégradation. Bien qu'une famille de protéines liant l'ARN ait été identifiée (Vermel *et al.* 2002), leur rôle dans la stabilisation de transcrits n'a pas été prouvé.

Récemment il a été montré que des transcrits mitochondriaux de plante pouvaient être polyadénylés. Par exemple chez le tournesol, où le phénotype PET1-CMS (Petiolaris Cytoplasmic Male Sterility) est dû à la présence d'un nouveau gène *orf522* en aval d'*atp1*. Lors de la restauration de la fertilité, les transcrits discistroniques *atp1-orf522* sont spécifiquement dégradés pendant le développement du pollen (Monéger *et al.* 1994). L'augmentation de la polyadénylation des co-transcrits *atp1-orf522* est corrélée à la dégradation préférentielle tissu-spécifique de ces ARN (Gagliardi et Leaver 1999) (**figure 16**). De plus des substrats polyadénylés correspondant à la partie 3' UTR des co-transcrits *atp1-orf522* sont dégradés *in vitro* plus efficacement que les mêmes substrats non-polyadénylés. Dans

le maïs, les ARN de *cox2* peuvent aussi être polyadénylés, cependant l'effet déstabilisateur des extensions poly(A) était restreint dans le système de dégradation *in vitro* utilisé (Lupold 1999).

Un mécanisme de dégradation des ARN impliquant la polyadénylation a été mis en évidence en premier lieu chez les bactéries (Hajnsdorf *et al.* 1995; O'Hara *et al.* 1995; Xu et Cohen 1995), puis chez le chloroplaste (Kudla *et al.* 1996; Lisitsky *et al.* 1996; Hayes *et al.* 1999; Schuster *et al.* 1999). Si ce type de mécanisme a été mis en évidence pour un transcrit chimérique mitochondrial dans une lignée de tournesol (Gagliardi et Leaver 1999), il n'existait aucune information sur un mécanisme de dégradation des ARNm mitochondriaux "classiques" impliquant la polyadénylation avant les travaux présentés dans cette thèse.

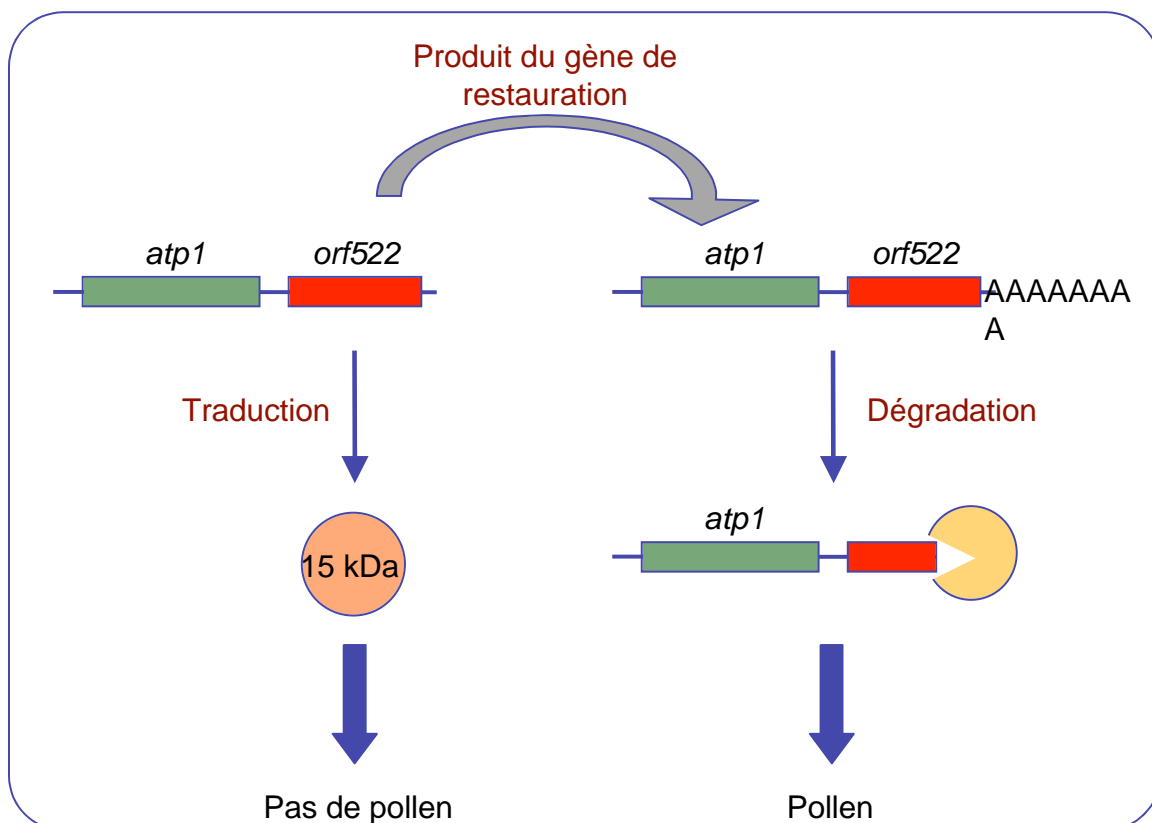


Figure 16. Modèle pour la restauration de la fertilité dans le système de CMS PET-1 du tournesol. L' *orf522* est co-transcrit avec *atp1* et traduit en une protéine de 15 kDa qui empêche la formation de pollen. Avec l'expression de gènes de restauration, les transcrits *atp1-orf522* sont préférentiellement polyadénylés et dégradés comparés aux autres transcrits mitochondriaux. La dégradation préférentielle de ces transcrits prévient la formation de la protéine de 15 kDa et la production de pollen est restaurée.

I.5. Dégradation des ARN et polyadénylation

I.5.1. Machinerie de dégradation et polyadénylation chez *E. coli*

I.5.1.1. Mécanismes de dégradation des ARN chez *E. coli*

Le modèle de la dégradation des ARNm procaryotiques implique une action combinée d'endonucléases et d'exonucléases 3' 5'. La dégradation est initiée par un ou plusieurs clivages endonucléolytiques suivis par la digestion des fragments résultants à partir de leur extrémité 3' par des exonucléases 3'-5' (**figure 17**). Six enzymes sont connues pour participer à la dégradation des ARN messagers. Trois d'entre elles sont des endonucléases : la RNase E, la RNase G, et la RNase III. Les trois autres sont des exonucléases 3'-5' : la RNase II, la polynucléotide phosphorylase (PNPase) et l'oligoribonucléase.

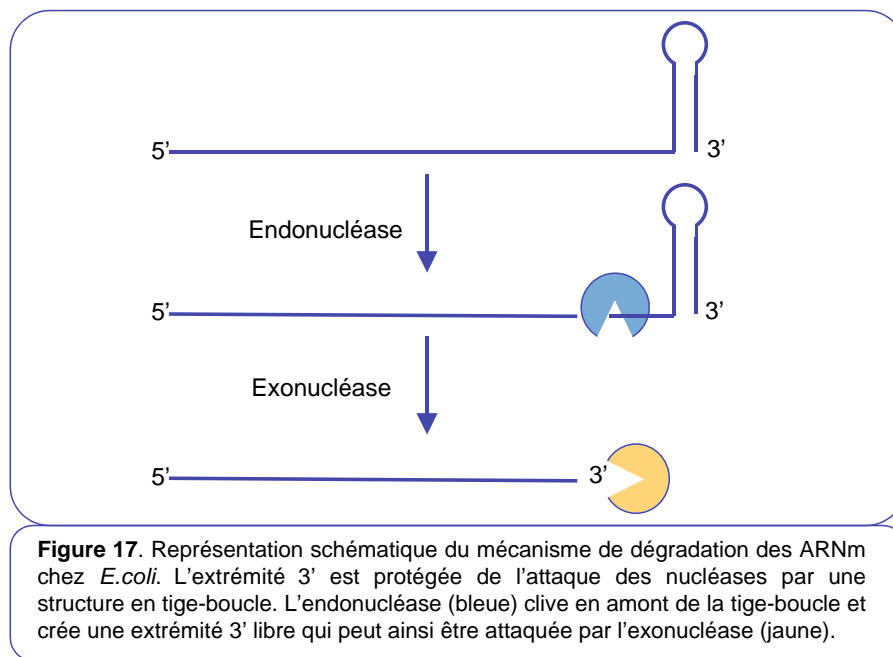


Figure 17. Représentation schématique du mécanisme de dégradation des ARNm chez *E. coli*. L'extrémité 3' est protégée de l'attaque des nucléases par une structure en tige-boucle. L'endonucléase (bleue) clive en amont de la tige-boucle et crée une extrémité 3' libre qui peut ainsi être attaquée par l'exonucléase (jaune).

1.5.1.1.1. La RNase E

L'enzyme principale de l'initiation de la dégradation des ARN est l'endoribonucléase E (Coburn et Mackie 1999; Regnier et Arraiano 2000). La RNase E reconnaît des sites de clivages de l'ARN simple brin, de préférence dans des régions A/U riche et effectue des coupures endonucléolytiques qui déclenchent la dégradation des ARN (Cormack et Mackie 1992; Ehretsmann *et al.* 1992; McDowall *et al.* 1994; McDowall *et al.* 1995). Les fragments résultants sont ensuite dégradés par des exoribonucléases 3' 5'. Le gène codant pour la RNase E fut identifié pour son rôle dans la maturation du précurseur de l'ARN ribosomal 5S (Ghora et Apirion 1978).

La RNase E est une enzyme dont l'activité dépend de l'accessibilité de l'extrémité 5'. En effet, des ARN circularisés comportant des sites de clivages caractérisés sont résistants à la coupure *in vitro*, comme le sont les mêmes ARN dont l'extrémité 5' est protégée par un oligonucléotide complémentaire. Elle a une action plus rapide sur des transcrits arborant un 5' monophosphate issus d'une maturation que sur des transcrits primaires possédant un 5' triphosphate, ce qui n'est pas sans conséquences sur la stabilité relative de ces transcrits (Mackie 1998). Ces caractéristiques expliquent que des déterminants en 5' des ARN peuvent gouverner leur stabilité. De plus, bien que contrairement aux eucaryotes, une activité 5' 3' exonucléase n'ait jamais été identifiée dans les procaryotes, la dégradation des ARN messagers montre souvent une direction 5' 3'. En réalité il se pourrait qu'après un clivage initial en 5', l'endoribonucléase suive la progression des ribosomes jusqu'aux sites de clivages suivants. Ce mouvement de clivages successifs de 5' vers 3' pourrait créer cette impression de progression 5' 3' de la dégradation des ARN. De manière générale, il est admis qu'une première étape de coupure endonucléolytique par la RNase E détermine le taux de dégradation (Regnier et Hajnsdorf 1991). Cette coupure intervient à des sites de reconnaissance, soit en amont de structures en tige-boucle situées en 3', soit à des sites proches de l'extrémité 5'. Dans tous les cas, dans une deuxième étape, les fragments générés par un clivage endonucléolytique sont dégradés par des exonucléases 3' 5'.

1.5.1.1.2. Le dégradosome d'*E. coli*

Un complexe enzymatique appelé “dégradosome” est impliqué dans la maturation et la dégradation des ARN dans le système modèle bactérien *E. coli*. Il a été isolé lors d’efforts déployés pour la purification de l’endonucléase RNase E (Carpousis *et al.* 1994; Py *et al.* 1994). Le noyau du dégradosome est composé de la RNase E, de la PNPase, de l’hélicase RhlB et de l’énolase (**figure 18**). 5 à 10% de l’énolase cellulaire forment un complexe avec le dégradosome. Un de ses rôles récemment identifié est de réguler la stabilité des ARN de *ptsG* (gène qui code pour un transporteur de glucose) en réponse à un stress métabolique (Morita *et al.* 2004). Un dégradosome minimal a pu être reconstitué *in vitro* à partir de protéines purifiées comprenant la RNase E, l’hélicase RhlB et la PNPase. Ce dégradosome minimal dégrade efficacement et de manière semblable à des dégradosomes isolés de cellules, des ARN hautement structurés (Coburn *et al.* 1999). Par ailleurs il a été établi que des dégradosomes étaient effectivement présents *in vivo* par des études de microscopie électronique et des marquages à l’or, et que ces complexes étaient liés à la membrane cytoplasmique par la partie N-terminale de la RNase E.

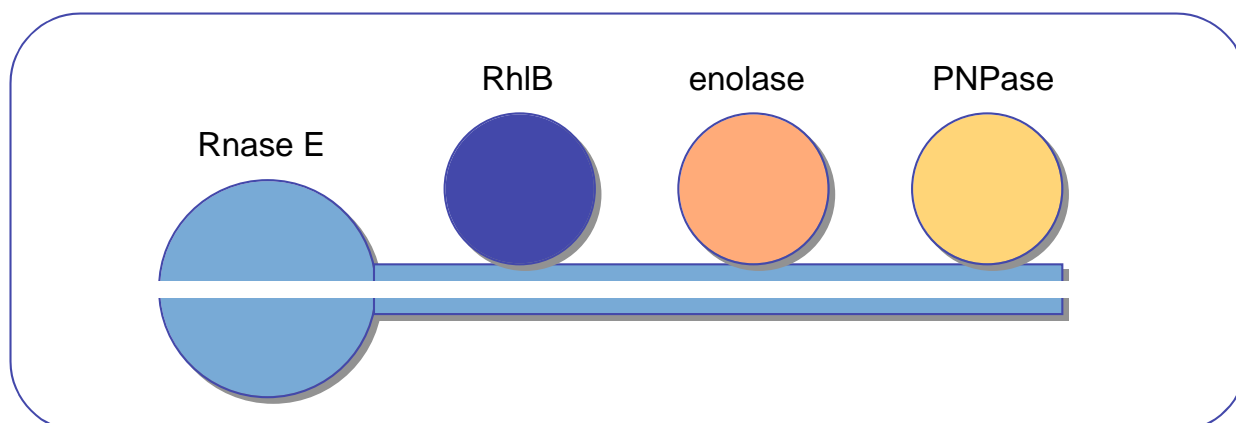
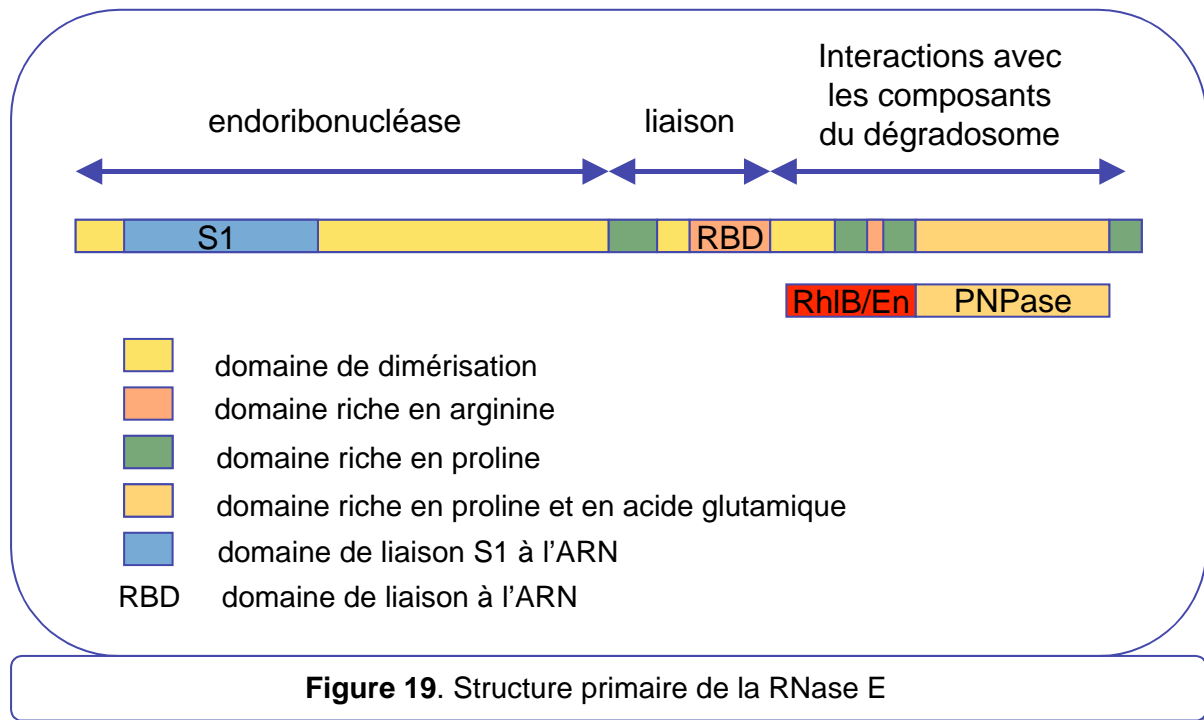


Figure 18. Dessin figurant les interactions entre protéines dans le dégradosome d'*E. coli*. D’après Vanzo NF et al, Genes and Dev. Vol.12, pp. 2770-2781, 1998.

I.5.1.1.3. Rôle structural de la RNase E dans le dégradosome



Le domaine catalytique indispensable à la survie de la cellule est situé dans la moitié N-terminale de la RNase E. La moitié C-terminale, quant à elle, contient une jonction riche en proline, un domaine de liaison à l'ARN riche en arginine et une région qui structure les interactions protéines-protéines avec les autres composants du dégradosome (**figure 19**): l'hélicase RhIB, l'énolase et la PNPase (Taraseviciene *et al.* 1995; McDowall et Cohen 1996; Kaberdin *et al.* 1998; Vanzo *et al.* 1998). Une région stimulant l'activité de l'hélicase RhIB a été identifiée, de plus la RNase E est capable d'interagir avec elle-même (Vanzo *et al.* 1998). La purification de la partie C-terminale comportant un épitope Flag est suffisant pour recruter les autres protéines du complexe (Kaberdin *et al.* 1998). Cependant vue l'importance de la partie C-terminale de la RNase E dans la structuration du dégradosome, il est surprenant de constater que cette partie est moins conservée que la partie N-terminale dans les différentes espèces bactériennes, pointant ainsi les limites du modèle *E. coli* en ce qui concerne le dégradosome (Kaberdin *et al.* 1998). Le fait que la RNase E puisse interagir avec elle-même conduit à la possibilité qu'au moins un dimère

de la protéine puisse exister. Sur la base de la molarité des protéines du dégradosome estimée d'après différentes préparations, le dégradosome pourrait contenir au moins un trimère de PNPase, un dimère d'énolase, et un dimère de RhlB (Carpousis *et al.* 1994; Miczak *et al.* 1996; Coburn *et al.* 1999).

1.5.1.1.4. Rôle de l'hélicase RhlB

L'association d'une hélicase avec le dégradosome est particulièrement intéressante. La RNase E et la PNPase sont spécifiques de l'ARN simple brin et toutes les deux sont gênées par les structures secondaires, ainsi l'hélicase RhlB déroulerait les structures se-

condaires pour permettre l'accès de la RNase

E aux sites de clivages (Miczak *et al.* 1996).

De plus elle faciliterait aussi l'action de la

PNPase (**figure 20**). Pour conforter cette

hypothèse, la dégradation par le dégradosome

de substrats ARN contenant des

éléments REP ("Repetitive Extragenic Pa-

lindrome") et l'extrémité 3' hautement

structurée de l'ARN de la protéine S20, est

stimulée dans des conditions qui activent

l'hélicase (Py *et al.* 1996; Blum *et al.* 1999;

Coburn *et al.* 1999). De plus des anticorps

dirigés contre la RhlB inhibent la dégrada-

tion par la PNPase qui sinon traverse les

structures en tige-boucle des éléments

REP. Ceci montre qu'une hélicase peut

avoir un rôle actif dans la dégradation des

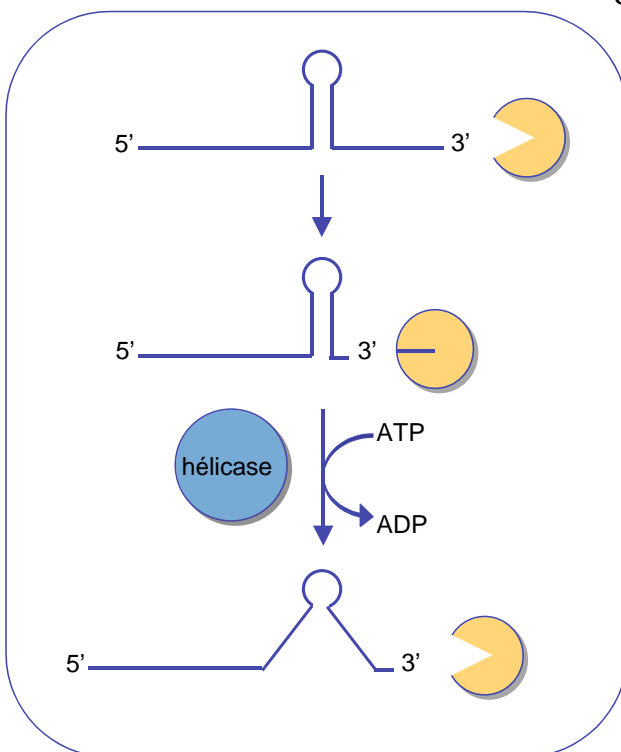


Figure 20. Représentation schématique du rôle de l'hélicase RhlB dans la dégradation des ARNm d'*E.coli*. Sans l'activité hélicase, la progression de la PNPase (jaune) est stoppée par la structure en tige-boucle. L'hélicase (bleu) hydrolyse l'ATP pour dérouler la tige-boucle, facilitant la dégradation de l'ARN par l'exonucléase. {Carpousis, 1999 #18}

ARN en favorisant la progression d'une exonucléase (Py *et al.* 1996).

1.5.1.1.5. La PNPase et la RNase II

La polynucléotide phosphorylase d'*E. coli* est codée par le gène *pnp*. La PNPase existe sous forme d'homotrimère dont la sous unité a un poids moléculaire de 78 kDa. C'est une exonucléase phosphorolytique qui dégrade l'ARN dans le sens 3' 5' en utilisant du phosphate inorganique et en libérant des nucléosides diphosphates qui peuvent inhiber l'enzyme. Mais elle peut aussi fonctionner de manière reverse en synthétisant de l'ARN à partir de nucléosides diphosphates et ainsi ajouter des hétéropolymères aux fragments d'ARNm générés par la RNase E (Mohanty et Kushner 2000). La PNPase est responsable de 10 % de l'activité exonucléasique chez *E. coli* (Deutscher et Reuven 1991). Chez cet organisme, c'est une protéine de "cold shock", importante pour la croissance à basse température.

Il est important de noter qu'une enzyme clé de la dégradation, comme la RNase II, n'a, quant à elle, jamais été détectée dans les préparations de dégradosomes. La RNase II est codée par le gène *rnb*. C'est une exoribonucléase 3' 5' hydrolytique qui génère des nucléosides 5' monophosphates (Spahr 1964) et qui est responsable de 90% de l'activité exoribonucléasique hydrolytique chez *E. coli*. La RNase II est un monomère de 72,5 kDa, dont le substrat préféré est le poly(A) (Cao et Sarkar 1992; Mohanty et Kushner 2000). La RNase II, comme la PNPase, est gênée par les structures secondaires (Coburn et Mackie 1996; Spickler et Mackie 2000). Leur incapacité à dégrader des petits oligoribonucléotides (3-5 nt) montre l'importance du rôle de l'oligoribonucléase pour achever la dégradation des ARN (Ghosh et Deutscher 1999).

L'inactivation de la PNPase ou de la RNase II est viable en revanche l'inactivation des deux ne l'est pas. La double inactivation entraîne l'accumulation d'intermédiaires de dégradation générés par des clivages endonucléolytiques (Donovan et Kushner 1986; Hajnsdorf *et al.* 1996), ce qui a conduit à penser que ces RNases agissent essentiellement sur ces produits de dégradation. Une étude à l'échelle du génome a montré que l'inactivation de la PNPase conduit à l'accroissement du niveau d'expression de 17,3% des ARNm. L'inactivation de la RNase II conduit à l'accroissement du niveau d'expression de

7,3% des ARNm, mais aussi à une diminution de l'expression de 31% des ARNm incluant la plupart des ARN codants pour les protéines ribosomales (Mohanty et Kushner 2003). Ces résultats suggèrent que les deux RNases ont une influence sur la stabilité de transcrits entiers et qu'une fonction majeure de la RNase II est de protéger certains ARNm de l'action d'autres RNases (Hajnsdorf *et al.* 1994).

1.5.1.1.6. D'autres partenaires protéiques du dégradosome

D'autres partenaires protéiques ont par la suite été identifiés comme interagissant avec la RNase E. Par exemple, GroEL, une protéine chaperonne et de "heat shock", co-purifie avec une activité RNase E-like (Sohlberg *et al.* 1993). Par ailleurs en utilisant une protéine RNase E de fusion marquée par un épitope Flag et purifiée contre des anticorps monoclonaux, l'interaction avec la PNPase a été confirmée et d'autres partenaires protéiques identifiés comme DnaK une autre protéine de « heat shock » (Miczak *et al.* 1996). Des interactions supplémentaires ont été décrites avec la polyphosphate kinase (Blum *et al.* 1997), la poly(A) polymérase PAP I (Raynal et Carpousis 1999) et pour finir la protéine S1, une composante de la sous-unité 30S du ribosome (Feng *et al.* 2001). Il a été montré que le dégradosome contenait aussi des fragments d'ARN, comme des substrats connus de RNase E ou des fragments d'ARN ribosomaux. Ainsi, le dégradosome serait aussi impliqué dans la dégradation des ARNr (Bessarab *et al.* 1998). Si GroEL et DnaK peuvent jouer un rôle dans l'assemblage du dégradosome, elles ne sont pas nécessaires à l'activité de la RNase E et de la PNPase (Coburn et Mackie 1998). Il faut noter que la polyphosphate kinase, présente de manière substoechiométrique, peut lever l'inhibition que provoque le polyphosphate sur la dégradation de l'ARN en régénérant de l'ATP à partir de l'ADP et du poly(P) (Rauhut et Klug 1999).

I.5.1.2. Polyadénylation des ARN chez *E. coli*

L'addition de multiples résidus adénosine à l'extrémité 3' des transcrits nucléaires des cellules eucaryotes joue un rôle important pour générer des ARN messagers stables et fonctionnels. Bien que l'adénylation des ARN ait aussi été observée chez les procaryotes, son rôle biologique était incompris jusqu'en 1995 (Hajnsdorf *et al.* 1995; O'Hara *et al.* 1995; Xu et Cohen 1995). Pourtant l'isolement de la poly(A) polymérase d'*E. coli* (August *et al.* 1962) a précédé de 10 ans la découverte de la polyadénylation des ARN messagers nucléaires eucaryotiques. Alors que dans le noyau des cellules eucaryotes, la maturation en 3' des transcrits synthétisés par l'ARN Polymérase II est obligatoirement associée à leur polyadénylation (Sachs et Wahle 1993), pendant longtemps aucun ARN polyadénylé ne fut détecté dans les bactéries. L'échec de cette détection a conduit à penser que la polyadénylation était une caractéristique exclusive des ARN messagers nucléaires. En conséquence, une attention moindre a été accordée à l'élucidation de la fonction de la polyadénylation des ARN dans les bactéries.

C'est en 1992 que le gène *pcnB* d'*E. coli*, caractérisé par la forte diminution du nombre de copies des plasmides de type ColE1 chez les mutants de ce gène (Lopilato *et al.* 1986), a été identifié comme codant pour une poly(A) polymérase (Cao et Sarkar 1992). Il a été observé que des mutants du gène *pcnB* montraient une diminution très forte du taux de dégradation de l'ARN I, le répresseur antisens de la réplication des plasmides de type ColE1 (He *et al.* 1993; Xu *et al.* 1993). De plus les ARN I, isolés de cellules sauvages, contrairement à ceux isolés de mutants *pcnB*, sont polyadénylés à leur extrémité 3' ainsi qu'à des sites internes exposés par la dégradation partielle des transcrits (Xu *et al.* 1993). Une cartographie comparable des sites de polyadénylation a été effectuée pour les transcrits de *rpsO* (ribosomal protein S15). Ils peuvent être polyadénylés, non seulement à leur extrémité 3', mais aussi à de multiples sites correspondant à des intermédiaires de dégradation produits soit par digestion exonucléolytique partielle, soit par coupures endonucléolytiques (Haugel-Nielsen *et al.* 1996).

1.5.1.2.1. Fonction de la polyadénylation chez *E. coli*

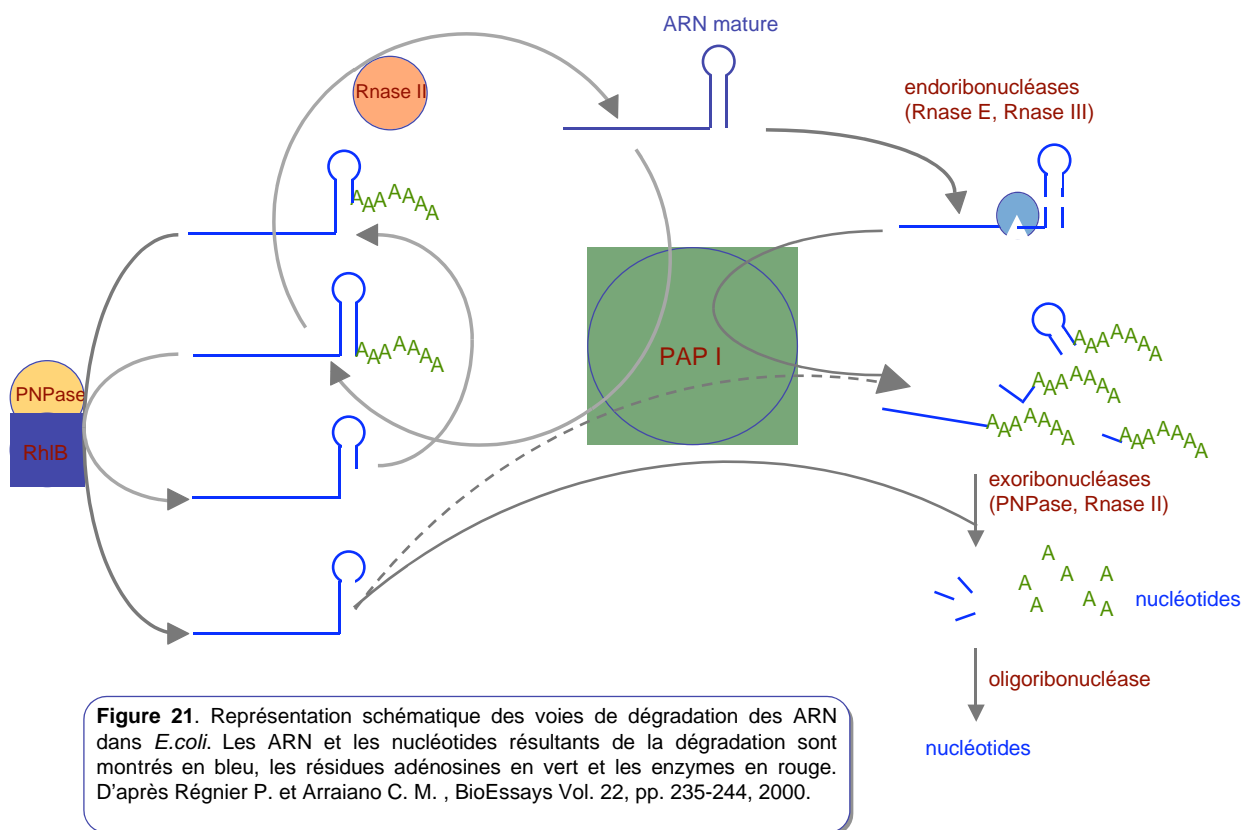
L'absence d'un produit fonctionnel du gène *pcnB* d'*E. coli* peut retarder aussi la dégradation des ARN messagers codés par les gènes *lpp* (lipoprotéine), *ompA* (outer membrane protein A), *trx A* (thioredoxin), et *rpsO* (Hajnsdorf *et al.* 1995; O'Hara *et al.* 1995). De plus, comme observé pour RNA I, des queues poly(A) *pcnB* dépendantes ont été identifiées pour les ARN *rpsO* (Hajnsdorf *et al.* 1995) et dans les ARN totaux isolés d'*E. coli* (O'Hara *et al.* 1995). L'addition de queues poly(A) à l'extrémité 3' des ARN par la poly(A) polymérase codée par le gène *pcnB* se produit donc largement chez *E. coli* sans spécificité de séquence et conduit à l'accélération de la dégradation des ARN polyadénylés. Par ailleurs ce processus post-transcriptionnel ne se limite pas aux ARNm, mais concerne aussi les ARN dit "stables" comme les ARN ribosomaux ou les ARN de transfert qui peuvent être oligoadénylés (Li *et al.* 1998).

La longueur et le nombre des queues poly(A) augmentent pour l'ARN I et sa demi-vie augmente 10 fois dans les bactéries mutées dans le gène *pnp* codant pour la PNPase (Xu et Cohen 1995). De même, les ARN *lpp* (Cao et Sarkar 1992) et les ARN totaux (O'Hara *et al.* 1995) augmentent en taille dans les mutants *pnp*, mutés aussi dans le gène *rnb* qui code pour la RNase II, la seule autre exonucléase 3'-5' connue pour attaquer les ARN messagers chez *E. coli*. Les résidus adénosine ajoutés par la poly(A) polymérase en 3' sont donc enlevés par une digestion exonucléasique 3'-5'. De plus, les propriétés de dégradation rapide conférées par la polyadénylation post-transcriptionnelle sont dépendantes de la PNPase. En effet, les queues poly(A) fournissent une prise pour la PNPase lui permettant de commencer son activité phosphorolytique à distance de structures secondaires et ainsi de passer au travers plus facilement (**figure 21**).

Enfin, bien que la polyadénylation en elle-même n'affecte pas directement le clivage endonucléolytique effectué par la RNase E, la mutation du gène *pnp* non seulement diminue l'activité de RNase E mais réduit aussi le taux de dégradation exonucléolytique à partir de l'extrémité 3'. Inversement, le clivage des transcrits par la RNase E favorise la dégradation 3'-5' par la PNPase. Ces observations montrent que les activités ribonucléo-

lytiques de la RNase E et de la PNPase trouvées, appartenant à un même complexe multi protéique, appelé “dégradosome”, (Carpousis *et al.* 1994; Py *et al.* 1994), (voir paragraphe précédent) sont fonctionnellement coordonnées. De plus, l’addition de queues poly(A) en 3’ d’ARN structurés stimule leur dégradation par ce dégradosome (Blum *et al.* 1999).

Alors que la RNase II est impliquée dans le retrait des queues poly(A) (Cao et Sarkar 1992; Marujo *et al.* 2000), cette enzyme paraît incapable de progresser à travers les transcrits avec une efficacité suffisante pour compenser l’absence de PNPase, et ne peut s’y substituer. En fait, il a été montré que la RNase II pouvait au contraire empêcher la digestion exonucléolytique 3’-5’ de la PNPase (Hajnsdorf *et al.* 1994; Pepe *et al.* 1994), stabiliser les ARN lorsque PAP I est active et les protéger de la dégradation par des exonucléases poly(A) dépendantes (**figure 21**). Par ailleurs il est possible que d’autres exonucléases 3’-5’ non identifiées soient affectées par l’adénylation à l’extrémité 3’, car les ARN polyadénylés sont dégradés plus vite dans les mutants *pnp* (Xu et Cohen 1995) et dans les doubles mutants *pnp, rnb* (Hajnsdorf *et al.* 1995), (O’Hara *et al.* 1995).



La polyadénylation des ARN, à l'opposé de la fonction stabilisatrice qu'elle joue pour les ARN nucléaires eucaryotes, favorise dans les bactéries un processus de digestion exonucléolytique 3'-5' efficace. Cette dégradation peut être effectuée soit par la PNPase libre, soit par la PNPase associée à d'autres protéines dans un complexe multienzymatique : le dégradosome. Par ailleurs, une autre RNase, la RNase II qui a une affinité particulière pour les extensions poly(A), s'avère, elle, incapable de traverser des structures secondaires stables. De ce fait, elle peut jouer un rôle antagoniste à la PNPase en stabilisant certains transcrits, soit en supprimant les queues poly(A) qui favorisent l'attaque de la PNPase, soit en entrant en compétition avec la PNPase du fait de sa forte affinité pour les extensions poly(A).

1.5.1.2.2. Modulation de la polyadénylation chez *E. coli*

De la même façon qu'il existe des protéines se liant aux extensions poly(A) (PABP) des ARNm nucléaires chez les eucaryotes, il était intéressant de savoir si des facteurs protéiques interagiraient de façon comparable chez les bactéries et pourraient affecter le métabolisme de la polyadénylation. Hfq, une protéine qui se lie à l'ARN, en particulier aux régions riches en A, et qui a été identifiée pour son rôle dans la réplication de l'ARN du phage Q, était un bon candidat. Une première étude a montré que Hfq stimulait l'élongation des queues poly(A) synthétisées par PAP I *in vitro* et affectait la longueur des queues poly(A) *in vivo* probablement en les protégeant ou en interagissant avec PAP I (Hajnsdorf et Regnier 2000). Une seconde étude a confirmé le rôle joué par Hfq dans l'augmentation de la taille moyenne des queues poly(A) et son implication dans la reconnaissance des extrémités 3' des ARN par la PAP I (Le Derout *et al.* 2003). Une troisième étude montre que Hfq protège les queues poly(A) de la digestion exonucléolytique aussi bien par la PNPase que par la RNase II *in vitro*. Hfq est une protéine qui est soumise à de nombreuses investigations pour déterminer ses rôles dans le métabolisme des ARN de plusieurs espèces bactériennes.

De la surexpression de la PAP I dans des conditions qui n'affectent ni la viabilité de la cellule, ni le taux de croissance (Mohanty et Kushner 1999), on apprend que la demi-vie des ARN messagers décroît généralement avec l'accroissement du taux d'ARNm polyadénylé. Toutefois, dans ces mêmes conditions certains transcrits sont stabilisés, et parmi eux, les ARNm codant les enzymes PNPase et RNase E. Cette stabilisation spécifique des ARNm des enzymes de la dégradation suggère que le taux de polyadénylation dans la cellule ajuste le niveau d'expression de ces enzymes par une boucle de régulation qu'il reste à déterminer (Mohanty et Kushner 2002).

I.5.1.3. Mécanismes de dégradation et polyadénylation des ARN chez

E. coli : résumé

Chez *E. coli*, la dégradation des ARN est initiée par des clivages endonucléolytiques effectués essentiellement par la RNase E, et plus rarement par la RNase G ou la RNase III. La RNase E fait partie d'un complexe enzymatique multi protéiques nommé "dégradosome". Le dégradosome est composé principalement d'une hélicase, RhlB, qui facilite la progression du dégradosome à travers les structures secondaires stables, d'une exonucléase 3'-5', la PNPase, et d'une enzyme glycolytique, l'énolase. Les fragments d'ARN résultant du découpage par des endonucléases sont alors polyadénylés par PAP I. Cette polyadénylation fournit une prise à la PNPase libre ou intégrée au dégradosome et favorise un processus efficace de digestion phosphorolytique 3'-5'. La dégradation des ARN est finalement achevée par l'oligoribonucléase. La polyadénylation peut être modulée par Hfq qui favorise la processivité de PAP I. Pour finir, la polyadénylation influence elle-même la stabilité des transcrits des enzymes de la dégradation RNase E et PNPase en augmentant leur durée de vie par un mécanisme qu'il reste à déterminer.

1.5.2. Stabilité et polyadénylation des ARN dans le chloroplaste

Les gènes chloroplastiques sont rarement régulés individuellement au stade transcriptionnel. Toutefois, deux gènes évolutivement reliés *psbA* et *psbD* qui codent pour le centre réactionnel D1/D2 du photosystème II sont sujets à une régulation transcriptionnelle. En effet D1 et D2 étant relativement instables et facilement détruits par la lumière, un fort éclaircissement augmente de façon spectaculaire leur taux de transcription. Dans l'algue verte unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii*, le taux de transcription chloroplastique montre une oscillation circadienne. Mais plus encore que le taux de transcription, c'est la stabilité des transcrits qui est déterminante pour l'expression du génome chloroplastique. Cette stabilité peut être influencée par des signaux de développement ou de l'environnement comme la lumière.

1.5.2.1. Régulation de la stabilité des ARN chloroplastiques par la lumière

La lumière a un impact sur la transcription, la maturation des ARN, et la traduction chloroplastiques. L'expression des gènes du chloroplaste durant le développement précoce de la plante est régulée au niveau de la transcription, et ensuite au niveau de la stabilité des transcrits. Dans l'orge, l'augmentation de la stabilité des ARNm au cours du développement du chloroplaste est indépendante de la lumière excepté *rbcL* dont les transcrits sont 2 à 10 fois moins stables à la lumière qu'à l'obscurité. De plus des feuilles d'épinard cultivées à l'obscurité accumulent moins d'ARN de *petD* que les feuilles cultivées à la lumière (Kudla *et al.* 1996). L'analyse de la dégradation *in vitro* des ARN de *petD* dans des extraits de protéines chloroplastiques montre qu'il existe deux voies de dégradation des ARN, l'une en présence de lumière, l'autre à l'obscurité. Les deux voies commencent par un clivage endonucléolytique suivi d'une dégradation exonucléolytique. À l'obscurité, le taux de dégradation des ARN *petD* augmente (Kudla *et al.* 1996; Lisitsky *et*

al. 1996). Il reste à déterminer dans quelle mesure cette augmentation de l'activité de dégradation est liée directement à l'absence de lumière.

I.5.2.2. Modes de dégradation des ARN chloroplastiques

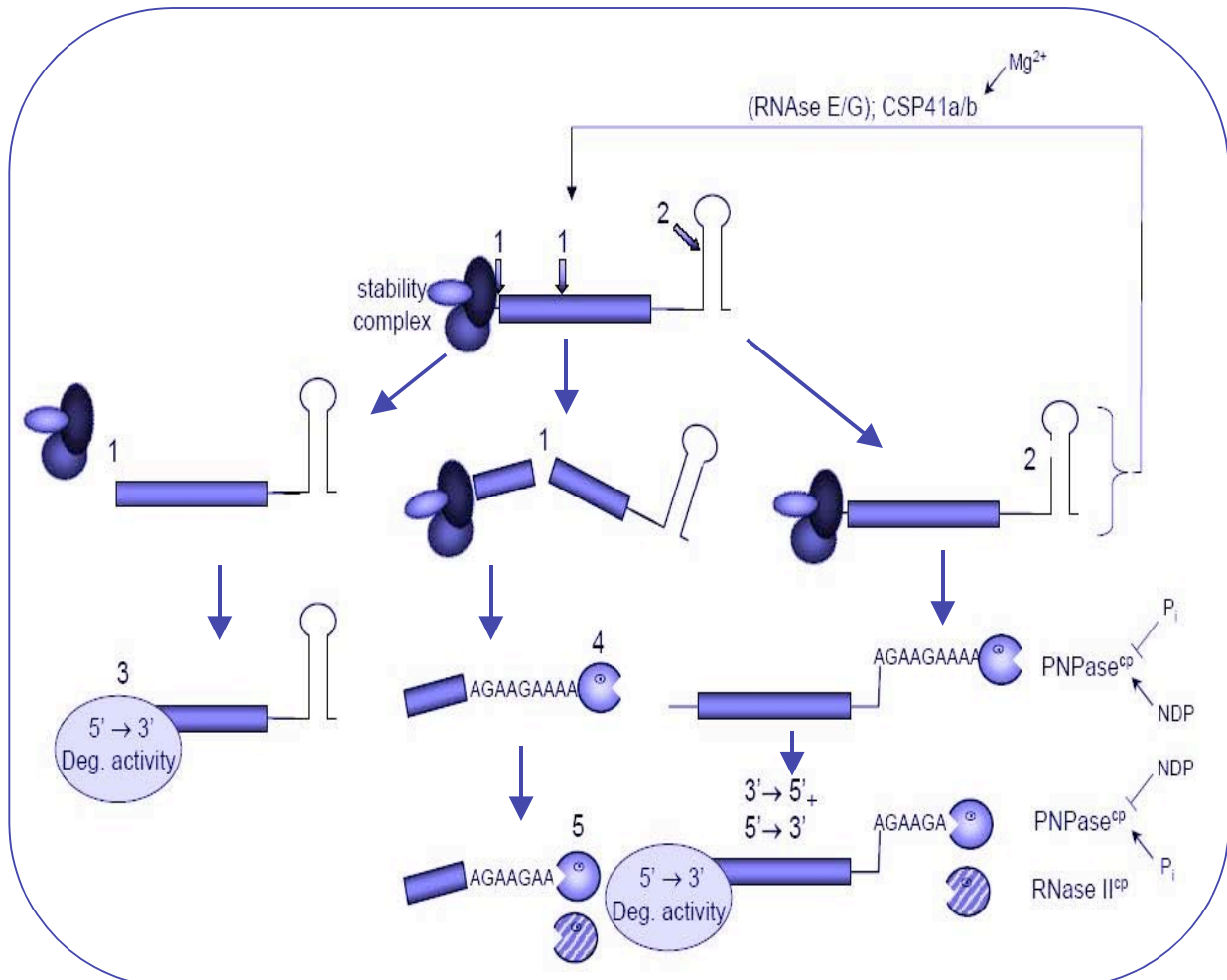


Figure 22. Un modèle de la dégradation d'un ARN messager chloroplastique avec une structure tige-boucle à l'extrémité 3'. La dégradation est initiée par des clivages endonucléolytiques dans la région codante et la partie 5'UTR (1) ou dans la partie 3'UTR (2). Ces clivages produisent des fragments qui sont soit sujet à leur tour à des clivages endonucléolytiques, soit dégradés par une activité exonucléasique 5'-3' (3) ou peuvent être polyadénylés par la PNPase (4). Les fragments polyadénylés sont ensuite dégradés par des exonucléases 3'-5' (PNPase ou RNase II) (5), ou sont dégradés simultanément dans le sens 5'-3' et 3'-5'. D'après Bollenbach et al. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol. 2004;78:305-37.

Un modèle de travail pour la dégradation des ARN chloroplastiques est le suivant: les étapes initiales pourraient être le retrait d'un complexe stabilisateur en 5' suivi par une digestion exonucléolytique 5'-3', ou plus probablement une vague de clivages endonucléolytiques suivi par la polyadénylation et une dégradation exonucléolytique 3'-5'. Sinon, de manière un peu similaire à ce qui existe chez *E. coli*, un clivage endonucléolytique peut détruire la tige-boucle située en 3' pour initier le processus de dégradation. Puis ce clivage est suivi par la polyadénylation des fragments résultant et leur dégradation exonucléolytique 3'-5' (**figure 22**).

Toutefois, il est possible qu'il existe une seconde voie de dégradation pour les ARN chloroplastiques. En effet, il a été montré que des facteurs codés par le noyau protégeaient les ARNm d'une dégradation 5'-3' (Drager *et al.* 1998). Ce mode de dégradation est surprenant, puisque les procaryotes n'ont pas d'exonucléases 5'-3' codées dans leur génome. Il est possible que cette observation soit due à une vague de clivages endonucléolytiques. Plusieurs gènes codant pour des facteurs de stabilité ont été clonés et identifiés comme appartenant à la famille des PPR/TPR (pentatricopeptide/tetratricopeptide repeats) (Boudreau *et al.* 2000; Vaistij *et al.* 2000). Ces protéines sont trouvées *in vivo* dans des complexes de haut poids moléculaire qui contiennent leur ARN cible.

1.5.2.3. Polyadénylation des ARN chloroplastiques

La présence de séquences poly(A) et d'une activité de polyadénylation des ARN dans les préparations de chloroplastes a été décrite il y a 30 ans (Haff et Bogorad 1976; Rosen et Edelman 1976)). Mais, de même que pour *E. coli*, le rôle biologique de cette polyadénylation ne fut expliqué que bien plus tard. Ce n'est que lorsque le rôle joué par la polyadénylation dans le ciblage vers une dégradation rapide des ARN chez *E. coli* (en opposition avec les rôles dans la stabilité et la compétence traductionnelle qu'elle joue pour les ARNm nucléaires) que cette découverte a conduit à s'interroger sur le rôle

éventuel de la polyadénylation dans une voie de dégradation chez le chloroplaste et en quoi ce rôle pouvait différer de celui identifié pour *E. coli*.

1.5.2.3.1. Caractéristiques de la polyadénylation chloroplastique

Des études par RT-PCR avec un oligo-dT ont révélé que, contrairement aux courtes queues poly(A) homopolymériques d'*E. coli*, les extensions pouvaient atteindre chez les chloroplastes une longueur de plusieurs centaines de nucléotides et étaient composées de 70% d'adénosine, 25% de guanosine, 5% de cytidine et d'uridine chez l'épinard et de plus de 95% d'adénosine chez *Chlamydomonas*. Pour la plupart, les queues riches en poly(A) sont ajoutées au niveau de sites internes des transcrits plutôt qu'à leur extrémité 3' mature. De fait, plusieurs sites de polyadénylation dans les ARN de *psbA* coïncident avec des sites de clivages endonucléolytiques cartographiés par extension d'amorce en utilisant le système *in vitro* de dégradation des ARN chloroplastiques (Lisitsky *et al.* 1996).

La polyadénylation survient 50 fois plus à des sites internes qu'aux extrémités 3' matures. Les extrémités 3' matures ne sont pas de bons substrats pour l'enzyme responsable de la polyadénylation. De fait, la plupart des ARNm chloroplastiques se terminent par une structure en tige-boucle qui en plus de les protéger de l'attaque d'exonucléases, empêche stériquement la polyadénylation. Cela force la dégradation des ARN chloroplastiques vers une voie dépendante des endonucléases.

1.5.2.3.2. Rôle de la polyadénylation dans le mécanisme de dégradation des ARN chloroplastiques

Le fait que la polyadénylation conduise les produits des clivages endonucléolytiques vers une dégradation rapide a été confirmé par des expériences utilisant des lysats chloroplastiques et la cordycépine (3'-dATP) comme inhibiteur de la polyadénylation. En effet, en bloquant la polyadénylation par de la cordycépine, il a été observé que les trans-

crits *psbA* était clivés par des endonucléases mais que les produits de clivage s'accumulaient. De plus une étude effectuée *in vivo* chez *Chlamydomonas* confirme que la polyadénylation confère aux transcrits une plus grande instabilité. Un gène de GFP polyadénylé a été introduit dans le génome du chloroplaste de *Chlamydomonas*. Il a été construit pour que l'extension poly(A) soit exposée en 3' après le clivage par la RNase P en amont d'un gène de tRNA. Dans les lignées transformées avec cette construction, aucune fluorescence ne pouvait être détectée, alors que dans les lignées transformées soit avec la construction sans extension poly(A), soit avec la construction avec une extension poly(A+U) la quantité de fluorescence de la GFP était relativement élevée (**figure 23**).

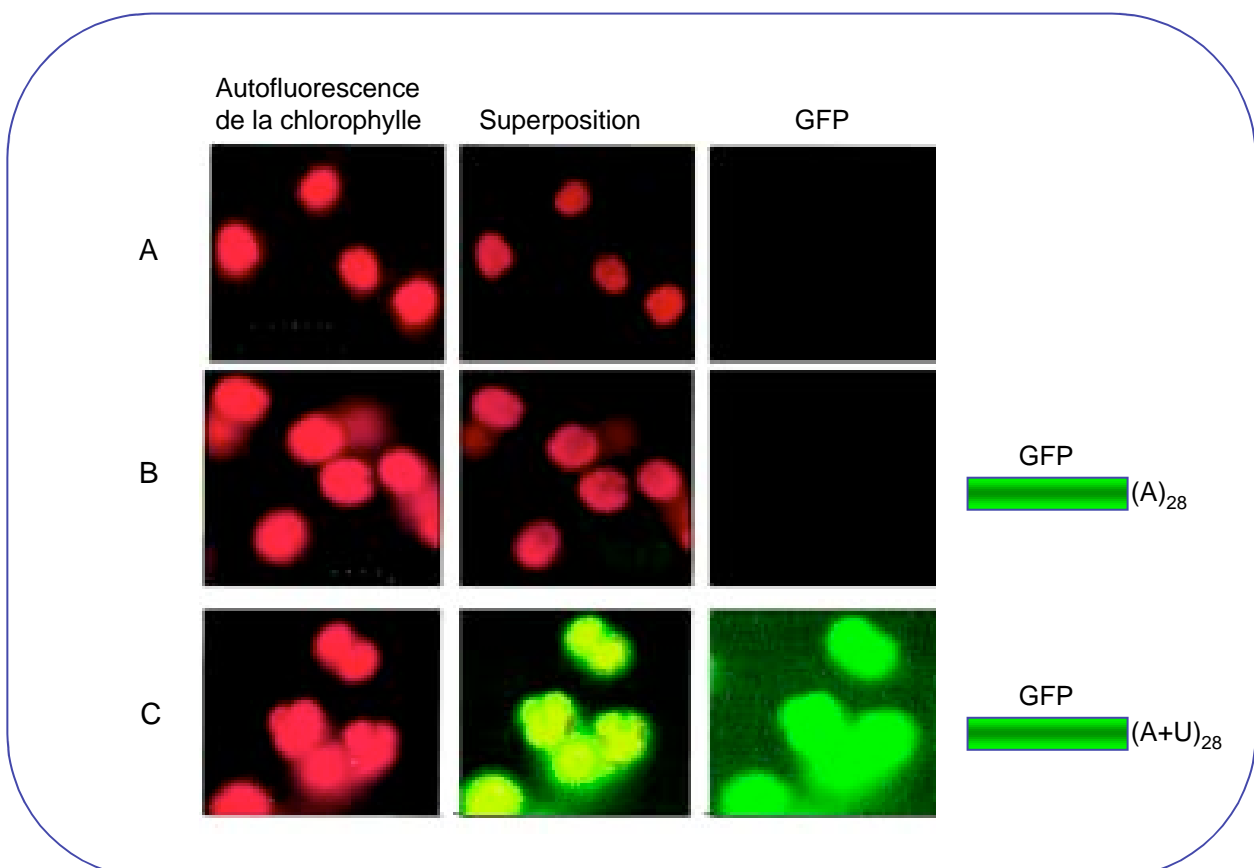


Figure 23. L'utilisation de la GFP montre l'instabilité que confère une extension poly(A) à un ARN *in vivo*.

A: cellules sauvages

B: chloroplastes transformés avec une construction GFP-(A)₂₈

C : chloroplastes transformés avec une construction GFP-(A+U)₂₈.

D'après Bollenbach et al. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol. 2004;78:305-37.

Dans des extraits de protéines chloroplastiques solubles, des ARN polyadénylés ou non sont dégradés à une vitesse comparable. En revanche lorsque les deux types de substrats sont mélangés, les ARN polyadénylés sont moins stables que les ARN non polyadénylés. Les ARN polyadénylés sont donc préférentiellement dégradés par les RNases présentes dans l'extrait (Kudla *et al.* 1996; Kushner 2002). Les mêmes résultats sont obtenus en utilisant la PNPase chloroplastique purifiée. La dégradation préférentielle des ARN polyadénylés par la PNPase peut être expliquée par la présence d'un site de liaison à l'ARN polyadénylé de haute affinité dans son domaine S1.

Ainsi, comme c'est le cas chez *E. coli*, l'une des voies de dégradation des ARN messagers chloroplastiques est initiée par des clivages endonucléolytiques suivi par l'addition de queues poly(A) aux produits des clivages. Puis, les queues poly(A) sont le signal qui conduit ces fragments vers une digestion rapide par une exonucléase qui dégrade préférentiellement les ARN polyadénylés (Hayes *et al.* 1999; Schuster *et al.* 1999; Monde *et al.* 2000).

Une des différences majeures avec le système bactérien de dégradation est l'absence d'un complexe multiprotéique de haut poids moléculaire similaire au dégradosome. Bien que d'autres complexes de ribonucléases, d'hélicases et de protéines additionnelles aient été décrits dans d'autres bactéries (Jager *et al.* 2001) et dans la mitochondrie de levure (Dziembowski *et al.* 2003), aucun complexe comparable n'a encore été caractérisé dans les chloroplastes et les cyanobactéries (Baginsky *et al.* 2001; Rott *et al.* 2003).

I.5.2.4. Endoribonucléases chloroplastiques

I.5.2.4.1. La RNase E/G

Chez *E. coli*, la durée de vie des ARN est supposée dépendre de clivages endonucléolytiques effectués par la RNase E (Kuwano *et al.* 1977; Ono et Kuwano 1979) (voir paragraphes précédents). De plus, le génome d'*E. coli* code pour un homologue de la RNase E, produit du gène *cafA* appelé CafA ou la RNase G (McDowall *et al.* 1993). La

RNase G partage des homologies avec le domaine catalytique de RNase E, mais ne possède pas l'équivalent du domaine C-terminal. Une RNase E/G a aussi été identifiée chez *Synechocystis*. Cette protéine est capable de compléter les mutants délétés dans le gène *ams* codant pour la RNase E d'*E. coli* bien qu'étant incapable de s'intégrer dans un complexe similaire au dégradosome. Chez les plantes, le génome nucléaire d'*A. thaliana* code pour un seul gène annoté comme une protéine RNase E/G-like (At2g04270) (**figure 24**). Pour ce gène, il existe un épissage alternatif qui conduit à la production de divers ARN et donc de différents variants protéiques. L'extrémité 5' des ARNm n'étant pas déterminée, il est difficile d'effectuer des prédictions de l'adressage de cette protéine. D'autres génomes de plantes semblent coder pour des protéines similaires, mais il reste à confirmer expérimentalement leur adressage vers le chloroplaste.

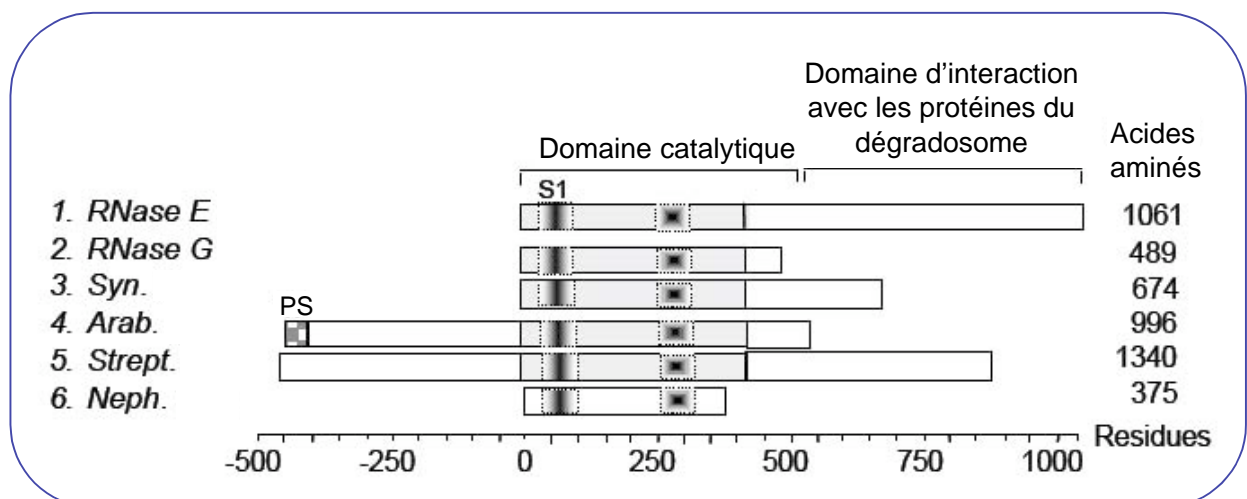


Figure 24. Alignement de plusieurs protéines RNase E-like.

Les protéines sont : 1 RNase E d' *E.coli* ; 2 RNase G d' *E.coli* ; et protéines RNase E/G -like de 3 *Synechosystis* (cyanobactérie) ; 4 *Arabidopsis thaliana* (plante supérieure) ; 5 *Streptomyces coelicolor* (actinobactérie) et 6 chloroplaste de *Nephroselmis olivacea* (chlorophyte). (PS) : peptide d'adressage putatif au chloroplaste. D'après Bollenbach et al. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol. 2004;78:305-37.

I.5.2.4.2.CSP41a

CSP41a est une endoribonucléase de 416 acides aminés codée par le génome nucléaire. Cette enzyme a été purifiée à partir d'extraits protéiques de chloroplastes d'épinard, comme une protéine liant l'ARN spécifiquement dans la partie 3' non-traduite des ARN *petD* (Yang *et al.* 1996). CSP41a clive efficacement les structures en tige-boucle des ARN *petD*, *psbA* et *rbcL* *in vitro*. En utilisant une approche antisens chez le tabac, il a été montré que CSP41a pouvait jouer un rôle dans l'initiation de la dégradation des ARN *in vivo* (Bollenbach *et al.* 2003). Dans cette étude, le taux de dégradation des ARN a été mesuré en lysant des chloroplastes des plantes WT et antisens puis en mesurant la quantité résiduelle des ARNm pleine longueur en fonction du temps (Schuster *et al.* 1999). Dans les lysats chloroplastiques issus des plantes antisens, la dégradation des ARN complets de *petD*, *psbA* et *rbcL* décroît de 7, 2 et 5 fois respectivement par rapport aux plantes WT. L'étape limitante de la dégradation des ARN chloroplastiques étant sans doute un clivage endonucléolytique, il est possible que CSP41a soit responsable de l'initiation et de la régulation de la dégradation de ces transcrits *in vivo*.

I.5.2.5.Enzyme(s) responsable(s) de la polyadénylation dans le chloroplaste

L'enzyme majeure de la polyadénylation chez *E. coli* est la PAP codée par le gène *pcnB* (Mohanty et Kushner 2000). La séquence peptidique de la PAP présente une haute homologie avec la famille des nucléotidyltransférases. Jusqu'à présent il était impossible dans cette famille des nucléotidyltransférases (NTfr) de prédire l'activité catalytique sans vérifications biochimiques, mais une analyse bioinformatique récente à l'aide du programme "Sequence Space" a permis de révéler des motifs de séquences protéiques qui

distinguent les deux familles de protéines : poly(A)polymérasés (PAP) et nucléotidyle-transférases (NTfr) (Martin et Keller 2004) (**figure 25**).

Accession	Espèces	Protéine	Predotar	TargetP	Mitoprot II	iPSORT	Consensus
NP_173680	<i>A. thaliana</i>	CCAttr	_	Chloro	0.9688	Chloro	Chloro
NP_197758	<i>A. thaliana</i>	PAP eub.	Mito	Mito	0.7029	Mito	Mito
NP_174130	<i>A. thaliana</i>	PAP eub.	Chloro	Chloro	0.648	Chloro	Chloro
NP_190452	<i>A. thaliana</i>	PAP eub.	Mito	Pep-Sig	0.7269	Pep-Sig	Pep-Sig

Figure 25. Prédiction de l' adressage des protéines identifiés comme des nucléotidyl transférases (CCAttr) ou des poly(A) polymérasés d'origine eubactérienne (eubPAP) d'organelles codées par le génome nucléaire d'*Arabidopsis thaliana*. Mito : mitochondrial; Chloro : chloroplastique; Pep-sig : peptide signal. D'après Martin G. et Keller W., RNA 2004, 10.

Les efforts initiaux pour purifier un homologue chloroplastique de la PAP bactérienne n'ont pas été couronnés de succès. Or, dans le même temps, on constatait que dans les mutants de délétion du gène *pcnB* d'*E. coli*, les queues poly(A) étaient hétérogènes, très similaires à celles qui sont caractérisées chez le chloroplaste. Cela pouvait conduire à la supposition que la PNPase pouvait aussi être active dans la synthèse de queues poly(A) (Mohanty et Kushner 2000) (**figure 26**). Par ailleurs, la purification de l'activité PAP des chloroplastes d'épinard ne menait qu'à la purification de la seule PNPase. La PNPase est capable de polyadényler des ARN non-structurés *in vitro*, mais est incapable de polyadényler des substrats se terminant par des structures en tige-boucle, mimant ainsi l'activité de polyadénylation caractérisée *in vivo* et dans les extraits de protéines chloroplastiques (Hayes *et al.* 1996; Lisitsky *et al.* 1996; Yehudai-Resheff *et al.* 2001; Yehudai-Resheff *et al.* 2003). Une lignée d'*Arabidopsis thaliana* dans laquelle l'expression de la PNPase chloroplastique était réduite à environ 1% de celle de la plante sauvage par co-suppression a été décrite. Ces plantes ne présentent aucun phénotype particulier, mais sont tout de même affectées dans la maturation en 3' des ARNm *psbA*, *rbcL* et l'ARNr 23S. Toutefois, une augmentation de la quantité des ARN polyadénylés dans les plantes co-supprimées pour la PNPase a aussi été observée. Cette information suggère qu'il existe

peut-être une autre enzyme que la PNPase responsable de la polyadénylation des ARN chloroplastiques dans ces plantes (Walter *et al.* 2002).

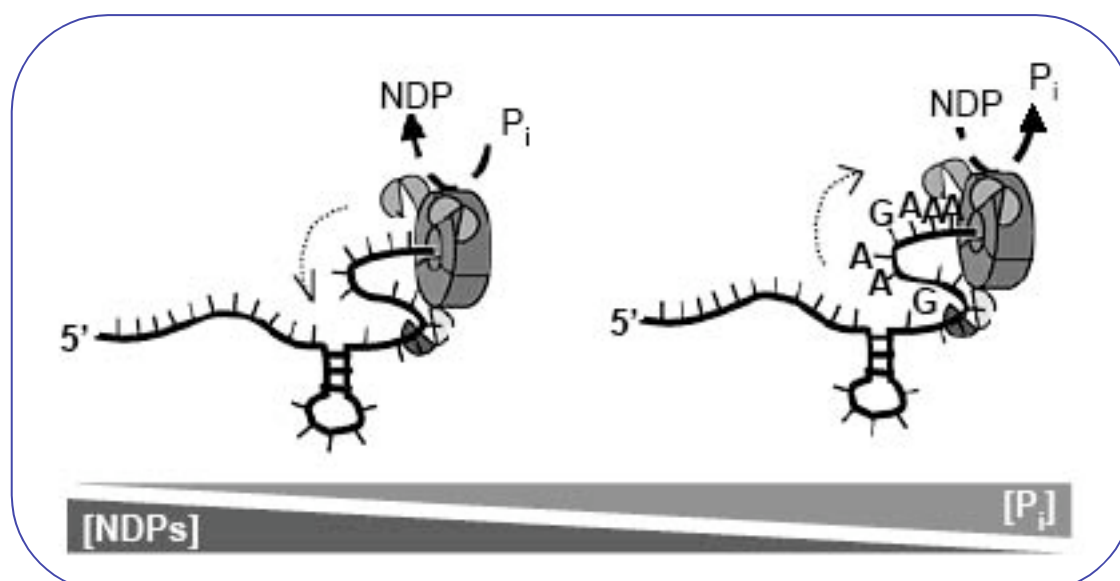
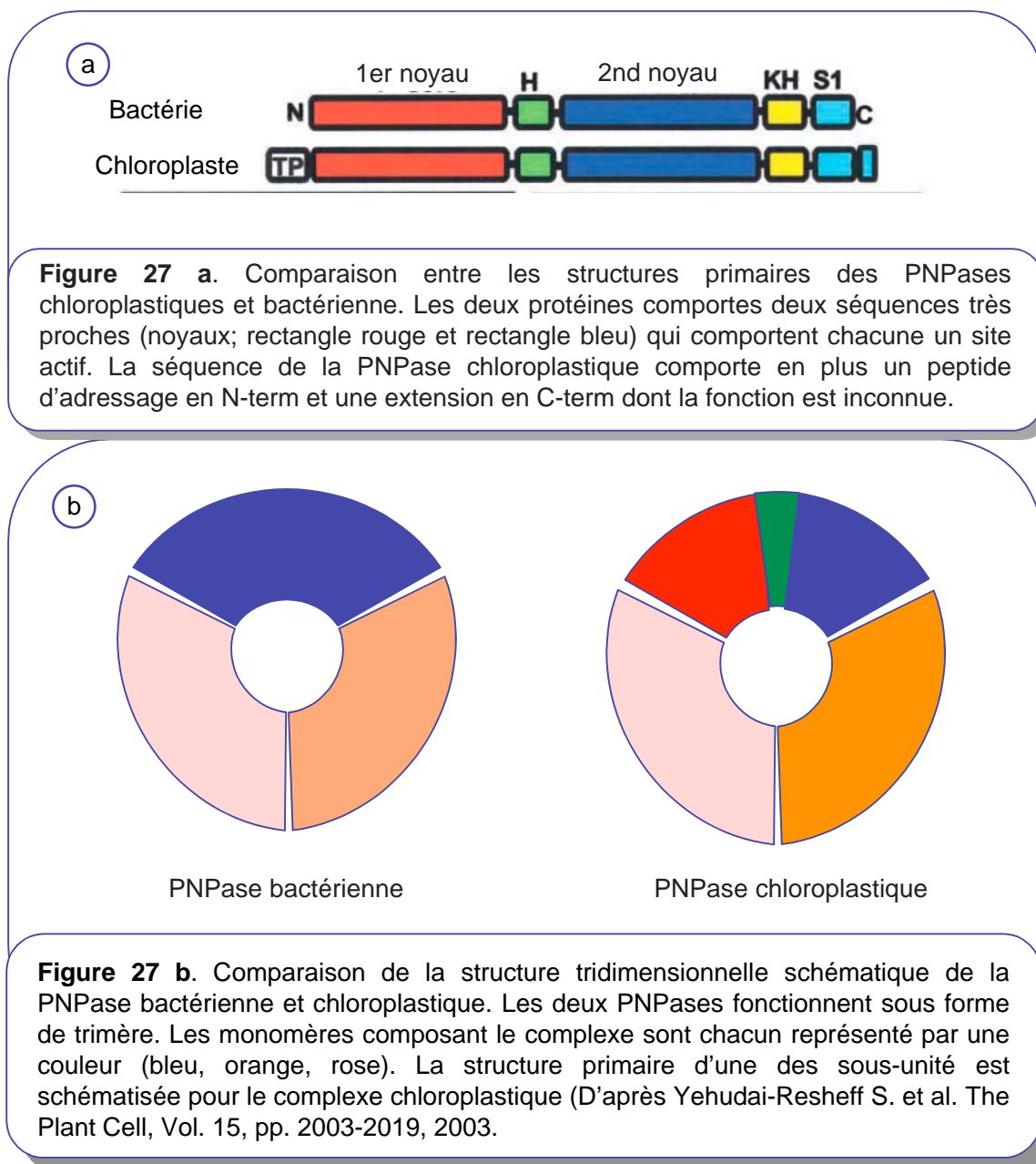


Figure 26. Un modèle possible pour la modulation de l'activité de la PNPase comme exoribonucléase ou polymérase. La PNPase est modélisé par un homotrimer. Lorsque la PNPase dégrade l'ARN, elle consomme du phosphate (Pi) et produit des nucléotides (NDP), et augmente ainsi la concentration locale de nucléotides. Cependant, lorsque la PNPase polymérise de l'ARN, elle consomme des nucléotides et produit du phosphate. Ainsi, il est possible que la concentration locale en nucléotides et en phosphate influence l'inversion d'activité de la PNPase. D'après Bollenbach *et al.* Prog Nucleic Acid Res Mol Biol. 2004;78:305-37.

I.5.2.6. Exonucléases chloroplastiques

I.5.2.6.1. Polynucléotide phosphorylase (PNPase)

La PNPase catalyse la phosphorylation processive 3'-5'. Ce qui au départ fut identifié comme le dégradosome chloroplastique s'est en fait révélé être un homotrimer de PNPases (Hayes *et al.* 1996; Baginsky *et al.* 2001). Et, jusqu'à présent, aucune interaction avec d'autres protéines n'a été confirmée. Les séquences peptidiques des PNPases de bactéries, du génome nucléaire de plante, de levure, des mammifères présentent un haut degré d'homologie et possèdent des caractéristiques structurales comparables, réparties en 5 motifs distincts (Symmons *et al.* 2000; Zuo et Deutscher 2001; Raijmakers *et al.* 2002;



Symmons *et al.* 2002). Ces motifs comprennent deux domaines ayant différents degrés d'homologie avec la phosphorylase RNase PH d'*E. coli*, séparés par un domaine en hélice et deux domaines adjacents de liaisons à l'ARN (KH et S1). Les domaines de la PNPase du chloroplaste d'épinard ont été étudiés en détail. Le premier domaine joue un rôle dans la dégradation des ARN mais pas dans la polymérisation. Le second domaine est impliqué dans la dégradation des ARN polyadénylés exclusivement. Le domaine d'affinité au poly(A) a été localisé dans le domaine S1 (**figure 27**) (Yehudai-Resheff *et al.* 2003).

1.5.2.6.2. La Ribonucléase II/R

Dans le génome d'*A. thaliana*, une protéine appartenant à la superfamille des ribonucléases RNR possède une extension N-terminal. Cette protéine appelée RNR1 (aussi appelée AtmtRNase II) est doublement adressée à la mitochondrie et au chloroplaste. Dans la mitochondrie elle est impliquée dans la maturation des extrémités 3' des ARN messagers d'*atp9* (Perrin *et al* 2004) alors que dans le chloroplaste, elle est impliquée dans la maturation des extrémités 3' des ARN ribosomiques 23S, 16S et 5S (Bollenbach *et al* 2005).

1.5.3. Machinerie de dégradation des ARN dans la mitochondrie de levure

Les enzymes impliquées dans la dégradation des ARN mitochondriaux ont été identifiées en premier lieu dans la levure. Ainsi, le produit du gène nucléaire *SUV3*, Suv3p, une hélicase de 75 kDa (Stepien *et al.* 1992), a été identifié comme étant une sous-unité du complexe protéique mtEXO qui possède une activité exoribonucléolytique NTP-dépendante. Ce complexe associé aux mitoribosomes contient, en plus de Suv3p, une exoribonucléase spécifique du simple brin de 105 kDa : Dss1p. Cette exonucléase présente des similarités avec la RNase II bactérienne. L'analyse de l'activité de complexes mtEXO purifiés, montre que mtEXO est capable de dérouler l'ARN double brin et de dégrader l'ARN dans la direction 3'-5' exonucléolytiquement. Le complexe mtEXO peut être aussi appelé le dégradosome mitochondrial de levure en référence au dégradosome d'*E. coli* décrit antérieurement (Dziembowski *et al.* 2003).

In vitro, les produits de dégradation de mtEXO sont essentiellement des nucléotides monophosphates et des oligoribonucléotides, la digestion n'allant pas exactement jusqu'à l'extrémité 5'. On peut supposer qu'il existe *in vivo*, une nucléase additionnelle non encore identifiée qui complète la dégradation des ARN mitochondriaux. Dans le complexe mtEXO, l'activité ribonucléase de Dss1p est strictement dépendante de l'acti-

tivité de l'hélicase Suv3p. Cette hélicase serait responsable de la reconnaissance du substrat, du déroulement de l'ARN et de l'association des deux protéines du complexe *in vivo*.

Les levures mutantes dont le gène SUV3 est interrompu, sont incapables de respirer et suraccumulent les séquences introniques du groupe I. Sur la base de ces observations, il fut déduit que la fonction de mtEXO était exclusivement la destruction de ces introns. Or, il semble que sa fonction ne se réduise pas à cela puisque l'introduction d'un génome sans introns dans la mitochondrie ne restaure pas la compétence respiratoire (Dmochowska *et al.* 1995). De plus, la perte de fonction de l'une des sous-unités du dégradosome mitochondrial résulte en des phénotypes multiples dont l'abolition de la traduction, l'accumulation d'ARN avec des extrémités 3' et 5' aberrantes, et des variations dans le taux d'accumulation des ARN matures (Dziembowski *et al.* 2003). Ensemble, ces données suggèrent que le mtEXO a un rôle primordial dans la dégradation et la maturation de l'ARN dans la mitochondrie de la levure.

La polyadénylation n'est impliquée ni dans la maturation ni dans la dégradation des ARN de la mitochondrie de la levure. Les ARN matures ne sont pas polyadénylés, mais comportent une séquence dodécamérique 5'-AAUAA(U/C)AUUCUU-3' dans leur région 3' non-traduite. Cette séquence conservée est peut-être la cible d'une activité endonucléasique responsable de la formation de l'extrémité 3' des ARNm mitochondriaux. L'extrémité 3' mature est toujours située deux nucléotides en aval de la séquence dodécamérique. Un motif dodécamérique doit être intact pour assurer la stabilité des ARN messagers et leur traductibilité (Butow *et al.* 1989). Une protéine montrant de l'affinité pour ce motif nucléotidique aurait été isolée, mais sa fonction et sa séquence codante sont encore inconnues (Li et Zassenhaus 1999).

1.5.4. Rôles de la polyadénylation des ARN dans la mitochondrie humaine

Le génome de la mitochondrie humaine est très compact. Les deux brins du duplex d'ADN circulaire constituant ce génome sont presque entièrement transcrits et les unités polycistroniques résultantes sont maturées par des clivages endonucléolytiques. Plusieurs de ces ARNm provenant de ces clivages ne comportent pas de codon stop fonctionnel, mais se terminent par U ou UA. La dernière étape de maturation de ces ARN est une étape de polyadénylation pour produire ce codon stop. Tous les ARN mitochondriaux codés par le brin lourd (H) comportent une queue poly(A) de 50 à 60 résidus dans les lignées de cellules primaires (Hirsch et Penman 1974).

Récemment, la caractérisation d'une poly(A) polymérase codée par le génome nucléaire adressée à la mitochondrie a été décrite (Piwowarski *et al.* 2003). Il résulte de l'inhibition de l'expression de cette enzyme par RNAi un raccourcissement des queues poly(A) des transcrits des gènes *nad3*, *cox3*, *atp6/8*. De plus, les données obtenues montrent que tous les transcrits analysés avec des queues poly(A) courtes ne présentent pas de modification significative de leur durée de vie. Ce qui va à l'encontre d'une implication directe des longues queues poly(A) dans la stabilisation des ARN messagers de la mitochondrie humaine. Cependant, une autre équipe en utilisant les mêmes méthodes montre que l'écourtement des extensions poly(A) a pour conséquence de déstabiliser certains transcrits mitochondriaux (Nagaike *et al.* 2005).

Cependant, en plus de générer des codons stop fonctionnels qui ne sont pas codés par le génome mitochondrial, la polyadénylation pourrait jouer un rôle même indirect dans la stabilité des ARNm de la mitochondrie humaine. En effet, il a été montré qu'à une déadénylation rapide pouvait correspondre la diminution de la stabilité des transcrits d'un gène (Temperley *et al.* 2003) chez un patient dont la maturation du transcrit RNA14 est affectée et entraîne la perte du résidu uridine à l'extrémité 3' à partir de laquelle la polyadénylation génère un codon de terminaison de la traduction UAA. En l'ab-

sence de ce résidu terminal, la maturation et la polyadénylation continuent de se produire, mais même si la traduction n'est pas affectée, le RNA14 résultant est dégradé rapidement en passant par un processus de déadénylation (**figure 28**). Il semble donc que, dans les mitochondries humaines, la polyadénylation des ARNm ait un rôle similaire à l'un des rôles de polyadénylation des ARNm du cytosol eucaryotique, c'est-à-dire celui de favoriser leur stabilité.

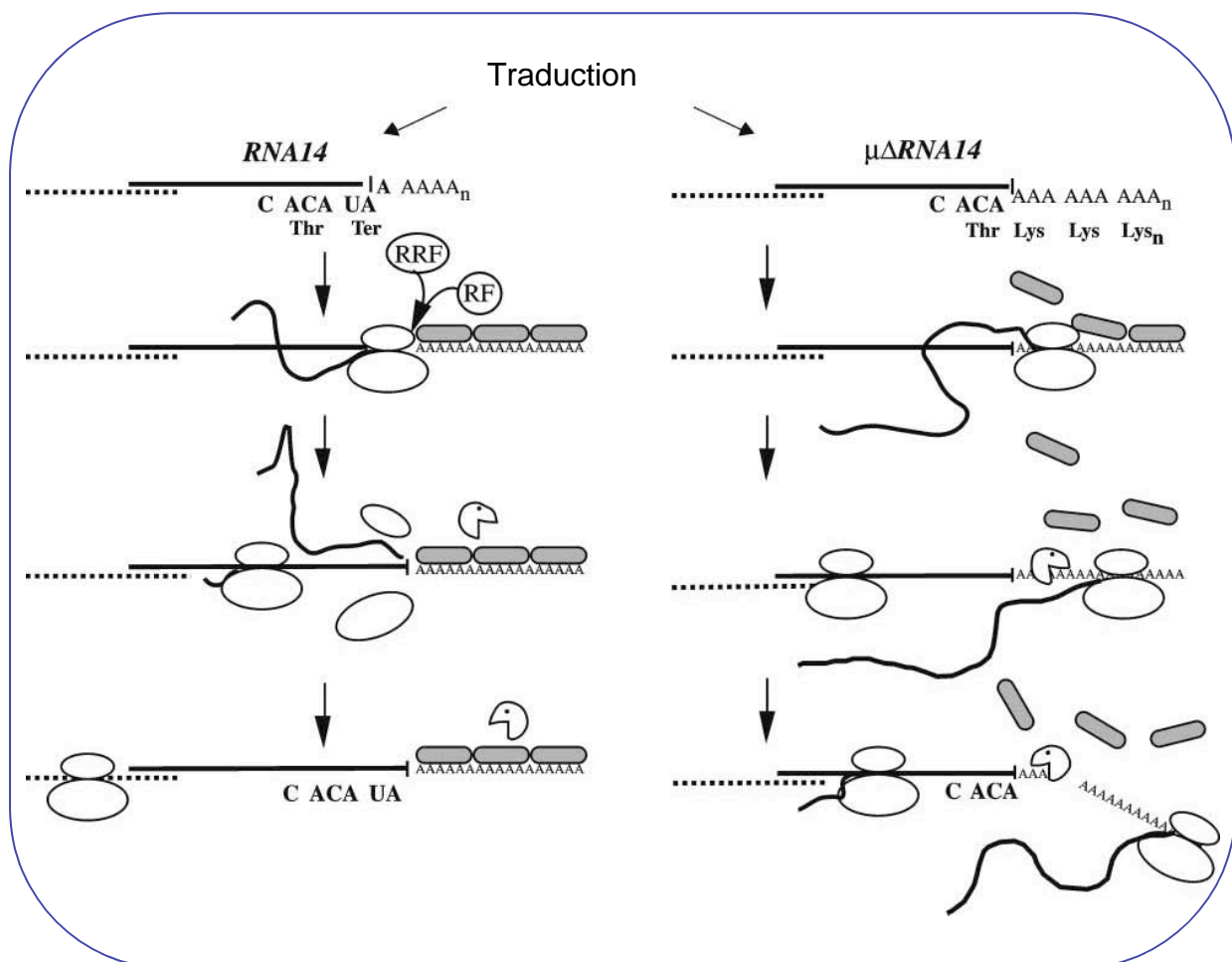


Figure 28. Représentation schématique d'un mécanisme éventuel de la diminution de la stabilité d'un transcrit mitochondrial en conséquence de la perte d'un codon de terminaison fonctionnel. D'après Temperley RJ et al, Human Molecular Genetics, Vol. 12, pp. 2341-2348, 2003.

1.5.5. Rôle de la polyadénylation dans les mitochondries de trypanosomes

Dans la mitochondrie de *T. brucei*, la plupart des types d'ARN comportent deux sortes de populations d'ARN polyadénylés: une population dont les ARN comportent des queues poly(A) courtes (environ 20 nt) et l'autre dont les ARN comportent de longues extensions poly(A) (entre 120 et 200 nt). Par ailleurs, la majorité des ARNm sont modifiés de manière intensive par un processus appelé l'édition des ARN du kinétoplaste qui consiste en l'insertion d'uridine (Simpson *et al.* 2003). Le type de queues poly(A) courtes ou longues attachées à un transcrite peut dépendre de son stade d'édition. Ainsi les ARN RPS12 comportent des queues poly(A) courtes lorsqu'ils ne sont pas édités, alors qu'ils présentent des queues courtes ou longues lorsqu'ils sont partiellement ou totalement édités (Militello et Read 1999). La longueur des queues poly(A) varient aussi en fonction des différentes phases du cycle de vie du parasite. La compréhension du processus complexe de cette régulation de la polyadénylation et de sa signification physiologique est encore assez limitée. Toutefois, il a été mis en évidence *in organello* une voie de dégradation des ARN dépendante de l'UTP qui requiert la présence de queues poly(A) (Militello et Read 2000). De plus, une activité exonucléase 3'-5' hydrolytique associée à la membrane a récemment été isolée. Cette activité est fortement stimulée par l'addition de 20 résidus adénosine en 3' des ARN (Ryan *et al.* 2003). Chez *T. brucei*, si les longues queues poly(A) n'ont pas de rôles caractérisés, il semble que l'addition de queues poly(A) courtes en 3' des ARN mitochondriaux favorise leur dégradation. De plus, une étude récente montre que la stabilité des transcrits mitochondriaux de *T. brucei* est fonction non seulement de son état de polyadénylation, mais aussi de son état d'édition (Kao et Read 2005).

I.6. Travaux de thèse

Si le taux de transcription peut être déterminant pour le contrôle de la quantité d'un transcrit fonctionnel à un instant donné, il semble que ce processus soit peu déterminant dans la mitochondrie de plante. En effet, une étude a montré qu'il existe peu de corrélation entre l'abondance d'un transcrit et l'activité de son promoteur relatif (Giege *et al.* 2000). De fait, il est possible que le contrôle de l'expression du génome mitochondrial de plante ait plutôt lieu durant toutes les étapes de maturation des ARN. Mais aucune donnée évidente concernant des interférences de régulation durant l'épissage, l'édition ou la maturation à l'extrémité 5' n'a été obtenue. Il se pourrait donc que la maturation de l'extrémité 3', où des interactions ont lieu entre l'effet déstabilisateur de la polyadénylation et la stabilisation par des structures secondaires ou des facteurs protéiques, soit une étape majeure dans la régulation post-transcriptionnelle qui détermine le taux de dégradation des ARN dans la mitochondrie de plante.

La dégradation des ARN est un processus à part entière dans la régulation de l'expression d'un génome. Elle est impliquée dans le contrôle de l'abondance d'un transcrit spécifique. La dégradation des ARN est aussi nécessaire à l'élimination des "déchets" issus de la maturation et des transcrits aberrants.

S'il a été montré que dans la mitochondrie végétale il existe une corrélation entre la polyadénylation et l'instabilité du message *in vitro* et *in vivo* (Gagliardi et Leaver 1999), une autre étude effectuée la même année n'est pas aussi convaincante quant à l'existence d'un lien entre la dégradation des ARN mitochondriaux et leur polyadénylation (Lupold *et al.* 1999).

Le rôle de la polyadénylation dans la déstabilisation des ARN d'*E. coli* et du chloroplaste a été très bien défini. Mais, ce même processus post-transcriptionnel, pour autant

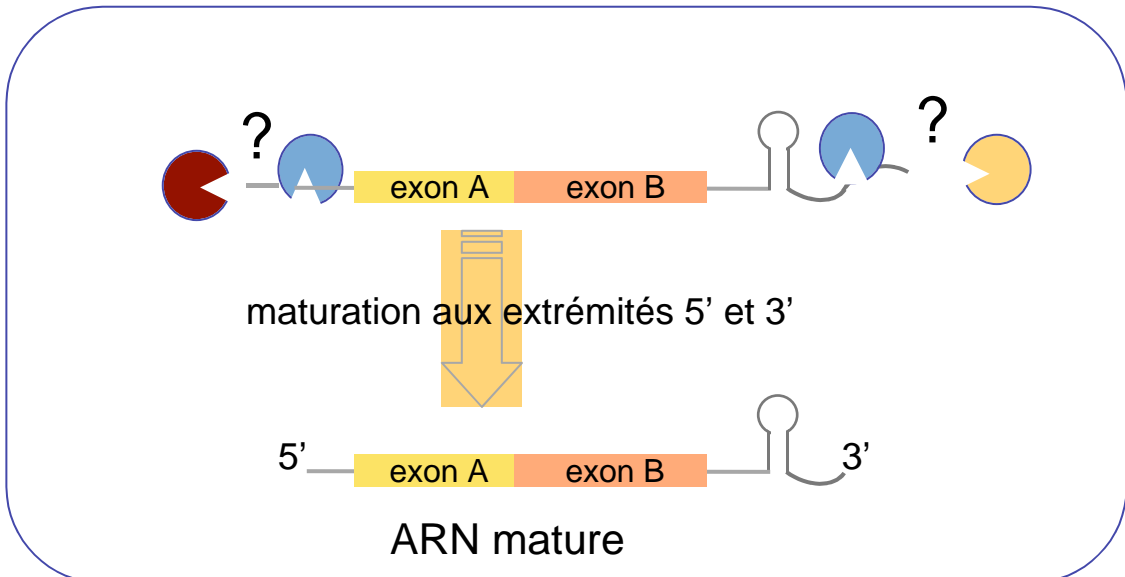


Figure 29. La caractérisation de la maturation des ARNr et ARNm n'est pas effectuée dans les mitochondries de plantes.

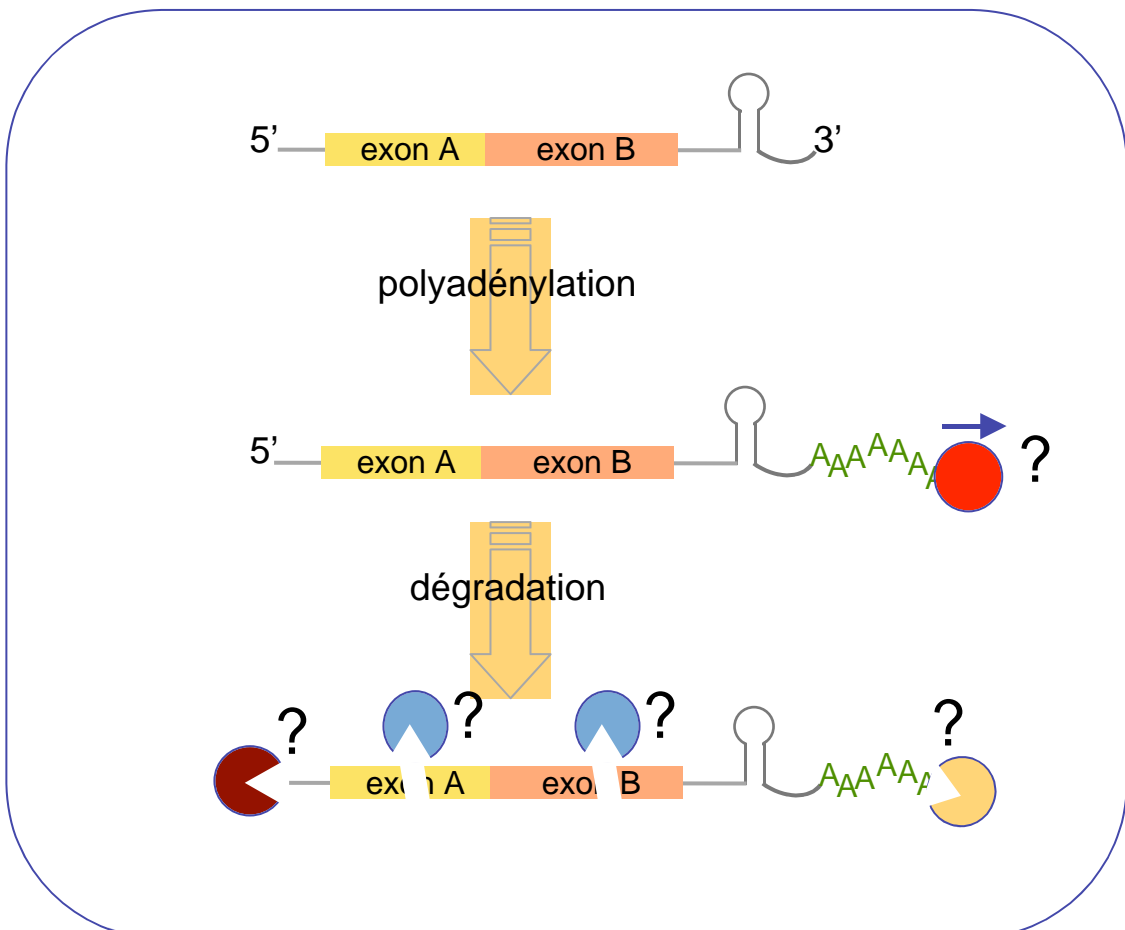


Figure 30. La caractérisation du mécanisme de dégradation des ARN n'est pas effectuée dans les mitochondries de plante.

qu'il existe, n'a pas de fonction conservée entre les mitochondries de divers organismes tels la levure, l'homme, les trypanosomes et les plantes supérieures (Gagliardi *et al.* 2004).

Lors de mon arrivée au laboratoire, la fonction de la polyadénylation dans la mitochondrie des trypanosomes n'avait pas été caractérisée. Aucune étude concernant le processus de dégradation des ARN dans la mitochondrie humaine n'avait été effectuée et aucune étude portant sur les rôles de la PNPase chloroplastique dans le métabolisme des ARN plastidiaux n'avait été réalisée *in vivo*. Aussi, le mode de maturation et de dégradation des ARNr et ARNm de la mitochondrie végétale était inconnu (**figure 29, 30**).

Quelles peuvent être les différences et les ressemblances du mécanisme de dégradation des ARN dans la mitochondrie de plante supérieure avec des systèmes où ce mécanisme est mieux caractérisé comme celui de la bactérie ou celui du chloroplaste ? Si dans ces deux derniers systèmes génétiques, la polyadénylation favorise la dégradation des ARN par des exonucléases 3'-5', est-ce le cas dans la mitochondrie de plante ? Quels sont les acteurs protéiques impliqués dans cette dégradation : endonucléases, exonucléases, hélicases (**Tableau 1**) ? Quel est leur ordre d'action ? La polyadénylation modifie-t-elle exclusivement les ARN messagers ? Affecte-t-elle le métabolisme des ARN dits "structuraux" comme les ARN ribosomiques ?

Pour tenter de répondre à ces questions mon travail de recherche durant ma thèse fut orienté selon trois axes.

Dans un premier temps, une meilleure caractérisation de la polyadénylation dans les mitochondries de plantes était indispensable pour confirmer son rôle dans la déstabilisation des ARN par des études biochimiques. L'accent a été mis plus particulièrement sur l'étude des transcrits du gène *atp9* de la mitochondrie de *Solanum tuberosum*, objets d'étude permettant d'effectuer des tests de dégradation *in vitro* avec un extrait protéique mitochondrial originaire de la même plante.

Dans un second temps, la volonté de caractériser des exonucléases impliquées dans la dégradation et la maturation des ARN mitochondriaux s'est concrétisée par l'étude de gènes candidats codés par le génome nucléaire de la plante modèle *Arabidopsis thaliana*. Ces gènes candidats ont été sélectionnés pour leurs homologies de séquences

avec respectivement la PNPase et la RNase II bactériennes et la présence à leur extrémité N-terminale d'une séquence codant un peptide signal prédit comme adressant les produits de ces gènes aux organelles.

Simultanément, l'étude de la polyadénylation, de la maturation et de la dégradation des ARN ribosomiques 18S et 5S a été réalisée, en partie chez *Solanum tuberosum*, et de façon plus poussée chez *Arabidopsis thaliana* grâce à des plantes transgéniques modifiées dans l'expression des exonucléases en cours de caractérisation.

Les principaux résultats obtenus concernant chacun de ces axes sont présentés dans les trois chapitres suivants.

	Dégradosome d' <i>E.coli</i>		Dégradosome mitochondriale de <i>S. cerevisiae</i>	
	Protéine	Fonction	Protéine	Fonction
Composants du cœur du complexe	Rnase E	Endoribonucléase; squelette du complexe	Dss1p	Exoribonucléase 3'→5' (famille de RNase II)
	RhlB	Hélicase à boîte DEAD; déroule les structures secondaires des ARN	Suv3p	Hélicase de la famille des hélicases à boîte DExH; déroule les structures secondaires des ARN
	PNPase	phosphorylase 3'→5'		
	Enolase	Enzyme glycolytique		
Composants associés au complexe	Dna K, GroEL	Chaperonnes; fonctions inconnues dans le dégradosome	Mrp135p, Mrp13p, Mrp1p, Mrp140p	Protéines ribosomiques mitochondriales; pas de fonctions connues dans le dégradosome
	Polyphosphate kinase, poly(A)polymérase, protéine ribosomal S1	Rôles enzymatiques variés; pas de fonctions connues dans le dégradosome		

Tableau 1. Comparaison des dégradosomes d' *E. coli* et de la mitochondrie de *S. cerevisiae*. Les deux principaux composants du dégradosome de la mitochondrie de levure n'ont aucune relation avec les composants principaux du complexe d'*E. coli*, bien que RhlB et Suv3p soient toutes deux des hélicases. Des protéines associées ont été décrites pour les deux complexes. Abbréviations : Mrp, « Mitochondrial ribosomal protein; PNPase, polynucléotide phosphorylase. D'après Gagliardi, D. et al, Trends in Genetics, Vol. 20, pp. 260-267, 2004. Dziembowski, A. et al, J Biol Chem, Vol. 278, pp. 1603-1611, 2003. Carpousis, A.J., Biochem Soc Trans, Vol. 30, pp. 150-155, 2002.

II / MATERIEL ET METHODES

II.1.MATERIEL

II.1.1.Matériel végétal

Dans la première partie du travail de thèse ce sont des tubercules de pommes de terre (*Solanum tuberosum*), variété Bintje, conservés à l'obscurité qui ont été utilisés comme matériel végétal de départ pour la purification de mitochondries.

Dans les deuxième et troisième parties du travail de thèse ce sont essentiellement des plantes d'*Arabidopsis thaliana* de l'écotype Columbia (Col) qui ont été utilisées.

Les mutants d'insertion étudiés dans ce travail de thèse proviennent de la collection de mutants d'insertion SIGnal. Les lignées SALK_051838 et SALK_044726 ont été commandées sur le site <http://signal.salk.edu/>. Les informations concernant ces insertions peuvent être obtenues à l'adresse suivante:

<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>. Le site TAIR (The Arabidopsis Information Resource) permet d'avoir accès aussi à un ensemble important d'annotations à l'adresse <http://arabidopsis.org/>.

D'autre part, pour la localisation sub-cellulaire, des protéines des feuilles de tabac ont été utilisées.

II.1.2.Oligonucléotides

Des oligonucléotides de taille variant entre 20 à 25 nucléotides (plus éventuellement un site de restriction ou une séquence promotrice permettant la transcription *in vitro*) ont été synthétisés par Gibco BRL ou Eurogentec. Leur température de fusion est estimée d'après la formule suivante (Wallace *et al.* 1979) : $T_m (^{\circ}C) = 2 \times (A+T) + 4 \times (G+C)$.

II.1.3.Plasmide

pCR[®] 2.1-TOPO[®]

Le vecteur *pCR*[®] 2.1-TOPO[®] (Invitrogen) de 3,9 kb possède des extrémités 3' dT sortantes ainsi que deux sites de restriction *EcoRI* flanquant le site d'insertion, ceci afin d'exciser facilement l'insert pour en vérifier la taille. La cassette de clonage est entourée des promoteurs reconnus par les ARN polymérases des phages Sp6 et T7, ce qui permet la transcription spécifique d'un brin de l'ADN inséré dans la cassette. Ce vecteur contient aussi un gène qui confère la résistance à l'ampicilline ainsi qu'un gène de β -galactosidase permettant de sélectionner les colonies bactériennes ayant un insert par la méthode de l' α -complémentation.

II.1.4. Outils informatiques

Les comparaisons de séquences et la recherche de sites de restriction ont été effectuées à l'aide du logiciel MacVector 7.0 (Oxford Molecular).

L'accès aux bases de données nucléotidiques et la recherche de séquences homologues ont été faits par l'intermédiaire du logiciel BLAST, accessible à partir du site du NCBI : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

La quantification de la radioactivité a été réalisée avec un Phosphorimager BAS 1000 (Fuji). Les résultats ont ensuite été analysés en utilisant le logiciel MacBas v2.2 (Fuji Photo Film).

La plupart des informations à propos des gènes candidats a été rassemblé à partir du site TAIR (The Arabidopsis Information Resource) dont voici l'adresse : <http://arabidopsis.org/>

II.2. METHODES

Pour certains protocoles de base de Biologie Moléculaire (extraction phénolique et précipitation éthanolique d'acides nucléiques, digestion par des enzymes de restriction) nous avons utilisé les protocoles décrits dans (Sambrook, J & Russel, D.W., 2001) ou les protocoles et les indications des fournisseurs.

II.2.1. Techniques relatives à l'ADN

II.2.1.1. Electrophorèse non-dénaturante

Les molécules d'ADN (plasmides, ADN total digéré, produit de PCR...) peuvent être séparées en fonction de leur taille par migration électrophorétique. L'ADN est chargé (1/6 du volume de **tampon de charge**) sur un gel d'agarose (entre 0,8 et 2,5% (p/v)) dans du tampon **TAE 0,5X**. La migration de l'ADN s'effectue sous une tension de 100V. Les fragments d'ADN sont ensuite visualisés sous UV grâce au bromure d'éthidium dissous dans le gel (50 µg/ 100 ml).

TAE 0,5X : Tris-acétate pH 8,0 20 mM, EDTA 0,5 mM

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

II.2.1.2. Amplification d'ADN par PCR (« Polymerase Chain Reaction »)

Il s'agit d'une amplification exponentielle de l'ADN réalisée par une série de cycles de type dénaturation-hybridation-élongation avec deux amorces oligonucléotidiques spécifiques des extrémités du fragment à amplifier.

Le milieu réactionnel de 25 μ l final contient :

- ADN matrice (100 pg d'ADN plasmidique ou 100 ng d'ADN mitochondrial ou cDNA)
- 0,4 μ M de chaque oligonucléotide amorce
- 200 μ M de chaque dNTP
- 1,5 à 2,5 mM de MgCl₂
- 2,5 μ l de **tampon Taq PCR 10X** (Invitrogen)
- 1,25 U de **Taq** ADN polymérase (Invitrogen)

La réaction est menée dans un appareil Robocycler Gradient 96 (Stratagène) selon le programme suivant :

-Une étape de dénaturation de l'ADN de 3 min à 94°C

-30 cycles comportant successivement :

-Une étape de dénaturation de 1 min à 94°C

-Une étape d'hybridation des amorces de 30 s à une température de T_m – 10°C à T_m + 5°C (T_m : température de fusion de l'amorce par rapport à la séquence de la matrice) généralement 50°C

-Une étape de synthèse de l'ADN de 30 s à 2 min (selon la taille du fragment à amplifier) à 72°C.

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

II.2.1.3. Criblage de colonies par PCR

Cela consiste à vérifier la présence du fragment d'ADN d'intérêt par réaction de PCR directement à partir de colonies bactériennes, soit pour effectuer une minipréparation d'ADN plasmidique, soit pour l'envoi direct en séquençage du fragment cloné. Dans le premier cas, cela permet d'économiser les kits de minipréparations; dans l'autre cas cela permet d'accéder à la séquence sans préparer de plasmides. Pour cela un milieu réactionnel de base de 25 μ l est préparé avec les amorces permettant d'amplifier l'éventuel insert, puis les bactéries d'une colonie blanche sont transférées dans ce milieu à l'aide d'un cure-dent. Les étapes et nombres de cycles sont les mêmes que pour la PCR décrite au paragraphe précédent. La première étape de dénaturation de 3 min à 94°C suffit à rompre les bactéries et à libérer l'ADN.

II.2.1.4. Purification de produits de PCR

Trois méthodes de purification de fragments de PCR ont été utilisées : la première après électrophorèse en gel d'agarose, la seconde directement après la réaction de PCR et la troisième pour séquençage direct du produit de PCR après une réaction de PCR sur colonies.

Les trois méthodes ont pour but d'éliminer les amorces, mais dans la première, il s'agit de purifier un fragment de taille précise, alors que dans les deux autres, la totalité des produits d'une réaction de PCR est purifiée.

Après électrophorèse en gel d'agarose

Après fractionnement des produits d'une réaction de PCR sous 100 V en gel d'agarose 0,8 à 2 % (p/v) dans du tampon TAE 0,5X et du bromure d'éthidium (10 mg/L), l'ADN est visualisé sous UV. Le morceau d'agarose contenant le fragment d'intérêt est excisé du gel, déposé sur une colonne du kit Ultrafree-DA (Millipore) puis centrifugé 10 min à 5000 g. L'éluat est directement utilisable pour un clonage.

TAE 0,5X : Tris-acétate pH 8,0 20 mM, EDTA 0,5 mM.

Après réaction de PCR

La purification de produits directement issus d'une réaction de PCR est effectuée à l'aide du kit « Qiaquick PCR Purification » en suivant le protocole préconisé par le fournisseur (Qiagen).

Produit PCR à destination du séquençage

Les produits PCR sont précipités à l'acétate d'ammonium 4,5 M, lavés à l'éthanol 70% puis repris dans 10µL H₂O. Un µl de la solution est déposé sur un gel d'agarose de concentration appropriée pour quantification avant séquençage.

II.2.1.5. Clonage direct d'un produit PCR

Le kit TOPO TA Cloning® (Invitrogen) assure le clonage efficace et rapide d'un produit obtenu par PCR dans un vecteur plasmidique. Ce système ne nécessite aucune ligase, aucune amorce possédant des sites de restriction et aucune étape supplémentaire après l'étape de PCR.

Principe :

La *Taq* polymérase possède une activité terminal transférase qui ajoute à l'extrémité 3' des produits de PCR un résidu désoxyadénosine (dA). Le vecteur (appelé vecteur T) linéarisé fourni avec le kit possède un résidu désoxythymidine (dT) 3' sortant. De plus, ce kit exploite l'activité ligase de la topoisomérase I. La ligation du vecteur avec le produit de PCR en présence de la topoisomérase I est très efficace et se passe en moins de 5 min à température ambiante. Le vecteur pCR® 2.1-TOPO® est fourni ouvert et ses extrémités libres sont activées avec la topoisomérase I. Ainsi la réaction de ligation est bimoléculaire au lieu d'être trimoléculaire dans le cas d'un clonage classique. Le produit de la ligation est alors utilisé pour transformer des bactéries compétentes fournies avec le kit.

Méthode :

Le produit de la réaction de PCR (2 µl) est incubé 5 min à température ambiante dans 2 µl d'eau et 1 µl de vecteur pCR® 2.1-TOPO®. Un µl de solution saline (1,2 M NaCl, 60 mM MgCl₂) est ajouté et l'incubation est prolongée de 5 min à température ambiante. La totalité du milieu réactionnel est ajoutée à un tube de bactéries compétentes One Shot® TOP 10 *E. coli* et laissé 30 min sur la glace. Un choc thermique est effectué en plaçant successivement le tube 30 s à 42°C puis 2 min sur la glace. Du **milieu SOC** (250 µl) est ajouté et le tube est incubé 45 min à 37°C. La suspension bactérienne (50 et 100 µl) est étalée sur des boîtes de Pétri contenant du **milieu LB 1,5% agar** et 100 µg/ml d'ampiciline. De l'IPTG (100 µl à 10 mg/ml) et du X-Gal (100 µl à 10 mg/ml) sont également étalés sur ce milieu. Après une nuit d'incubation à 37°C, seules les bactéries ayant incorporé le vecteur sont résistantes à l'ampiciline. Parmi celles-ci, se distinguent les colonies blanches transformées avec un vecteur contenant un fragment d'ADN inséré.

Remarque:

Les volumes de réaction peuvent être divisé par deux pour effectuer plus de clonage sans en affecter l'efficacité.

Milieu SOC : tryptone 20 g/L ; extrait de levure 5 g/L ; NaCl 0,5g/L ; glucose 3,6 g/L

Milieu LB 1,5% agar : extrait de levure 5 g/L ; bacto tryptome 10 g/L ; NaCl 10 g/L ; agar 1,5% (p/

II.2.1.6.Préparation d'ADN plasmidique

Les kits GenElute™ Plasmid Mini-Prep Kit (Sigma) et NucleoSpin® Plasmid Quick Pure (Macherey-Nagel) ont été utilisés pour effectuer les minipréparations d'ADN plasmidique à partir de 3 ml de culture bactérienne. Ces kits sont basés sur l'optimisation de la méthode de purification par lyse alcaline (Birnboim et Doly 1979), avec, en plus, une étape de purification sur colonne de silice. Nous avons suivi le protocole expérimental fourni avec les kits.

II.2.1.7.Séquençage d'ADN

Les séquences d'ADN sont réalisées par le service de séquençage de l'Institut (responsables: P. Hamann et M. Alioua) qui a utilisé l'appareil « Applied Biosystems 373 DNA sequencer » (Perkin Elmer), jusqu'à l'acquisition de l'appareil « Applied Biosystems 3100 Genetic Analyzer » (Hitachi). Le principe de séquençage est une PCR asymétrique dont l'élongation est stoppée par la présence de ddNTPs dans la solution. Chacun de ces ddNTPs est couplé à un fluorophore qui possède une longueur d'onde d'émission qui lui est spécifique.

Ainsi, lors de la migration sur gel (une piste par réaction de séquence) ou de l'électrophorèse en capillaire (selon l'appareil), les fluorophores sont excités par un laser à argon (longueurs d'onde 492 et 514 nm, puissance 40 mW). Les signaux réémis par les fluorophores sont analysés et l'information est transmise au système informatique couplé qui enregistre les données. Dans la pratique, la matrice ADN à séquençer (environ 500 ng) ainsi que 5 pmol d'oligonucléotide amorce sont donnés au service de séquençage dans 10 μ l d'eau.

II.2.1.8.Marquage radioactif d'oligonucléotides

Les oligonucléotides synthétisés chimiquement sont livrés déphosphorylés à leur extrémité 5' et peuvent être marqués en présence de γ -³²P ATP. L'oligonucléotide (5 pmol) est incubé 30 min à 37°C dans un milieu réactionnel de 10 μ l contenant 20 μ Ci de γ -³²P ATP (3000 Ci/mmol, NEN Life Science), 1 μ l de **tampon PNK 10X** (Fermentas) et 5U de T4 polynucléotides kinase. Après incubation, le volume est ajusté à 50 μ l avec de l'eau et les nucléotides non-incorporés sont éliminés par gel filtration. Pour ce faire, le milieu réactionnel est déposé sur une colonne de Sephadex G50 coulée dans une seringue de 1 ml et préalablement séchée par centrifugation 1 min à 200 g. L'élution se fait par une nouvelle centrifugation de la colonne dans les mêmes conditions.

Tampon PNK 10X : Tris-HCl 500 mM , MgCl₂ 100 mM, DTT 50 mM, spermidine 1 mM et EDTA 1 mM.

II.2.1.9.Southern Blot

Le Transfert d'ADN sur membrane se fait selon (Southern 1975). Les fragments d'ADN séparés par électrophorèse en gel d'agarose sont transférés sur une membrane de nylon Hybond N+ (Amersham) chargée positivement. Le transfert en milieu alcalin (NaOH 0,4 M) pendant une nuit permet de fixer les acides nucléiques sur la membrane. Ce transfert est réalisé selon les recommandations du fournisseur

II.2.1.10.Hybridation

L'hybridation est réalisée pendant une nuit dans un four à hybridation dans du **SSC 6X** ; SDS 0,1% (p/v) à une température inférieure de 5 à 10°C à la température de fusion théorique de la sonde. La membrane est ensuite lavée à la température d'hybridation 2 fois 15 min dans du SSC 2X puis 15 min dans du SSC 2X ; SDS 0,1% (p/v).

SSC 6X : Citrate tri sodique pH 7,0 150 mM ; NaCl 1,5 M

II.2.1.11.Méthode de quantification des acides nucléiques

Les acides nucléiques sont quantifiés en effectuant un spectre. On mesure l'absorbance entre 220 et 300 nm pour un trajet optique de 1 cm. La pureté de la solution est déduite de la courbe visualisée. La valeur à 260 nm est prise en compte pour le dosage selon les correspondances suivantes :

1 A_{260} équivaut à 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ d'ADN double brin

1 A_{260} équivaut à 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ d'ARN ou d'ADN simple brin

II.2.2.Techniques relatives à l'ARN

II.2.2.1.Extraction d'ARN mitochondriaux

Les mitochondries purifiées (10 mg en équivalent de protéines) sont lysées dans un volume de 500 μl de **tampon d'extraction d'ARN**. Après deux extractions au phénol saturé en tampon 10 mM MOPS pH 7,5 sous agitation pendant 10 min, les acides nucléiques sont précipités à l'éthanol (1/10^e du volume d'acétate de sodium 3 M pH 4,5 ; 2,5 volumes d'éthanol absolu, vortexés et laissés reposer une heure à -20°C).

Tampon d'extraction d'ARN : Tris-HCl pH 7,5 10 mM ; MgCl₂ 10 mM ; SDS 1% (p/v)

II.2.2.2.Extraction d'ARN totaux

Les extractions d'ARN totaux de plantes ont été effectuées avec le **TRI REAGENT®** (Molecular Research Center). Ce réactif permet la purification d'ARN totaux ou la purification simultanée d'ARN, d'ADN et de protéines d'un même échantillon. L'équivalent d'une feuille de plantule d'*Arabidopsis thaliana* est broyé dans un micro tube au contact d'azote liquide à l'aide d'un piston. 250 µl de **TRI REAGENT®** sont ajoutés au broyat puis homogénéisés par vortex. L'échantillon est laissé à température ambiante 5 min, puis 50 µl de chloroforme sont additionnés, après homogénéisation durant 15 s par vortex. L'échantillon est à nouveau laissé à température ambiante 10 min. L'échantillon est ensuite centrifugé à 12000 g 15 min à 4°C. La phase aqueuse contenant l'ARN est prélevée avec soin, la phase organique contenant l'ADN et les protéines peut être congelée pour leur purification future. A la phase aqueuse, 130 µl d'isopropanol sont ajoutés, puis l'échantillon est laissé 5 min à température ambiante et ensuite centrifugé à 12000g, 8 min à 4°C. Le surnageant est jeté, puis le culot d'ARN est lavé avec 500 µl d'éthanol 70%, le lavage est suivi par une centrifugation à 12000 g, 5 min à 4°C. L'éthanol de lavage est retiré et le culot d'ARN est séché maximum 5 min, puis resuspendu dans 25 µl d'eau DEPC (diéthylpyrocarbonate). La concentration d'ARN est ensuite déterminée par l'absorbance à 260 nm.

II.2.2.3.Traitement à la RNase H

Trois microgrammes d'ARN totaux sont incubés avec 100 pmol d'un oligonucléotide complémentaire à la séquence cible en présence de 2,5 U de RNase H (USB) selon la recommandation du fournisseur. Les ARN, après avoir été extraits au phénol, sont préparés pour effectuer des analyses par Northern Blot.

II.2.2.4.Traitement à la DNase

Les acides nucléiques totaux ou extraits de mitochondries sont traités à la DNase RQ1. Le milieu réactionnel de 50 µl contenant les ARN, 5 µl de **tampon DNase 10X** et 2 unités de DNase RQ1 « RNase-free » (Promega) est incubé 45 min à 37°C. Après une extraction phénolique, les ARN contenus dans la phase aqueuse sont précipités à l'éthanol.

Tampon DNase 10X : Tris-HCl pH 8.0 400 mM ; MgSO₄ 100 mM ; CaCl₂ 10 mM

II.2.2.5.Synthèse d'ADNc

La synthèse d'un ADN complémentaire (ADNc) par extension d'une amorce constitue la première étape d'une RT-PCR. Les ARN (2 ou 3 μg) sont dénaturés dans de l'eau pendant 5 min à 65°C, puis ajoutés au milieu réactionnel (20 μl final) suivant :

- 1 μM d'oligo-dT
- 0,5 mM de chaque dNTP
- 40 U de RNASE OUTTMRibonuclease Inhibitor (Invitrogen)
- 1 μl de DTT 100 mM
- 4 μl de **tampon RT 5X** (Invitrogen)
- 50 U de transcriptase inverse SuperscriptTMII (Invitrogen)

L'élongation est réalisée pendant 1 h à 37°C. Un μl d'une dilution au cinquième du produit de réaction peut ensuite être directement utilisé comme matrice pour une PCR d'un volume réactionnel de 25 μl (voir paragraphe 5.2.1.2)

Tampon RT 5X : Tris-HCl pH 8,3 250 mM ; KCl 375 mM ; MgCl₂ 15 mM

II.2.2.6.cRT-PCR

Comme les ARNt qui peuvent servir de substrat lors d'une réaction de ligation entre leurs deux extrémités 5' et 3' afin de générer des molécules circulaires (Yokobori et Paabo 1995), d'autres types d'ARN (ARNm, ARNr) peuvent être circularisés ou du moins concatémérés par la T4 ARN ligase. Ces ARN une fois circularisés peuvent être l'objet d'une synthèse d'ADNc (voir paragraphe précédent), puis 1/10^e du produit de cette réaction peut ensuite être directement utilisé comme matrice pour une réaction de PCR. La cRT-PCR est donc une RT-PCR précédée par une circularisation des ARN (**figure 31**). Cela permet entre autres de déterminer les extrémités 3' et 5' matures des transcrits mitochondriaux (Kuhn et Binder 2002). La ligation des ARN s'effectue durant 1 h 30 à 37°C dans 12 μl du milieu réactionnel suivant :

- 2-3 μg d'ARN totaux
- 1.25 μl de **tampon T4 RNA ligase 10X**
- 1 U de DNase RQ1 (Promega)
- 20 U de RNASE OUTTMRibonuclease Inhibitor (Invitrogen)
- 25 U de T4 RNA ligase (New England Biolabs)

Tampon T4 RNA ligase 10X : Tris-HCl pH 7.8 500 mM ; MgCl₂ 100 mM ; ATP 10 mM ; DTT 100 mM

Le volume de la réaction est porté à 50 μl avec de l'eau traitée au DEPC, puis une extraction au phéno ℓ /chloroforme et une précipitation à l'éthanol sont effectuées.

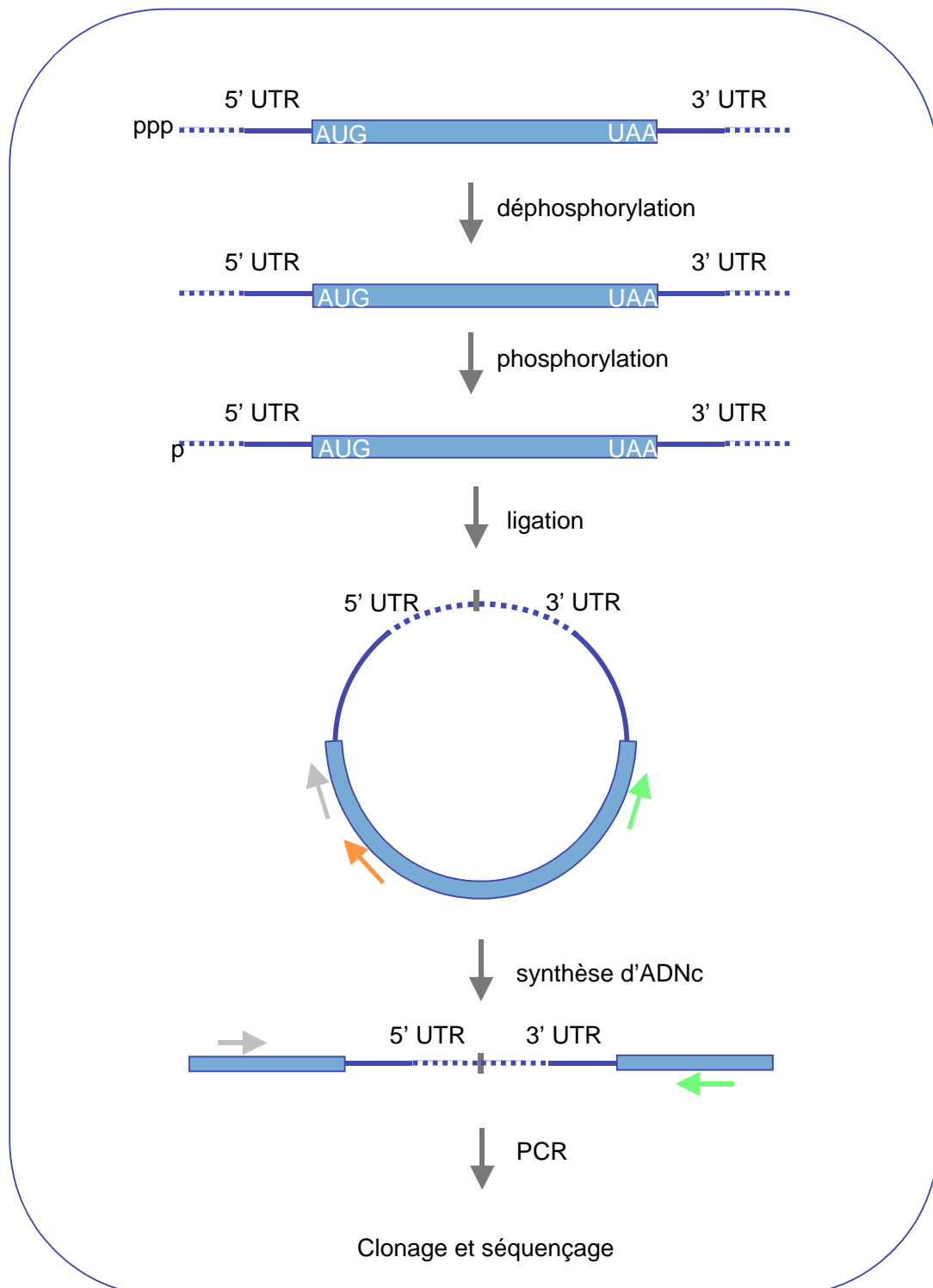


Figure 31. Schéma de la méthode de cRT-PCR. Cette méthode qui comporte une étape de ligation, permet en effectuant une amplification par PCR de déterminer précisément les extrémités 5' et 3' d'un transcrit. Les deux premières étapes ne sont nécessaire que dans le cas où les ARN d'intérêts sont des transcrits primaires. La synthèse d'ADNc est effectuée avec une amorce reverse (flèche orange) spécifique du gène d'intérêt. L'amplification s'effectue avec les amorces forward (flèche verte) placée à la fin de l'ORF du gène d'intérêt ou bien en 3' UTR, et reverse (flèche grise) placée en amont de l'amorce qui sert à la synthèse d'ADNc.

Les ARN repris dans un volume de 14,5 μ l d'eau DEPC sont dénaturés à 70°C pendant 5 min avec l'amorce ou les amorces spécifiques pour la synthèse d'ADNc ajoutées à une concentration de 1 μ M. Les microtubes sont immédiatement plongés dans la glace.

Pour l'étape de transcription réverse le milieu réactionnel est complété avec :

- 6 μ l de **tampon RT 5X** (Invitrogen)
- 1,5 μ l de DTT 100mM
- 0,5 mM de chaque dNTP
- 40 U de RNASE OUT™ Ribonuclease Inhibitor (Invitrogen)
- H₂O qsp 29 μ l

Dix μ l du milieu réactionnel sont réservés pour le contrôle –RT. Aux 19 μ l restants, sont ajoutés 50 U de transcriptase inverse Superscript™II (Invitrogen). L'élongation est réalisée pendant 1 h à 37°C. Un μ l du produit de réaction peut ensuite être directement utilisé comme matrice pour une PCR d'un volume réactionnel de 25 μ l ([voir paragraphe 5.2.1.2](#))

Tampon RT 5X : Tris-HCl pH 8,3 250 mM ; KCl 375 mM ; MgCl₂ 15 mM

II.2.2.7.cRT-PCR sur transcrits primaires

La cRT-PCR ne fonctionne bien que sur des transcrits ayant une extrémité 3'OH et une extrémité 5'monophosphate, ce qui n'est pas le cas des transcrits primaires qui possèdent une extrémité 5'triphosphate. Pour réussir à analyser des transcrits primaires par cRT-PCR il est donc nécessaire de rajouter deux étapes : une étape de déphosphorylation pour retirer les trois phosphates en 5' et une étape de phosphorylation pour parvenir à un transcrit possédant une extrémité 5'monophosphate (**figure 31**). La méthode utilisée est directement inspirée du protocole exposé par (Beaudry et Perreault 1995) et du protocole pour le marquage des ARN en 5' d'Ambion®

(http://www.ambion.com/techlib/misc/RNA5_labeling.html).

Déphosphorylation :

3 μ g d'ARN sont incubés 1 h à 37°C dans 20 μ l final du milieu réactionnel suivant :

- 30 U de CIP (Calf Intestinal Phosphatase)
- 40 U de RNASE OUT™ Ribonuclease Inhibitor (Invitrogen)
- 5 μ l de Tris-HCl pH 8.3 1M

Une extraction au phéno/ chloroforme suivie d'une précipitation à l'éthanol sont ensuite effectuées.

Phosphorylation :

Le culot d'ARN est repris dans 10 μ l et complété par le milieu réactionnel suivant :

- 40 U de RNASE OUT™ Ribonuclease Inhibitor (Invitrogen)
- 1 μ l d'ATP 100 mM
- 2 μ l de **tampon PNK 10X** (Fermentas)
- 20 U de T4 Polynucléotide kinase (Fermentas)
- H₂O qsp 20 μ l

Tampon PNK 10X : Tris-HCl pH 7.6 500 mM, MgCl₂ 100 mM, DTT 50 mM, spermidine 1 mM et EDTA 1mM.

La réaction s'effectue à 37°C durant 1 h, suivie par une précipitation à l'éthanol. Les transcrits primaires ainsi préparés sont prêts pour une cRT-PCR (voir paragraphe précédent).

II.2.2.8.Synthèse d'ARN par transcription *in vitro*

Synthèse d'ARN non-radioactifs

La synthèse d'ARN est réalisée pendant 1 h à 37°C dans 20 μ l du milieu réactionnel suivant :

- 1 μ g d'ADN vecteur ou 0,3 μ g de produit amplifié par PCR
- 7,5 mM des quatre NTP
- 4 μ l de **tampon de transcription 5X** (Promega)
- 1 μ l d'un mélange contenant la T3 ou T7 ARN polymérase, un inhibiteur de RNase et une pyrophosphatase (unités non précisées par le fournisseur ; Promega).

Tampon de transcription 5X : HEPES-KOH pH 7,5 400 mM ; MgCl₂ 120 mM ; spermidine 10 mM ; DTT 200mM

Synthèse d'ARN radioactifs

Le marquage uniforme d'un transcrit généré *in vitro* est réalisé comme précédemment, excepté l'addition de 40 μ Ci d' α -³²P UTP (800 Ci/mmol, NEN Life Science) et une concentration finale d'UTP non marqué plus faible (0,0125 mM), ainsi que des trois autres nucléotides non-marqués (1 mM).

La transcription est suivie d'un traitement à la DNase 25 min à 37°C en ajoutant 1U de DNase RQ1 pour éliminer la matrice ADN. Le volume réactionnel est ensuite complété à 50 μ l, et suivi d'une extraction phénolique. Enfin, les nucléotides non incorporés peuvent être éliminés par gel filtration. Le milieu réactionnel est déposé sur une colonne de Sephadex G50 coulée dans une seringue de 1 ml et préalablement séchée par centrifugation 1 min à 200 g. L'éluion se fait par une nouvelle centrifugation de la colonne dans les mêmes conditions.

II.2.2.9. Marquage de transcrits en 5'

Lors de la synthèse d'ARN par transcription *in vitro*, les produits de transcription générés possèdent une extrémité 5' triphosphate. Le marquage des transcrits à leur extrémité 5' comporte deux étapes : une étape de déphosphorylation à l'aide d'une phosphatase et une étape de marquage par la T4 polynucléotide kinase par transfert du phosphate du γ -³²P ATP à l'extrémité 5' hydroxyle de l'ARN.

Déphosphorylation :

Les ARN transcrits *in vitro* (1,5 μ g) sont incubés pendant 15 min à 37°C dans un volume final de 20 μ l comportant 2 μ l de **tampon de déphosphorylation 10X** (Gibco BRL) et 75 U de phosphatase alcaline bactérienne (BAP, Gibco BRL). Cette opération est suivie de trois extractions au phénol / chloroforme successives puis d'une précipitation à l'éthanol.

Tampon de déphosphorylation 10X : Tris-HCl pH 8,0 100mM

Marquage de l'extrémité 5' :

Les ARN déphosphorylés (200 ng), sont incubés 30 min à 37°C dans 10 μ l du milieu réactionnel suivant : 1 μ l de **tampon PNK 10X** (Fermentas), 50 μ Ci de γ -³²P ATP (3000 Ci/mmol, NEN Life Science) et 5U de T4 polynucléotide kinase (Fermentas). Le marquage est suivi d'une extraction au phénol / chloroforme puis d'une précipitation à l'éthanol.

Tampon PNK 10X : 500 mM Tris-HCl (pH 7.6 at 25°C), 100 mM MgCl₂, 50mM DTT, 1 mM spermidine et 1 mM EDTA.

II.2.2.10. Fractionnement par électrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes

Les ARN peuvent être fractionnés sur gel de polyacrylamide dont la concentration varie de 6 à 15% en fonction de la taille des ARN à analyser. Le gel est préparé dans du **tampon TBE 1X** avec une solution d'acrylamide / N,N' méthylène bisacrylamide (rapport 19 :1) et de l'urée 7M finale. La polymérisation est initiée par l'ajout de 0,07% (p/v) de persulfate d'ammonium 10% (p/v), et catalysée par l'addition de 0,035% (v/v) de TEMED. Les ARN sont dénaturés 2 min à 65°C en présence de 2 volumes de **tampon de charge**, puis déposés sur gel. La migration est réalisée à 7 mA, courant constant.

Tampon TBE 1X : Tris 90 mM ; EDTA 2,5 mM ; acide borique 90 mM

Tampon de charge : formamide déionisée 95% (v/v) ; EDTA 20 mM ; bleu de bromophénol 0,05% (p/v) ; xylène cyanol 0,05% (p/v)

II.2.2.11. Fractionnement par électrophorèse en gel d'agarose en conditions dénaturantes

Le fractionnement d'ARN de grande taille en conditions dénaturantes est réalisé dans un gel d'agarose 1,5% (p/v) / formaldéhyde 2,2 M et du **tampon MOPS 1X**. Pour 100 ml d'un gel d'agarose 1,5% contenant 2,2 M de formaldéhyde, 72 ml d'eau stérile avec 1,5 g d'agarose sont menés à ébullition. Dix ml de tampon MOPS 10X et 18 ml de formaldéhyde 12,3 M sont ajoutés à la solution refroidie à 55°C. Les ARN sont dénaturés 5 min à 65°C dans 19 μ l de **tampon de dénaturation** et refroidis dans de la glace. Une pré-migration est effectuée à 70 V durant 5 min. Puis les échantillons sont déposés sur gel après addition de 2 μ l de **tampon de charge**. Enfin, la migration s'effectue à 50 V entre 2h et 3h.

Tampon MOPS 1X : MOPS 20 mM pH 7 ; acétate de sodium 2 mM ; EDTA 1 mM

Tampon de dénaturation : tampon MOPS 1,05X ; formamide 52% (v/v) ; formaldéhyde 21% (v/v)

Tampon de charge : formamide déionisée 95% (v/v) ; EDTA 20 mM ; bleu de bromophénol 0,05% (p/v) ; xylène cyanol 0,05% (p/v).

II.2.2.12. Northern Blot

Les ARN fractionnés sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes ou en gel d'agarose 2,2M formaldéhyde peuvent être transférés sur membranes pour être sondés par un oligonucléotide marqué au γ -³²P par exemple.

Gel de polyacrylamide :

Le gel est déposé sur du papier Whatman posé sur une éponge. Une membrane Hybond-N+ (Amersham) est découpée à la taille adéquate puis déposée sur le gel. Le montage se fait ensuite en sandwich, une deuxième couche de papier Whatman est posée sur la membrane, recouverte par une seconde éponge. Le sandwich est pris entre deux grilles et plongé à la vertical dans une cuve contenant du **tampon TAE 0,25X**. Le transfert s'effectue dans un premier temps à 150 mA durant 15 min puis sous 500 mA durant 30 min. Les ARN, une fois la membrane extraite du montage, sont fixés au Stratagène (Stratagène) avec la fonction "autocrosslink".

Tampon TAE 0,25X : Tris-acétate pH 8,0 10 mM ; EDTA 0,25 mM

Gel d'agarose / formaldéhyde :

Les ARN fractionnés sur gel d'agarose / formaldéhyde sont transférés par capillarité sur une membrane de nylon Hybond-N+ (Amersham). Le gel est placé à l'envers sur un pont de papier Whatman 3M dont les extrémités baignent dans du SSC 20X. Sur le gel, on dépose successivement la membrane de nylon, des barrières de plastique pour éviter la montée du liquide d'entraînement en dehors du gel, puis deux feuilles de papier Whatman 3MM trempées dans du SSC 20X pour amorcer la montée de liquide par capillarité. Ce montage est surmonté de papier absorbant et d'une masse. Le temps de transfert est de 16 h environ. Les ARN sont ensuite fixés sur la membrane de façon covalente par irradiation sur une table U.V. pendant 4 min ou au Stratalinker (Stratagène).

II.2.2.13. Hybridation

La membrane est d'abord préhybridée dans 30 ml du **tampon de préhybridation** durant 2 h à 50°C (la température est adaptée en fonction de la Tm de l'amorce oligonucléotidique utilisée comme sonde). Ce tampon est ensuite remplacé par 3 ml de tampon neuf auquel on ajoute la sonde marquée. Après une nuit d'hybridation à 50°C (température moyenne d'hybridation, adaptée en fonction de la Tm de la sonde), la membrane est lavée deux fois 10 min dans du SSC 2X, puis 30 min dans du SSC 2X, SDS 0,1% (p/v). La membrane est ensuite enveloppée dans du Saran (Dow) et exposée à un film sensible aux rayons X.

Tampon de préhybridation : Phosphate de sodium 0,5 M pH 7,2 ; SDS 7% (p/v)

II.2.3. Techniques relatives aux mitochondries et aux protéines

II.2.3.1. Purification de mitochondries

La préparation de mitochondries développée par (Neuburger *et al.* 1982) et optimisée par (Fey *et al.* 1999) permet d'obtenir des mitochondries intègres et exemptes de contamination plastidiale, péroxisomale ou cytosolique. Toutes les étapes se déroulent à 4°C. Pour 5 kg de tubercules de pomme de terre, la quantité d'extrait obtenue au moyen d'un extracteur à jus (Moulinex) est d'environ 2 L. Cet extrait est directement récolté dans 1 L de **tampon d'extraction 3X**. Le pH est maintenu à 7,5 au cours de l'extraction avec une solution de K₂HPO₄ 1 M. La solution finale est filtrée sur une toile de nylon (vide de maille de 46 µm de diamètre). La solution est enrichie en mitochondries par une série de centrifugations différentielles : basse vitesse (1600 g, 15 min) pour éliminer les débris cellulaires et l'amidon résiduel, puis haute vitesse (16 000 g, 20 min) répétée deux fois. Les culots de mitochondries sont remis en suspension dans 16 ml de **tampon de lavage** puis purifiés sur des **gradients de Percoll** (autoformés à 40 000 g pendant 50 min). Les mitochondries, localisées au milieu des gradients, sont prélevées et diluées 10 fois dans

du **tampon de lavage** puis centrifugées 20 min à 17 000 g, pour éliminer le Percoll. Cette étape est suivie par deux autres cycles de lavages/centrifugation avec du **tampon de lavage** sans BSA. Pour une utilisation ultérieure, le culot de mitochondries est congelé dans de l'azote liquide et conservé à -80°C .

Le dosage des protéines est réalisé selon la méthode de Bradford. Cette méthode est basée sur la modification de la longueur d'onde d'absorption du bleu de Coomassie G-250 en milieu acide après fixation sur les acides aminés (de 460 à 595 nm) (Bradford 1976). Un ml de **réactif de Bradford** et 100 μl d'extrait protéique à quantifier sont mélangés et l'absorbance à 595 nm est mesurée. Cette mesure permet de déterminer la quantité de protéines présentes en se référant à une gamme étalon de BSA établie avec des quantités connues. La quantité de mitochondries utilisée lors des différentes expériences a été évaluée par cette technique. Par la suite, lorsque nous parlerons de mg de mitochondries, il s'agira en fait de mg en équivalent de protéines mitochondriales.

Tampon d'extraction 3X : Mannitol 0,9 M ; Diphosphate de sodium 90 mM ; EDTA 6 mM ; BSA 0,9% (p/v) ; PVP 25 000 2,4% (p/v) ; le pH est ajusté à 7,5 avec HCl concentré avant d'ajouter : Cystéine 0,15% (p/v) ; Glycine 15 mM ; 2-Mercaptoéthanol 6 mM

Tampon de lavage : Mannitol 0,3 M ; Phosphate de potassium pH 7,5 10 mM ; EDTA 1 mM ; BSA 0,1% (p/v) ; Glycine 5 mM

Solution pour gradients de Percoll : Phosphate de potassium pH 7,5 10 mM ; Saccharose 0,3 M ; EDTA 1mM ; BSA 0,1% (p/v) ; Percoll 30% (v/v)

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

II.2.3.2. Activité mitochondriale de dégradation d'ARN messager

Préparation de l'extrait enzymatique

Les mitochondries purifiées (30 mg en équivalent de protéines), sont reprises dans 6 ml de **tampon de resuspension** (réparties dans 4 microtubes de 2 ml) et lysées en effectuant 5 cycles de congélation (dans de l'azote liquide) et décongélation (quelques minutes à température ambiante). L'extrait est centrifugé 15 min à 20 000 g afin de sédimenter les membranes. Le surnageant est centrifugé à nouveau 5 min à 20 000 g.

Les protéines présentes dans le surnageant ainsi obtenu sont ensuite fractionnées par précipitation au sulfate d'ammonium. Pour cela, une solution saturée de sulfate d'ammonium à 4°C est ajoutée progressivement à l'extrait protéique sous agitation. Les protéines sont ainsi fractionnées par étapes, le volume adéquat de cette solution est ajouté pour atteindre la saturation désirée (par exemple 20% v/v) dans l'extrait protéique. Lorsque la concentration en sel désirée est atteinte, l'extrait protéique est laissé 30 min sur la glace, puis centrifugé 15 min à 20 000 g pour sédimenter les protéines qui précipitent entre 0 et 20% de sulfate d'ammonium (p/v). Une seconde précipitation peut alors être poursuivie sur le surnageant à une concentration plus élevée de sulfate d'ammonium.

Les protéines qui précipitent entre 20 et 40% de saturation en sulfate d'ammonium constituent la fraction qui comporte les activités mitochondriales dégradant les ARN messagers (Dominique Gagliardi, communication personnelle). Afin d'éliminer le sulfate d'ammonium, le culot de protéines est resuspendu dans 2,5 ml de **tampon de dialyse** et injecté dans une cassette de dialyse Slide-A-Lyzer® (Pierce). Après dialyse contre 1 L de **tampon de dialyse** durant 1 h, la solution est reprise avec une seringue et centrifugée 5 min à 20 000 g. Le surnageant est alors concentré par ultra filtration avec le système Ultrafree®-4 Centrifugal filter & tube Biomax 10K NMWL Membrane (Millipore) 1 h à 2000g à 4°C. Des fractions aliquotes sont ensuite congelées dans de l'azote liquide et conservées à -80°C.

Tampon de resuspension : MOPS pH 7,5 50 mM ; KCl 250 mM ; DTT 2 mM

Tampon de dialyse : MOPS pH 7,5 10 mM ; KCl 50 mM ; DTT 1 mM

Activité de dégradation *in vitro*

Les transcrits d'ARNm sont générés par transcription *in vitro* (voir paragraphe 5.2.2.8). Les transcrits sont, soit marqués uniformément (voir paragraphe 5.2.2.8), soit marqués en 5' (voir paragraphe 5.2.2.9).

L'incubation est réalisée à température ambiante de 1 h à 3 h dans le milieu réactionnel suivant :

- 5 µl de transcrits précurseurs (6000 cpm)
- 43 µl d'extrait protéique mitochondrial (voir ci-dessus)
- 1 mM d'ATP
- 1 mM de DTT
- 1 mM de Phosphate de Potassium pH 7.5
- 1 mM de MgCl₂
- 25 U d'inhibiteur de RNase de type A (RNA Guard, Amersham Pharmacia Biotech)

Pour chaque temps prédéfini, un prélèvement de 12 µl est effectué, sur lequel est réalisée une extraction au phénol / chloroforme. Les substrats ARN et leurs produits de dégradations sont analysés sur gel de polyacrylamide 6% en conditions dénaturantes et visualisés par autoradiographie.

II.2.3.3. Chromatographie en couche mince

L'analyse des produits de dégradation est poursuivie par le dépôt d'une fraction de chaque prélèvement effectué aux temps prédéfinis sur une plaque de polyéthylèneimine-cellulose (Sigma). Les dépôts sont entraînés par un tampon de migration KH₂PO₄ 0,25M. Comme témoin de migration, de l'UTP, UDP, UMP ou du Pi sont déposés à

proximité des échantillons testés. La plaque est séchée au sèche-cheveux, puis emballé dans du Saran® (Dow), et exposée contre un film sensible aux rayons X.

II.2.4. Techniques relatives aux plantes et à la purification de protéines surexprimées dans les plantes

II.2.4.1. Production de plantes transgéniques

Pour purifier des protéines d'intérêt, nous avons choisi d'utiliser la technique TAP (pour Tandem Affinity Purification). Cette technique fait appel à deux étapes de purification successives et nécessite l'ajout de deux "tags" à la protéine d'intérêt. Les cDNA d'AtPNPase et AtRNase II ont été fusionnés aux séquences codant pour le peptide "FLAG" et pour le peptide de liaison à la calmoduline (CBP) puis insérées dans le vecteur pBin+ contenant le promoteur et le terminateur de la séquence codant pour la protéine 35S du CaMV. Des plantes d'*Arabidopsis* ecotype columbia (Col) ont été transformées par la méthode d'immersion florale. Les générations T1 et T2 ont été semées sur de l'agar contenant du milieu MS, 0,5% de saccharose et 50 g/ml de kanamycine. Les plantes résistantes à la kanamycine sont ensuite transférées en terre et cultivées en serre. Toutes les plantes transgéniques ont été produites par Dominique Gagliardi.

II.2.4.2. Purification de protéines par la méthode TAP (Tandem Affinity Purification)

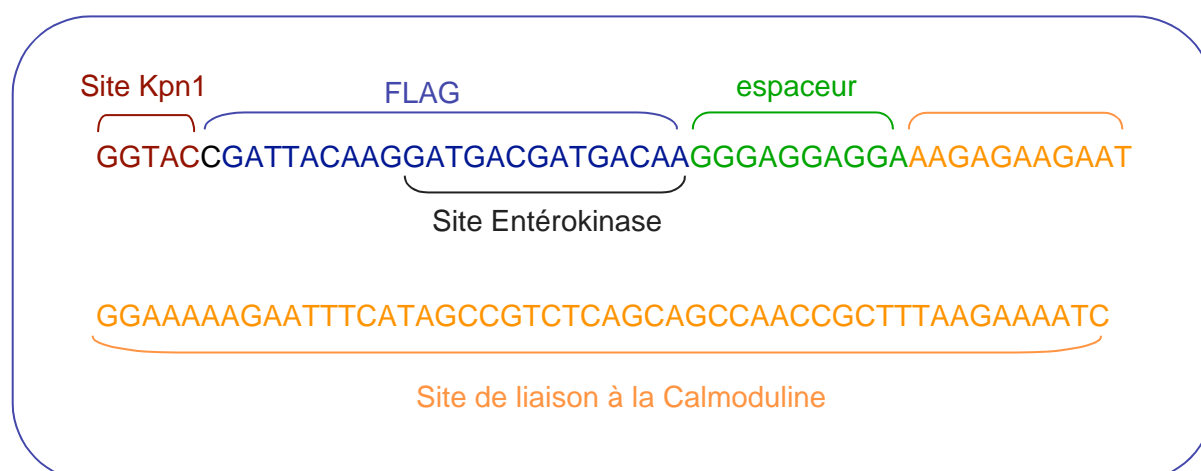
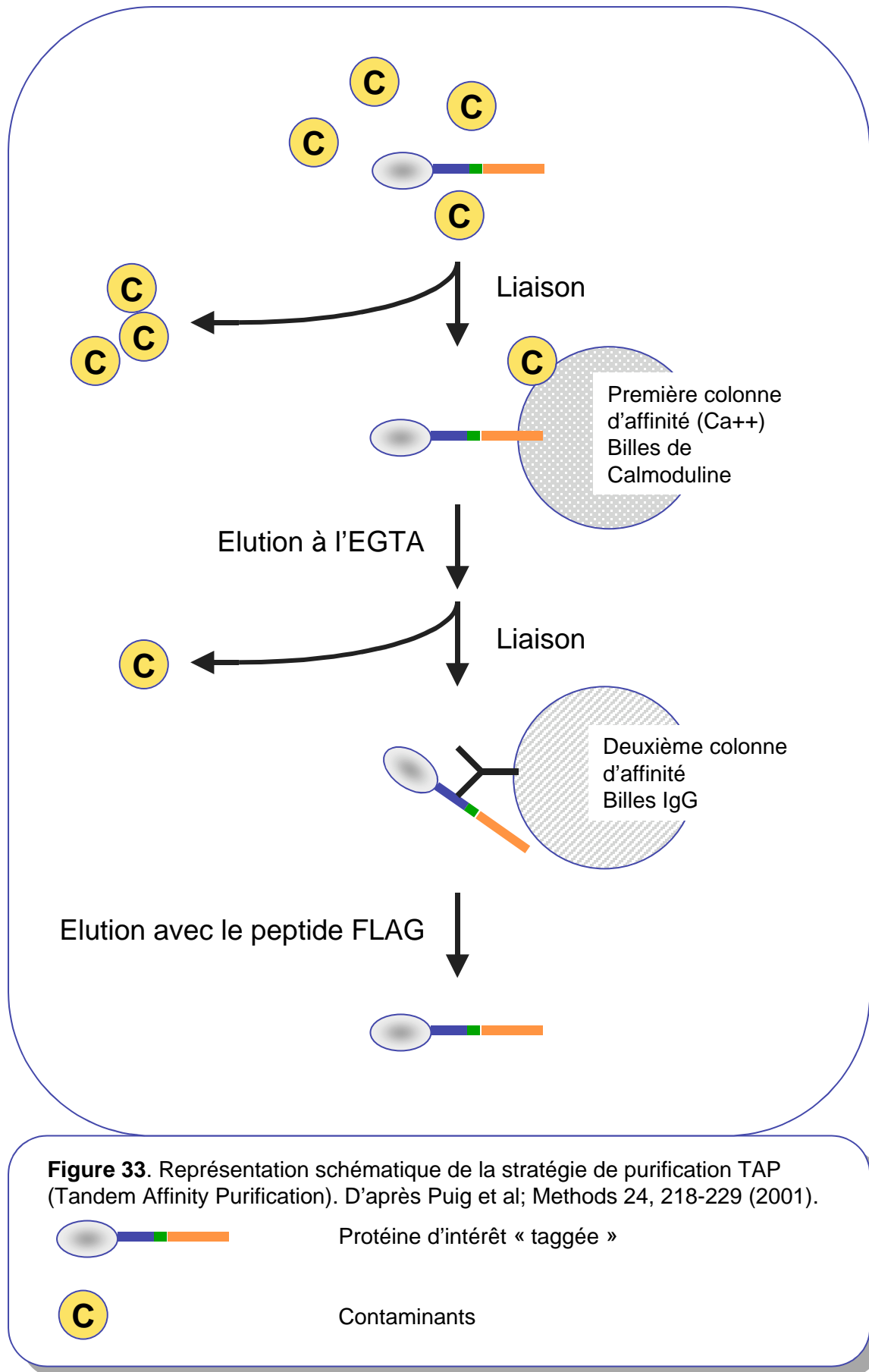


Figure 32 . Séquence ADN du « tag » utilisé au laboratoire dans la méthode de purification des protéines par TAP (Tandem Affinity Purification).



La méthode de purification TAP a d'abord été mise au point dans la levure (Puig *et al.* 2001). Elle permet de purifier des complexes dans des conditions non-dénaturantes sans avoir recours à un volume important de cellules. Cette méthode a été adaptée au laboratoire par Dominique Gagliardi afin de purifier des protéines d'intérêt exprimées dans des plantes. La séquence du "tag" utilisée est présentée **figure 32**. La première étape de purification commence par le broyage des plantes exprimant la protéine "taggée" dans du **tampon de broyage**. Le surnageant d'une centrifugation à 20 000 g de 10 min est incubé avec des billes de calmodulin (Stratagene) 1 h à 4°C en présence de 2 mM CaCl₂. Les billes sont lavées trois fois dans du **tampon de lavage** contenant 2 mM CaCl₂. Puis les protéines sont éluées avec du **tampon de lavage** contenant 5 mM EGTA et sont incubées avec des billes à anticorps FLAG M2 (Sigma) 30 min à 25°C pour la deuxième étape de purification. Les billes sont à nouveau lavées 3 fois dans du **tampon de lavage**. Les protéines qui ont été liées sont éluées dans du **tampon d'éluion**. Cette méthode est illustrée **figure 33**.

Tampon de broyage : 20 mM MOPS ; 150 mM KCl ; 1% (v/v) Triton X-100 ; pH 7,5 ; inhibiteurs de protéases: complete-EDTA, Roche Applied Science.

Tampon de lavage : 20 mM MOPS ; 150 mM KCl ; 0,2% Tween 20, pH 7,5.

Tampon d'éluion : 10 mM MOPS ; 50 mM KCl ; pH 7,5; 100 g/ml peptide FLAG.

Le suivi de la purification est effectué en déposant une fraction des protéines sur gel SDS-PAGE après chaque étape. Le gel est ensuite coloré à l'argent pour une détection optimale des protéines purifiées.

Gel SDS-PAGE :

Un gel d'analyse de protéines comporte deux phases différentes : un gel de concentration et un gel de séparation. Le **gel de concentration** est toujours à 5% (v/v) d'acrylamide, tandis que la concentration du **gel de séparation** dépend de la taille des protéines d'intérêt. Dans notre cas, le gel de séparation est à une concentration de 10% d'acrylamide.

Gel de concentration des protéines : acrylamide 5% (v/v) ; Tris-HCl 125 mM ; SDS 0,1% (p/v) ; APS 0,1% (p/v) ; TEMED 0,1% (v/v)

Gel de séparation des protéines : acrylamide 10% (v/v) ; Tris-HCl 125 mM ; SDS 0,1% (v/v) ; APS 0,1% (p/v) ; TEMED 0,04% (v/v).

Coloration à l'argent :

Le gel est fixé dans la solution 1 pendant 1 h. Le gel est ensuite lavé dans la solution 2, 30 min, dans la solution 3 sous agitation constante durant 3 min, puis à nouveau dans la solution 2 durant 10 min. Un lavage est effectué avec la solution 4 durant 10 min. Le gel est ensuite lavé avec de l'eau 10 min. Le gel est plongé 20 min dans la solution 5 préparée extemporanément. L'excès de nitrate est retiré en rinçant le gel pendant 20 s exactement dans 5 fois son volume d'eau. Le gel est ensuite plongé dans la solution 6

sous agitation constante pendant 1 min précisément. Le développement est effectué en plongeant le gel dans 100 ml de la solution 7, sous agitation constante durant 30 s. L'arrêt du développement est effectué en incubant le gel 5 min dans la solution 8. Si la coloration est acceptable, une incubation est effectuée 30 min dans la solution 9. Le gel est alors séché à température ambiante environ 12 h.

Solution 1 : méthanol 50% (v/v) ; TCA 12% (p/v) ; CuCl₂ 2% (p/v)

Solution 2 : éthanol 10% (v/v) ; acide acétique 5% (v/v)

Solution 3 : KMnO₄ 0,01% ; préparé extemporanément à partir d'une solution stock à 1% (2 ml de solution stock dans 200 ml d'eau)

Solution 4 : éthanol 10% (v/v)

Solution 5 : AgNO₃ 0,2% (p/v)

Solution 6 : K₂CO₃ 10% (p/v)

Solution 7 : formaldéhyde 0,02% ; K₂CO₃ 2% (p/v) (cette solution ne doit pas être préparée plus de 30 minutes avant son utilisation)

Solution 8 : acide acétique 1% (v/v)

Solution 9 : méthanol 45% (v/v) ; acide acétique 7,5% (v/v) ; éthanol 60% (v/v) ; 5% HAE

II.2.4.3. Test d'activité de la protéine RNase II-Tag

Les protéines éluées par la méthode TAP sont incubées avec des substrats qui correspondent soit aux ARN matures (M) d'*atp9* (nucléotides 279265-279331), soit aux ARN matures d'*atp9* avec une extension de 9 nucléotides (M+9) (nucléotides 279265-27340). Ces ARN sont synthétisés *in vitro* avec l'ARN polymérase T7 (Promega) en présence d' α -³²P UTP (voir paragraphe 5.2.2.8). Aux temps indiqués sur les figures, des aliquots sont prélevés et déposés sur un gel d'acrylamide à 15% (p/v) (voir paragraphe 5.2.2.10). Les produits de la réaction sont analysés par autoradiographie.

Milieu de réaction : tampon d'éluion + 1 mM DTT; 1 mM ATP; 0,4 u/L d'inhibiteur de RNase (RNase OUT ; Invitrogen).

II.2.4.4. Localisation sub-cellulaire de protéines

La localisation sub-cellulaire de protéines *in vivo* a été effectuée en fusionnant au gène rapporteur eGFP (enhanced green fluorescent protein) les séquences codantes des 107 et 192 acides aminés de l'AtmtPNPase et de AtmtRNaseII respectivement. Ces constructions sont introduites dans le vecteur pCK sous le contrôle du promoteur 35S du CaMV. Des cellules de feuilles de tabac ont été transformées par biolistique et les observations ont été effectuées au microscope confocal par José Gualberto au laboratoire comme décrit précédemment (Vermel *et al.* 2002).

II.2.4.5. Semis de graines d'*Arabidopsis thaliana*

Avant d'être semées, les graines sont préalablement stérilisées. Environ 20 μ l de graines sont suspendus dans 1 ml d'éthanol 70% sous agitation pendant 10 min, puis dans 1 ml d'eau de Javel, Tween 20 0,05% (v/v), sous agitation pendant 15 min. Il s'ensuit une série de 5 lavages à l'eau. Les graines une fois lavées sont semées sous hotte stérile dans des boîtes de Pétri contenant du milieu MS 255, 0,5% saccharose, plus 50 μ g/ml de kanamycine s'il est nécessaire de faire une sélection de transformants. Les semis sont ensuite placés dans une chambre de cultures destinées à la culture *in vitro* de plantes d'*Arabidopsis thaliana*. Après deux ou trois semaines de culture, les plantes peuvent être transférées en terre et cultivées en serre.

III / RÉSULTATS

III.1. Les ARN messagers polyadénylés de mitochondries de plante supérieure sont dégradés par une activité exoribonucléasique 3'-5' qui progresse sans être gênée par des structures secondaires stables.

III.1.1 Introduction

Comme il a été précisé dans l'introduction générale, les modes et les acteurs de la dégradation des ARN n'étaient pas connus pour le système génétique de la mitochondrie végétale à mon arrivée au laboratoire. Toutefois il avait été montré que deux ARN mitochondriaux pouvaient être polyadénylés. La première observation fut effectuée pour le transcrite dicistronique *atp1-orf522* dans le cadre de l'étude du système de stérilité mâle cytoplasmique (PET1-CMS) du tournesol (Gagliardi et Leaver 1999) (voir introduction générale § 2.2.5). Une autre étude a porté sur la polyadénylation des transcrits du gène *cox2* de la mitochondrie de maïs (Lupold *et al.* 1999). Enfin, simultanément à l'étude présentée dans ce chapitre, une exploration de la polyadénylation a été effectuée pour les transcrits *atp9* du pois et *atp1* d'oenothère (Kuhn *et al.* 2001).

Dans le cas du transcrite *atp1-orf522* du tournesol il a été montré que la polyadénylation induisait sa dégradation *in vivo* et *in vitro* (Gagliardi et Leaver 1999). Cette étude indiquait que le rôle de la polyadénylation des ARN dans les mitochondries végétales était similaire au rôle caractérisé dans les bactéries et les chloroplastes, c'est-à-dire celui d'activer la dégradation des ARN au contraire du rôle stabilisateur de la polyadénylation pour les ARNm nucléaires. En revanche, dans l'étude des transcrits du gène *cox2* du maïs, aucune modification de la stabilité des transcrits polyadénylés n'avait été observée. De même pour les transcrits polyadénylés des gènes *atp9* du pois et *atp1* d'oenothère, aucune influence sensible sur la stabilité de ces transcrits par rapport aux mêmes substrats non polyadénylés ne fut déterminée dans un système *in vitro*.

Pour mieux cerner l'implication de la polyadénylation dans la dégradation des ARN mitochondriaux de plante, la première partie de mon travail a porté sur l'étude de la polyadénylation de transcrits mitochondriaux de *Solanum tuberosum* et sur le rôle potentiellement déstabilisateur de l'ajout d'extension poly(A) en 3' de ces transcrits.

III.1.2. Identification d'ARN polyadénylés de la mitochondrie de S. tuberosum

III.1.2.1. Stratégie d'étude

Nous avons choisi de caractériser les sites de polyadénylation des ARN mitochondriaux de cette plante. En effet, les tubercules de pomme de terre sont riches en mitochondries. D'autre part, le protocole de purification est bien défini (Neuburger *et al.* 1982), et permet d'obtenir des mitochondries exemptes de contamination cytosolique et chloroplastique. De plus les mitochondries purifiées se sont révélées fonctionnelles lors d'expériences *in vitro* telles : l'importation de protéines, la synthèse protéique *in organello* ou encore la maturation des ARNt (Marchfelder *et al.* 1990; Marchfelder et Brennicke 1994). Ainsi, ce matériel végétal permet d'obtenir une grande quantité de mitochondries et par là même favorise la purification de protéines et l'isolement d'une grande quantité d'ARN. *Solanum tuberosum* semblait donc un matériel végétal de choix pour travailler sur le mécanisme de dégradation des ARN avec des substrats et des enzymes issus du même organisme.

Pour identifier des ARN polyadénylés, une transcription inverse a été effectuée sur des ARN mitochondriaux totaux en utilisant une amorce oligodT₍₁₈₎ possédant une séquence "adaptateur" (**tableau 2**). Une fraction des ADN complémentaires (ADNc) obtenus a été ensuite soumise à une amplification par PCR en utilisant comme couples d'amorces la séquence "adaptateur" et une amorce spécifique du gène d'intérêt. Les produits PCR totaux ont ensuite été clonés avec le kit TOPO TA Cloning qui comprend un vecteur T (voir Matériels & Methodes § 5.2.1.5) . En effet dans le cas d'un clonage classi-

que avec enzyme de restriction, il est nécessaire de connaître les sites de restriction. Or dans notre cas, nous ignorions où se situaient les extensions poly(A), et nous ignorions les séquences entourant les sites de polyadénylation. De plus, dans notre cas, nous n'avions pas forcément affaire à des ARN polyadénylés à un site précis mais plutôt à une population d'ARN polyadénylés à divers sites. C'est pourquoi l'utilisation d'un vecteur T dans lequel était clonée la totalité de la réaction de PCR après transcription inverse permettait l'analyse d'une population de transcrits d'un gène donné. En dernier lieu, les fragments clonés étaient séquencés pour localiser les éventuels sites de polyadénylation.

III.1.2.2. Caractérisation de la polyadénylation de transcrits mitochondriaux

Peu d'exemples de caractérisation de sites de polyadénylation d'ARNm mitochondriaux de plantes étaient disponibles (voir introduction I.2.2.5). Nous avons souhaité étendre ce type d'étude à d'autres ARNm, mais aussi aux ARN ribosomiques (ARNr) et aux ARN de transfert (ARNt).

Dans l'optique d'étudier cette modification post-transcriptionnelle des ARN mitochondriaux chez la pomme de terre et en l'absence de données de séquences suffisantes pour cette espèce végétale, les amorces ont été définies à l'aide de séquences d'autres espèces disponibles dans les banques de données. La comparaison d'au moins cinq séquences provenant d'espèces végétales différentes a été effectuée pour définir des régions identiques afin de définir une amorce spécifique pour chaque gène mitochondrial choisi par la suite.

III.1.2.2.1. Polyadénylation des ARN messagers mitochondriaux

Nous avons recherché les sites de polyadénylation éventuels des ARNm de 3 gènes mitochondriaux *cox3* (codant pour la sous-unité 3 de la cytochrome oxydase), *cob* (codant pour l'apocytochrome b) et *nad5* (codant pour pour la sous-unité 5 de la NADH déshydrogénase).

Dans le cas de *cob*, un produit d'environ 400 pb a été amplifié à partir du couple d'amorce COB1/adaptateur (**tableau 2**). Pour une première analyse, six clones ont été séquencés. Toutes ces séquences possèdent une extension poly(A) de 18 à 20 nt localisée à 176 nt en 3' du codon stop de ce gène. Il faudra confirmer l'existence de ce site de polyadénylation *in vivo* en obtenant la séquence génomique au site correspondant.

Dans le cas du gène *cox3*, un produit PCR d'environ 500 pb a été amplifié à partir du couple d'amorces COX1/adaptateur (**tableau 2**) et 3 clones ont été séquencés. Tous ces clones possèdent une queue poly(A) de 18 nt située à 286 nt du codon stop de ce gène (**figure 34**). Mais une séquence de 11 A présente au site correspondant dans la séquence génomique, ne permet pas d'affirmer avec certitude qu'il s'agit d'un site réel de polyadénylation.

Nom de l'amorce	Séquence
Oligo(dT) ₁₈ -adaptateur	CGACCCTCGAGAGGATCCCG(T) ₁₈
Adaptateur	CGACCCTCGAGAGGATCCCG
N1	GGTGCTTCTGTTGCGTATAATGT
NR1	AAAGAAATGGGAGTTGGCGCCT
COB1	CTAGGTTGGATCGGATGTCAAC
COX1	TGTGGTATTCGCCAATATCTTG
5S	CCGGGCACTACGGTGAGACGT

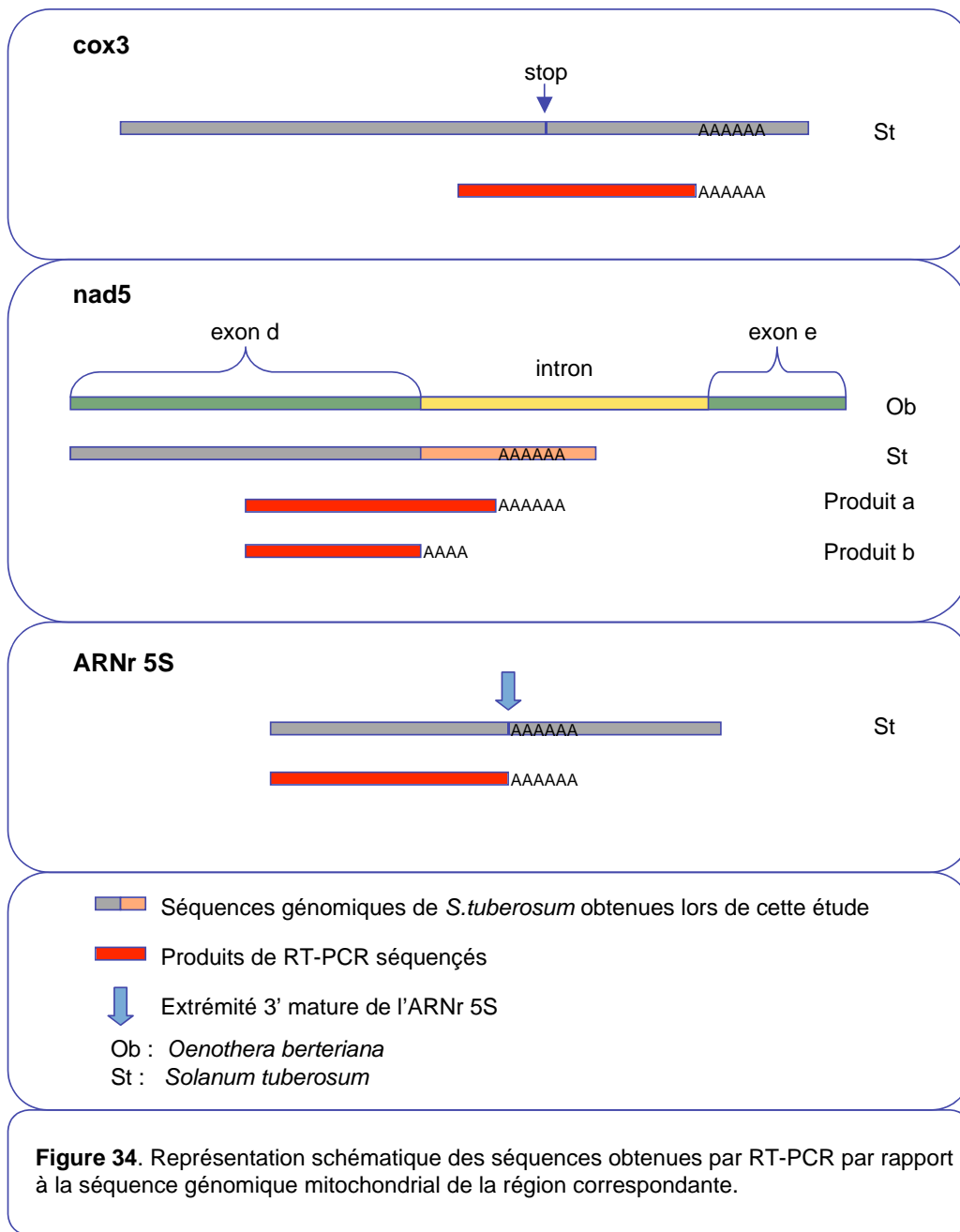
Tableau 2. Séquences nucléiques des amorces utilisées lors de cette étude. Toutes les séquences sont présentés de 5' vers 3'.

Le gène *nad5* est très conservé dans les mitochondries de plante supérieure, il contient 5 exons (de a à e) et 4 introns du groupe II (voir figure 12 de l'introduction générale). En utilisant une amorce spécifique de l'exon d du gène *nad 5* (**tableau 2**; N1), nous avons obtenu deux produits d'amplification différents. L'un présente une extension poly(A) dans la partie intronique de ce même gène (**figure 34**; produit a). L'autre présente une queue poly(A) juste à l'extrémité 3' de l'exon d du gène *nad5* (**figure 34**; produit b).

Pour vérifier la réalité de ces sites de polyadénylation, la séquence génomique correspondante de l'ADN mitochondrial de pomme de terre a été obtenue. En utilisant l'amorce N1 et l'amorce NR1 définie par homologie de séquence dans l'exon e (**tableau 2**), le fragment situé entre ces deux amorces a été amplifié à partir d'ADN génomique mitochondrial de *S. tuberosum*, cloné, puis séquencé à partir de l'amorce N1.

La première séquence obtenue (produit a) présente une extension poly(A) à l'endroit d'une région génomique comportant 11A consécutifs. De ce fait, l'amorce oligo dT a pu s'hybrider sur le transcrite correspondant. Il est donc très peu probable que ce premier produit corresponde *in vivo* à un site réel de polyadénylation.

En revanche la deuxième séquence obtenue (produit b) correspond à un site dans une région de la séquence génomique qui n'est pas riche en A et correspond donc à un vrai site de polyadénylation. Les transcrits du gène *nad5* de *S. tuberosum* peuvent donc être polyadénylés. L'identification de ce site de polyadénylation à l'extrémité 3' de l'exon d est un exemple supplémentaire de polyadénylation des ARN mitochondriaux de plante. De plus, la situation de cette extension poly(A) à la jonction exon-intron d'un ARN mitochondrial est une observation nouvelle. Suite aux difficultés liées à la présence de régions riches en A dans de nombreuses séquences, une nouvelle cible a été définie avec soin, il s'agit du gène *atp9* de la mitochondrie de *Solanum tuberosum*. Son étude est détaillée aux paragraphes III.1.2.2.3 et III.1.3 des résultats.



III.1.2.2.2. Polyadénylation des ARN de transfert et des ARN ribosomiques

Lors d'une étude effectuée sur des mutants d'*E. coli* affectés dans l'expression des exonucléases impliquées dans la maturation des ARN, la polyadénylation de la plupart des espèces d'ARN dits "stables" a été observée. Parmi les substrats polyadénylés identifiés dans ces mutants se trouvent les ARN ribosomiques 5S, 23S et 16S; l'ARNt^{Tyr}; l'ARN

M1 (la sous-unité catalytique de la RNase P) et l'ARN_{tm} (structure mixte entre un ARN de transfert et un ARN messager qui permet l'étiquetage de protéines synthétisées à partir d'un ARN messager incomplet, menant à leur destruction,) (Li *et al.* 1998). Par ailleurs, dans une étude réalisée sur les ARN chloroplastiques de l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii*, des sites de polyadénylation sur les ARN_r et les ARN_t ont été rapportés (Kohmine *et al.* 2000). Il nous a donc semblé pertinent d'étendre notre étude aux ARN_r et aux ARN_t mitochondriaux.

Pour ce qui est des ARN_t, deux essais d'amplification, sur du cDNA produit avec une amorce oligodT ont été réalisés avec des amorces spécifiques des ARN_t^{Ser}(GCU) et ARN_t^{Cys} mitochondriaux de *S. tuberosum*. Aucun produit d'amplification n'a pu être identifié jusqu'à présent par cette méthode. Aucune autre tentative au laboratoire n'a abouti à l'identification d'ARN_t polyadénylés.

En revanche, avec la même stratégie, nous avons isolé un produit de PCR d'environ 200 pb (à partir du couple d'amorces 5S/adaptateur; **tableau 2**) correspondant à la séquence du 5S suivie de queues poly(A) à son extrémité 3' mature (**figure 34**). Toutefois le séquençage de l'ADN génomique dans la région correspondante a révélé une séquence riche en A (17 A sur 21 nt) à l'extrémité 3' du gène codant pour cette ARN_r. Ce résultat nous empêche de conclure quant à l'existence de transcrits polyadénylés de l'ARN 5S dans la mitochondrie de pomme de terre. Toutefois, comme nous le verrons dans le troisième chapitre, l'étude de la polyadénylation des ARN ribosomiques a été poursuivie et nous a permis de montrer que l'ARN 18S était polyadénylé et que le rôle de la polyadénylation ne se limite pas à induire la dégradation des ARN messagers dans le métabolisme des ARN mitochondriaux.

Les régions riches en A, présentes dans les transcrits mitochondriaux, ont généré l'investigation de la polyadénylation des ARN de la mitochondrie de *S. tuberosum*. C'est pourquoi une nouvelle cible a été définie : les transcrits du gène *atp9* de *S. tuberosum*. En effet, son expression était déjà documentée et il ne comporte pas de régions riches en A dans sa partie 3' UTR.

III.1.2.2.3. Caractérisation des ARNm polyadénylés du gène *atp9*

Au début de l'étude, nous avons tendance, dans un premier temps, à rechercher l'information sur l'ARN, puis, dans un deuxième temps, à essayer d'obtenir l'information de la séquence génomique correspondante. Pour obtenir plus rapidement des informations fiables, une meilleure détermination de l'objet d'étude était nécessaire. De ce fait, le gène *atp9* a été défini comme cible d'étude prioritaire car un grand nombre d'informations concernant sa séquence et son expression était déjà disponible avant le début de cette étude. Ainsi, sa séquence codante et ses régions flanquantes étaient connues; de plus, information capitale, il ne comportait pas de région riche en A dans sa partie 3' non codante. L'expression de ce gène mitochondrial était bien documentée pour cette espèce végétale : la taille des transcrits *atp9* est relativement petite (de 540 à 551 nt) et les sites d'édition ont été caractérisés. L'extrémité 5' du transcrit précurseur a été localisée et l'extrémité 3' a été cartographiée 67 à 71 nt en aval d'une région présente dans l'extrémité 3' non traduite du gène *atp9* qui se structure potentiellement en tige-boucle (Lizama *et al.* 1994).

L'étude de la caractérisation des sites de polyadénylation des transcrits du gène *atp9* est présentée dans l'article qui suit. Cependant, cette étude ne s'est pas limitée à la description des sites de polyadénylation, mais précise l'influence de cette modification post-transcriptionnelle sur la stabilité des ARNm d'*atp9* de *S. tuberosum* par des activités RNases mitochondriales.

Dans le cadre de mon travail de thèse, j'ai effectué dans l'étude présentée dans l'article 1, la caractérisation des sites de polyadénylation des transcrits du gène *atp9* de *Solanum tuberosum*. Cette étape était un préalable indispensable à la définition exacte de substrats potentiels de l'activité de dégradation préférentielle d'ARN polyadénylés. L'analyse de la dégradation de ces substrats a ensuite été étudiée dans un système *in vitro* développé au laboratoire par Dominique Gagliardi.

III.1.3. Article 1



[signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

Dominique Gagliardi, **Romary Perrin**, Laurence Maréchal-Drouard, Jean-Michel Grienenberger, and Christopher J. Leaver

Plant mitochondrial polyadenylated mRNAs are degraded by a 3'- to 5'-exoribonuclease activity, which proceeds unimpeded by stable secondary structures.

The Journal of Biological Chemistry 276, 43541-43547 (2001)

Pages 43541-43547 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur

<http://www.jbc.org/cgi/reprint/276/47/43541.pdf>

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr.

III.1.4.Éléments de discussion

III.1.4.1.Caractéristiques de la polyadénylation des ARN du gène *atp9* de *Solanum tuberosum*

La taille des extensions poly(A) des clones séquencés était généralement de la taille du nombre de résidus T de l'oligo(dT)₁₈, soit 18 résidus. Cependant, des extensions pouvant atteindre de 31 à 51 résidus ont été caractérisées. Mais la méthode employée pour détecter des ARN polyadénylés (RT-PCR) ne permet pas d'estimer la taille réelle des extensions poly(A). A cela s'ajoutent deux biais expérimentaux. D'une part, la PCR pourrait favoriser l'amplification des fragments de petite taille et, donc, sélectionner les extensions poly(A) courtes. D'autre part, il est possible que le clonage dans un vecteur TOPO privilégie l'insertion des fragments de petite taille, induisant un biais similaire à celui de la PCR. Il serait donc impossible de cette façon d'analyser de manière représentative une population d'ARN polyadénylés.

Une expérience supplémentaire a été tentée pour déterminer avec plus de précision la taille des extensions poly(A) des ARN mitochondriaux. Une expérience de "tailing" a été effectuée en utilisant la poly(A) polymérase de levure et du GTP afin d'ajouter des extensions poly(G) à tout les ARN mitochondriaux (Komine *et al.* 2000). Puis, pour détecter la jonction entre l'extension poly(G) et l'extension poly(A) des ARN polyadénylés, une transcription inverse avec un oligo(C)₁₁(T)₄-adaptateur a été effectuée. Malheureusement, une expérience contrôle effectuée sur des ARN transcrits *in vitro* a montré qu'il était possible d'amplifier des cDNA correspondant à des substrats non-polyadénylés avec ce protocole, rendant caduque toute analyse par cette méthode.

La composition des extensions poly(A) a été analysée en soustrayant les 18 résidus de l'oligo(dT)₁₈ aux extensions poly(A) caractérisées. 96% des résidus restants sont des A, indiquant que les extensions poly(A) dans les mitochondrie de plantes sont principale-

ment homopolymériques. C'est une caractéristique qui rapproche le système mitochondrial de plante des systèmes bactérien d'*E. coli* (O'Hara *et al.* 1995) et chloroplastique de *Chlamydomonas reinhardtii* (Komine *et al.* 2000), plutôt que du système chloroplastique de plante supérieure où les extensions poly(A) ne contiennent que 70% de résidus A (Lisitsky *et al.* 1996).

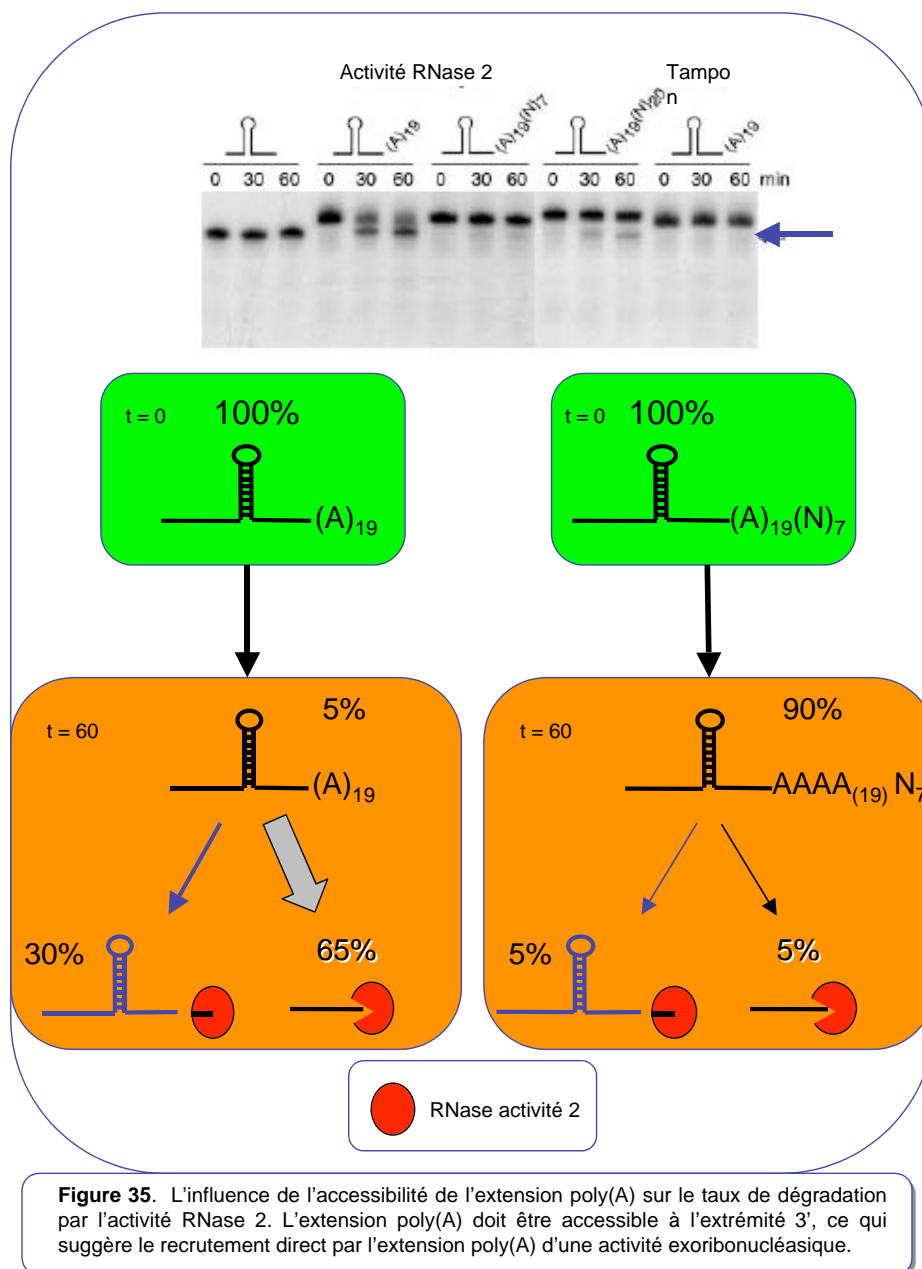
La majorité des sites de polyadénylation des ARN du gène *atp9* se situent dans une fenêtre de 5 nucléotides correspondant aux extrémités 3' matures cartographiées précédemment. Cependant, deux sites internes ont été identifiés au début de la séquence codante d'*atp9*, mais leur provenance reste indéterminée. Nous ne savons pas s'ils sont issus d'un clivage endonucléolytique ou de plusieurs cycles de polyadénylation/digestion exonucléasique.

De plus, l'activité RNase 2 est capable de dégrader entièrement un substrat ARN même fortement structuré, polyadénylé aux extrémités matures. Ces deux éléments sont en faveur de la possibilité du fait que la dégradation des ARN dans les mitochondries de plante suit une voie majoritairement exonucléasique. C'est une différence majeure avec les systèmes de la bactérie ou du chloroplaste où la dégradation des ARN est initiée par des clivages endonucléasiques suivis par la polyadénylation des fragments d'ARN aux sites correspondants.

III.1.4.2. L'extension poly(A) doit être accessible à l'extrémité 3' pour que l'activité RNase 2 dégrade le substrat ARN

Afin de confirmer que l'activité RNase 2 était ou contenait une ou des activités exonucléases, deux expériences ont été effectuées. La première consistait en l'analyse des produits de dégradation par chromatographie en couche mince. Cette analyse est présentée sur la figure 5 de l'article 1. L'expérience montre qu'à partir d'un ARN polyadénylé, l'activité RNase 2 relargue des ribonucléosides diphosphate et monophosphate. Ceci est consistant avec la présence d'une activité exoribonucléase impliquée dans la dégradation des ARN polyadénylés mitochondriaux de plante.

La seconde expérience consistait à mettre en présence de l'activité RNase 2 des ARN non-polyadénylés, polyadénylés ou polyadénylés auxquels étaient ajoutés des nucléotides à la suite de l'extension poly(A). Or, dans cette expérience, seuls les substrats avec l'extension poly(A) libre en 3' étaient attaqués par l'activité RNase 2. Une interprétation de ces résultats est présentée **figure 35**. Ce résultat montre que l'extension poly(A) doit être accessible à l'extrémité 3' pour initier la dégradation et cela suggère fortement l'implication d'une exoribonucléase pour la destruction des ARN polyadénylés.



III.1.4.3. Il existe une taille optimale de l'extension poly(A) pour induire la dégradation d'un substrat ARN polyadénylé

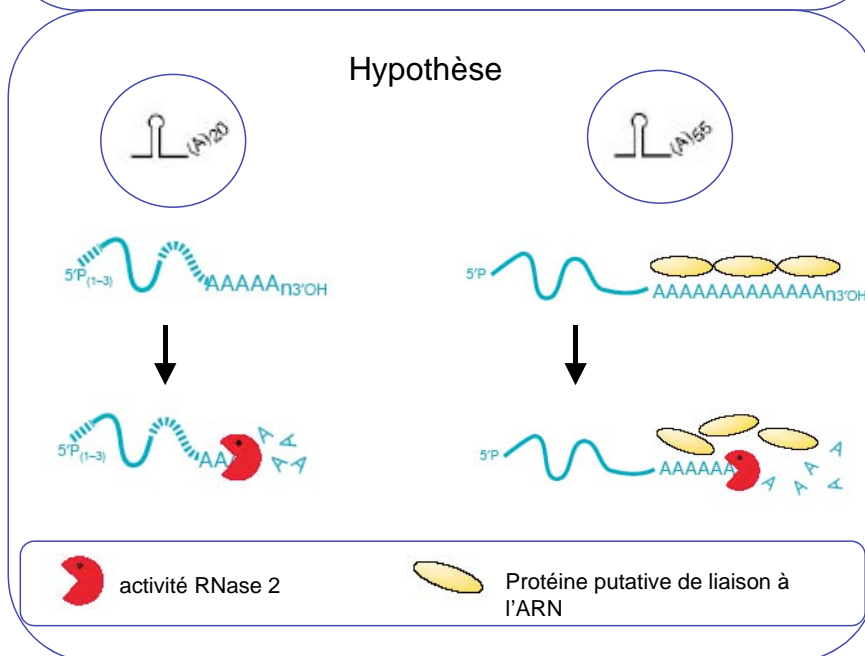
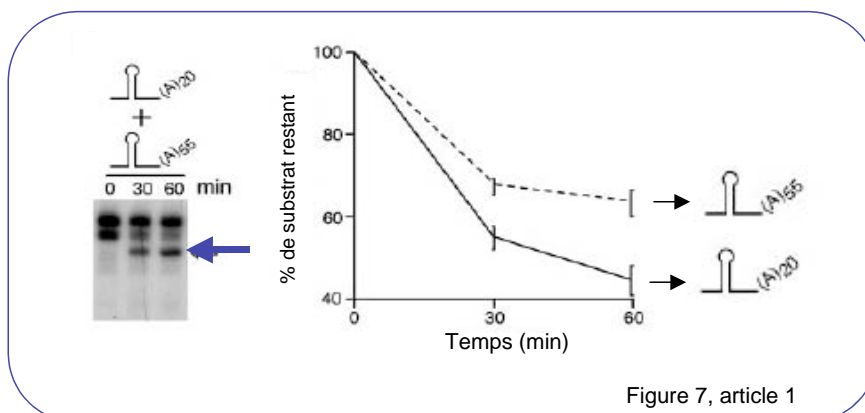


Figure 36. Influence de la taille de l'extension poly(A) sur le taux de dégradation par l'activité RNase 2. Le taux de dégradation du substrat ARN poly(A)₅₅ est plus faible comparé à celui du substrat poly(A)₂₀. Cette observation peut suggérer l'existence de protéines liant l'ARN qui pourraient affecter le recrutement ou la progression de l'activité RNase 2.

Pour tester l'influence de la taille de l'extension poly(A) sur le taux de dégradation d'un substrat ARN, des ARN comportant des extensions de 0, 5, 20, 27, et 55 A ont été exposés à l'activité RNase 2 (article 1; figure 7). Les substrats comportant 0 ou 5 A ne sont pas significativement dégradés, indiquant que 5 résidus adénosines sont insuffisants pour initier la dégradation. Au contraire, des substrats ayant des extensions de 20 et 27 A

sont dégradés efficacement. De manière surprenante, le substrat ayant une extension de 55A est dégradé moins efficacement que celui comportant 20 résidus. Cette expérience suggère qu'il existe une taille optimale de l'extension poly(A) pour déclencher la dégradation des substrats ARN par l'activité RNase 2 dans le système *in vitro* utilisé. Une hypothèse pour expliquer ce résultat est schématisée sur la **figure 36**. Il est possible que de longues extensions poly(A) soient reconnues par des protéines liant l'ARN qui affecteraient le recrutement et la progression de l'activité RNase 2.

III.1.4.4. Vers l'identification des éléments protéiques de l'activité RNase 2

L'activité RNase 2 dégrade préférentiellement les ARN polyadénylés. Lors de l'incubation pendant 60 minutes d'un substrat ARN comportant 20 résidus adénosine en 3' avec l'activité RNase 2, environ 65% du substrat de départ sont entièrement dégradés, 30% de ce substrat de départ se retrouvent sous la forme d'un intermédiaire de dégradation qui correspond en taille au substrat non-polyadénylé (flèche bleue sur la **figure 35**).

La production d'un intermédiaire de dégradation correspondant à la digestion des extensions poly(A) par l'activité RNase 2 peut être expliquée de différentes manières. On peut émettre l'hypothèse de l'existence d'une nucléase poly(A) spécifique qui s'arrêterait à la jonction entre l'extension poly(A) et le reste du substrat. Il peut aussi exister une compétition entre les composants de l'activité RNase 2 et d'autres protéines impliquées dans la maturation des extrémités 3'. Enfin, la génération de cet intermédiaire peut être due à la dissociation des composants de l'activité RNase 2 du substrat à la jonction entre l'extension poly(A) et le reste du substrat.

La caractérisation de sites de polyadénylation à la jonction exon d-intron des transcrits du gène *nad5* d'une part et aux extrémités 3' matures des transcrits du gène *atp9* de *Solanum tuberosum* d'autre part représentent deux nouveaux cas de polyadénylation des ARN mitochondriaux de plante.

Cependant le rôle de la polyadénylation dans la déstabilisation des ARN mitochondriaux n'était pas clairement établi. En effet, dans le cas des transcrits du gène *cox2* de maïs, ainsi que pour les transcrits des gènes *atp9* du pois et *atp1* d'oenothère, la polyadénylation avait peu ou pas d'influence sur le taux de dégradation des ARN. Il est possible que des activités RNases ne soient plus présentes dans les systèmes *in vitro* utilisés. Par contre dans le cas des ARN d'*atp1-orf522* de tournesol, la polyadénylation induisait une dégradation préférentielle des ARN *in vitro* et *in vivo*. L'étude supplémentaire présentée dans l'article 1 est en faveur des observations faites pour *atp1-orf522* de tournesol, à savoir que dans les mitochondries de plante, l'ajout d'extensions poly(A) à l'extrémité 3' des ARN favorise un mécanisme efficace de dégradation 3'-5'.

L'identification de l'activité RNase 2 comme responsable de cette dégradation préférentielle 3'-5' des ARN polyadénylés est une première étape vers la caractérisation des composants du mécanisme de dégradation des ARN mitochondriaux de plante. Mais il restait toutefois à identifier les gènes codant pour la ou les exonucléases faisant partie de l'activité RNase 2. Une possibilité était d'affiner la purification de l'activité RNase 2 jusqu'au séquençage des protéines la composant. Malheureusement cette stratégie a échoué, due à la perte de l'activité après des étapes supplémentaires de purification. Il nous restait l'éventualité de suivre une stratégie "gène candidat", rendue possible par l'achèvement en 2000 du séquençage total du génome nucléaire de la plante modèle *Arabidopsis thaliana*.

Par ailleurs, l'existence dans les bactéries et les chloroplastes d'une polynucléotide phosphorylase qui dégrade spécifiquement les ARN polyadénylés de 3' vers 5' et celle de la RNase II qui est une exoribonucléase 3'-5' hydrolytique qui dégrade spécifiquement les ARN non structuré et en particulier les extensions poly(A) étaient des indications importantes quant aux éléments protéiques qui pourraient composer l'activité RNase 2. En effet, l'intermédiaire de dégradation pourrait être produit par une protéine de type RNase II qui digérerait spécifiquement l'extension poly(A) et aboutirait à la stabilisation

du substrat. D'autre part, la digestion complète du substrat ARN par une exoribonucléase qui reconnaît spécifiquement les substrats ARN polyadénylés correspond à une activité du type de celle de la PNPase bactérienne ou chloroplastique.

L'identification des composants protéiques de l'activité RNase 2 est l'objet du chapitre III.2 des résultats.

III.2. Deux exonucléases agissent séquentiellement pour maturer les extrémités 3' des ARN messagers du gène mitochondrial *atp9* d'*Arabidopsis thaliana*

III.2.1. Choix du matériel végétal

Bien que ce ne soit pas une plante d'importance agronomique, plusieurs caractéristiques font d'*Arabidopsis thaliana* un organisme modèle pour l'étude de la biologie des plantes à fleurs. Effectivement, la séquence de son génome nucléaire est connue depuis 2000, le génome mitochondrial depuis 1997 et le génome chloroplastique depuis 1999. Elle possède un cycle de vie court, elle a une production importante de graines et peut être cultivée dans des espaces restreints. De plus, il existe des méthodes de transformation par *Agrobacterium tumefaciens* efficaces, et des collections très importantes de lignées de mutants. Ainsi, nous avons choisi d'utiliser la plante modèle *Arabidopsis thaliana* comme outil pour identifier des exonucléases impliquées dans le métabolisme des ARN de la mitochondrie végétale.

III.2.2. Gènes candidats

Chez *E. coli*, les principales exonucléases qui sont impliquées dans la dégradation 3'-5' des ARN et participent à des processus de maturation sont la polynucléotide phosphorylase (PNPase) et la RNase II (voir introduction générale § 3.1.1.5). Des protéines homologues à la PNPase sont présentes dans la mitochondrie humaine et dans le chloroplaste. Dans ce compartiment de la cellule végétale, cette exoribonucléase est impliquée à la fois dans la dégradation et la maturation de plusieurs ARN. Dans la mitochondrie de levure, le mtEXO est composé de deux sous-unités : Suv3p, une hélicase, et Dss1p, une exonucléase appartenant à la famille des RNase II. Dans les mutants de levure affectés

dans l'expression des composants du mtEXO, l'un des phénotypes moléculaires observés est l'accumulation de précurseurs d'ARNm.

Pour identifier la ou les exonucléases qui composent l'activité RNase 2 dont la caractérisation est décrite au chapitre précédent, nous avons recherché dans le génome nucléaire d'*Arabidopsis thaliana* des gènes qui codent pour des protéines qui répondent à deux critères. D'une part, les protéines putatives doivent comporter des motifs établis d'exoribonucléases connues. D'autre part, ces protéines doivent être prédites comme adressées à la mitochondrie *in silico* par les programmes d'adressage disponibles. A partir de ces critères deux gènes d'*Arabidopsis* ont été retenus : At5g14580 et At5g02250.

At5g14580 est un gène qui code pour une protéine putative présentant des homologies significatives avec les PNPases chloroplastique et bactérienne. L'analyse de sa séquence montre la présence d'une orf de 991 codons codant pour une protéine putative de 108 kDa. La séquence protéique des acides aminés 58 à 741 présente de hautes homologies avec le domaine conservé (COG1185.1, Pnp) dérivé de 48 PNPases majoritairement d'origine bactérienne (**figure 37**). Un domaine S1 de liaison à l'ARN est présent des amino-acides 674 à 741. Le domaine C-terminal de la protéine ne présente aucune homologie avec des protéines connues. Un arbre phylogénétique des protéines apparentées faisant partie de la famille des RNases PH est montré **figure 38**. Un alignement des deux domaines conservés de cette protéine avec ces homologues bactérien et chloroplastique a récemment été présenté (Yehudai-Resheff *et al.* 2003).

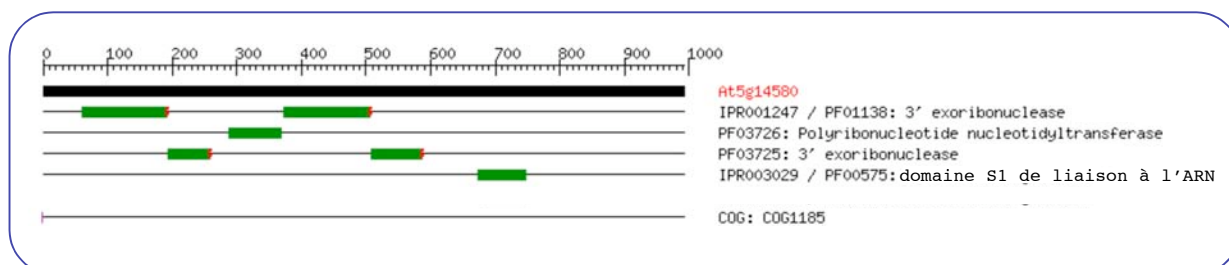


Figure 37. Caractéristiques de la protéine putative codée par le gène At5g14580. Les principaux domaines ayant une homologie avec un motif protéique défini sont représentés en vert.

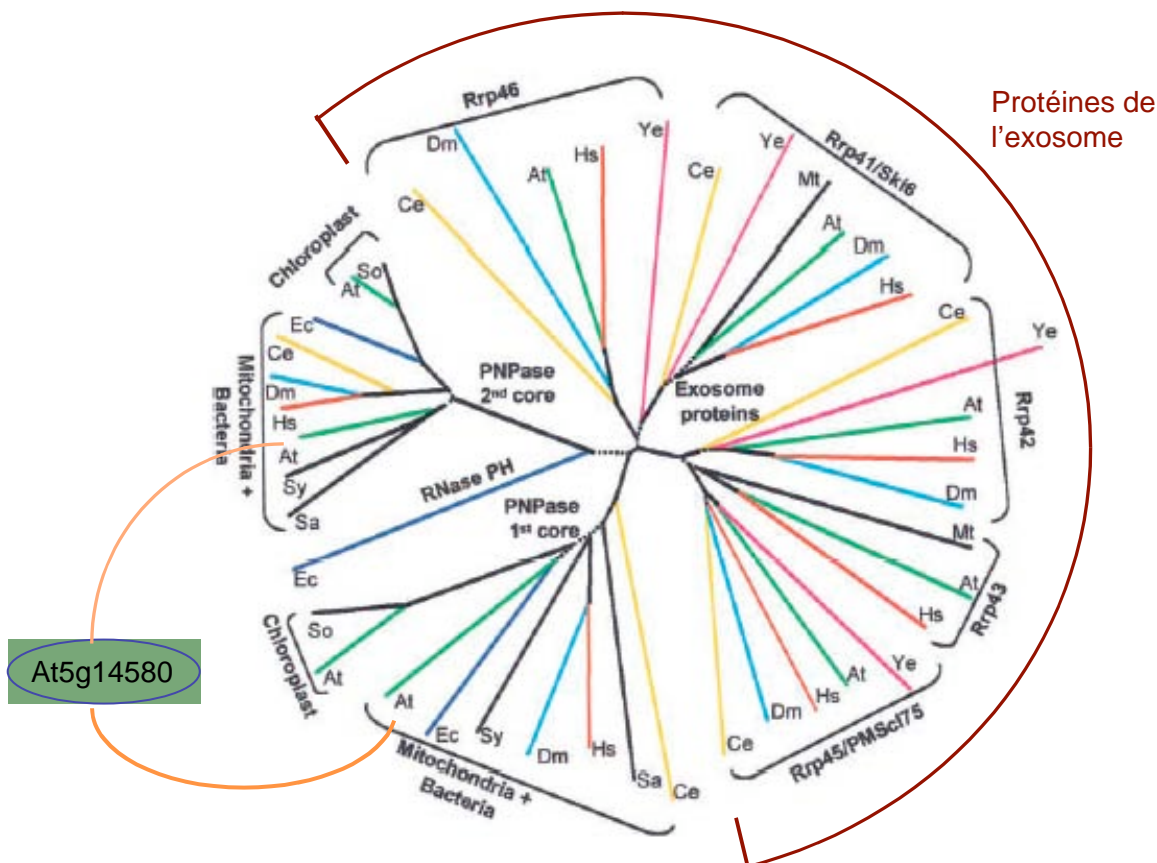


Figure 38. Arbre phylogénétique des protéines à domaines RNase PH de bactéries et des PNPases d'organelles et des protéines de l'exosome. Le premier et le second domaine des PNPases, des protéines relatives à l'exosome et ont été alignées avec CLUSTAL X par rapport à la RNase PH d'*E.coli*, et l'arbre phylogénétique construit avec la méthode du plus proche voisin. Les protéines issues du même organisme sont de la même couleur. Les organismes sont : At, Arabidopsis thaliana; So, Spinacia oleracea; Hs, Homo sapiens; Ec, Escherichia coli; Sa, Streptomyces antibioticus; Sy, Synechocystis sp PCC6803; St, Staphylococcus aureus; Dm, Drosophila melanogaster; Ce, Caenorabitis elegans; Ye, Saccharomyces cerevisiae; Mt, Methanobacterium thermoautotrophicum. D'après Yehudai-Resheff et al, The Plant Cell, Vol. 15, 2003-2019, Septembre 2003.

Une "fiche d'identité" de la protéine peut être consultée à l'adresse suivante :

<http://www.mitoz.bcs.uwa.edu.au/apmdb/Flatfile-Script.php?chrlocus=AT5G14580.1>.

La séquence protéique déduite est prédite adressée dans les organelles comme suit par les programmes suivants : MitoProt II (score 0.9872, prédiction : mito), Predotar v1.03 (score 0.44), iPSORT (Prédiction : mito), TargetP v1.01 (score 0,536, prédiction : mito).

At5g02250 est un gène qui code pour une protéine putative qui est prédite comme appartenant à la famille des RNase II. L'analyse de sa séquence montre qu'elle comporte un orf de 803 codons codant pour une protéine de 98.7 kDa. Elle comporte un domaine qui présente une forte homologie avec le motif (COG0557) appartenant à la ribonucléase R (**figure 39**).

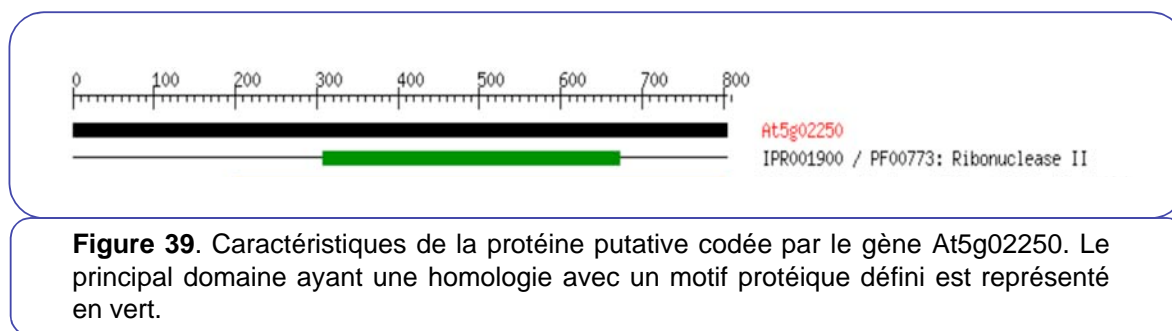


Figure 39. Caractéristiques de la protéine putative codée par le gène At5g02250. Le principal domaine ayant une homologie avec un motif protéique défini est représenté en vert.

Une "fiche d'identité" de cette protéine est disponible à l'adresse suivante:

<http://www.mitoz.bcs.uwa.edu.au/apmdb/Flatfile-Script.php?chrlocus=AT5G02250.1>

Cette protéine putative est prédite importée dans la mitochondrie par les programmes MitoProt II (score 0.9355) et iPSORT (prédiction : mito), et chloroplastique par les programmes suivants : Predotar (score 0.58, prédiction : chloroplaste), , TargetP v1.01 (score 0.908, prédiction : chloroplaste). La prédiction de l'adressage de cette protéine est donc ambiguë. Il est possible que cette protéine soit doublement adressée à la mitochondrie et au chloroplaste comme de nombreuses Aminoacyl-ARNt Synthétases.

III.2.3.Stratégie d'étude

Pour étudier l'implication des produits de ces gènes dans la maturation ou la dégradation des ARN mitochondriaux de plante, la stratégie qui a été appliquée dans l'article 2 est la suivante :

La première étape était d'obtenir des mutants dans lesquels l'expression de ces gènes candidats était affectée, soit en abaissant leur niveau d'expression, soit en l'élevant,

en surexprimant la protéine correspondante. Après l'identification de gènes candidats, il fallait donc obtenir les mutants d'insertion correspondants à partir des banques existantes. Une fois les mutants obtenus, il fallait s'assurer que l'insertion était bien située dans le gène étudié, puisque l'expression des gènes candidats était bien affectée par cette insertion. L'étape suivante était de contrôler l'état d'expression des gènes codés par le génome mitochondrial dans les mutants par rapport au sauvage, en particulier si leur maturation en 3' était affectée dans les mutants. Puis, pour mieux caractériser les activités des enzymes codées par les gènes candidats, des plantes ont été transformées par une version doublement étiquetée des gènes afin de favoriser la purification des protéines par la méthode "TAP" (Tandem Affinity Purification). Ces protéines recombinantes, une fois purifiées, étaient mises en présence de substrats ARN *in vitro* pour contrôler qu'elle pouvaient palier les défauts de maturation identifiés dans les mutants.

Toutes les plantes transgéniques ont été produites par Dominique Gagliardi. Le travail que j'ai effectué dans l'article 2, correspond à la caractérisation moléculaire des défauts de maturation des ARN mitochondriaux dans les mutants.

III.2.4. Article 2

.../...

[signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

Romary Perrin, Etienne H. Meyer, Marlyse Zaepfel, Yean-Jung Kim, Régis Mache, Jean-Michel Grienenberger, José M. Gualberto, and Dominique Gagliardi

Two exoribonucleases act sequentially to process mature 3'-ends of *atp9* mRNAs in *Arabidopsis* Mitochondria.

The Journal of Biological Chemistry 279, 25440-25446 (2004)

Pages 25440-25446 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur

<http://www.jbc.org/cgi/reprint/279/24/25440.pdf>

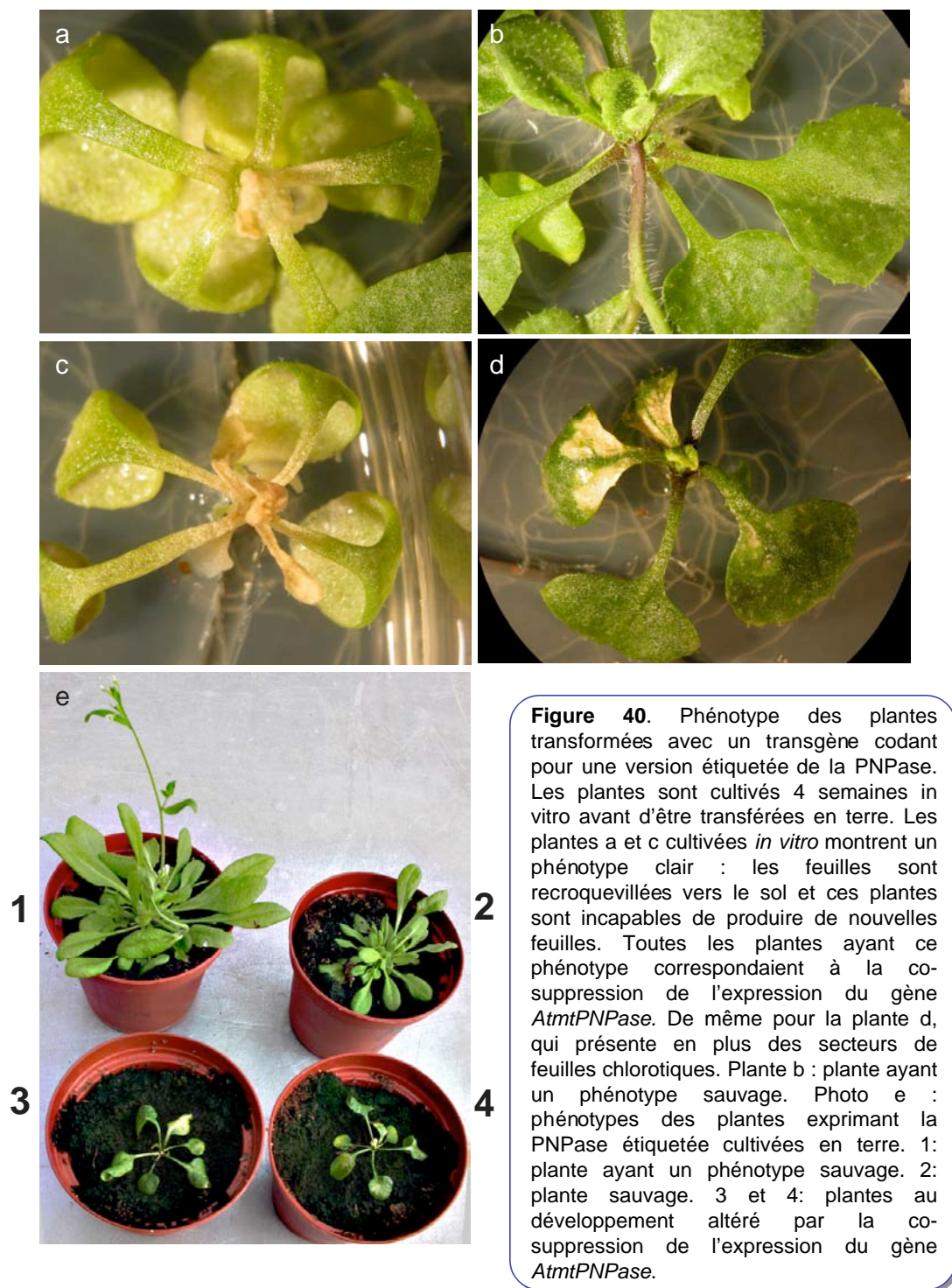
Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr.

III.2.5. Résultats complémentaires

III.2.5.1. Phénotype des plantes PNP-

Aucune plante homozygote n'a été obtenue pour l'insertion de T-DNA dans le gène At5g14580 qui code pour AtmtPNPase. Ce résultat suggère que AtmtPNPase est essentielle pour la viabilité d'*A. thaliana*. Pour modifier l'expression de ce gène, il était donc nécessaire d'induire son extinction à un stade tardif de développement. En observant la descendance de plantes transformées qui surexprimaient une version étiquetée de AtmtPNPase, certaines plantes montraient un phénotype facilement identifiable. Leur développement était altéré, après une phase de croissance normale, elles devenaient incapables de produire de nouvelles feuilles et les feuilles déjà existantes s'incurvaient vers le sol et présentaient des secteurs chlorotiques (**figure 40**). Après des analyses par western de l'expression de la protéine et des analyses par northern de l'expression du transcrite du gène AtmtPNPase, il a été clairement établi que ce phénotype correspondait dans ces plantes à la co-suppression de l'expression du transgène et du gène endogène codant pour AtmtPNPase.

Cependant, si ce phénotype n'était pas contrôlable, il était reproductible, et intervenait à des âges variables de la plante, soit dès la culture *in vitro*, soit lors de la culture en terre. Il nécessitait cependant un contrôle individuel de l'expression de AtPNPase pour chaque plante. L'analyse des transcrits mitochondriaux de ces plantes ont toutefois permis d'augmenter significativement les connaissances du rôle d'AtmtPNPase.



III.2.5.2. Phénotype des plantes mutantes *rnaII-1*

Les plantes homozygotes pour l'insertion du T-DNA dans le gène At5g02250 qui code pour AtmtRNaseII sont viables et présentent un développement sévèrement affecté. Les mutants *rnaII-1* ont un retard de germination et de croissance très important par rapport aux plantes sauvages (**figure 41**). Les cotylédons de ces mutants sont translucides et globuleux (**figure 41**), et, même après deux mois de croissance, les plantes ne développent pas de hampe florale (**figure 41**). Une analyse au microscope optique montre la différence d'organisation tissulaire dans les cotylédons entre les plantes sauvages et les plantes mutées (**figure 42**). Une analyse ultrastructurale avec un microscope électronique, montre que la biogenèse des chloroplastes est très affectée dans les mutants. En effet, les thylakoïdes ne sont pas structurés et il y a une accumulation de plastoglobules (**figure 42**). La production des images de microscopie optique et électronique a été effectuée par Mathieu Erardt à l'institut.

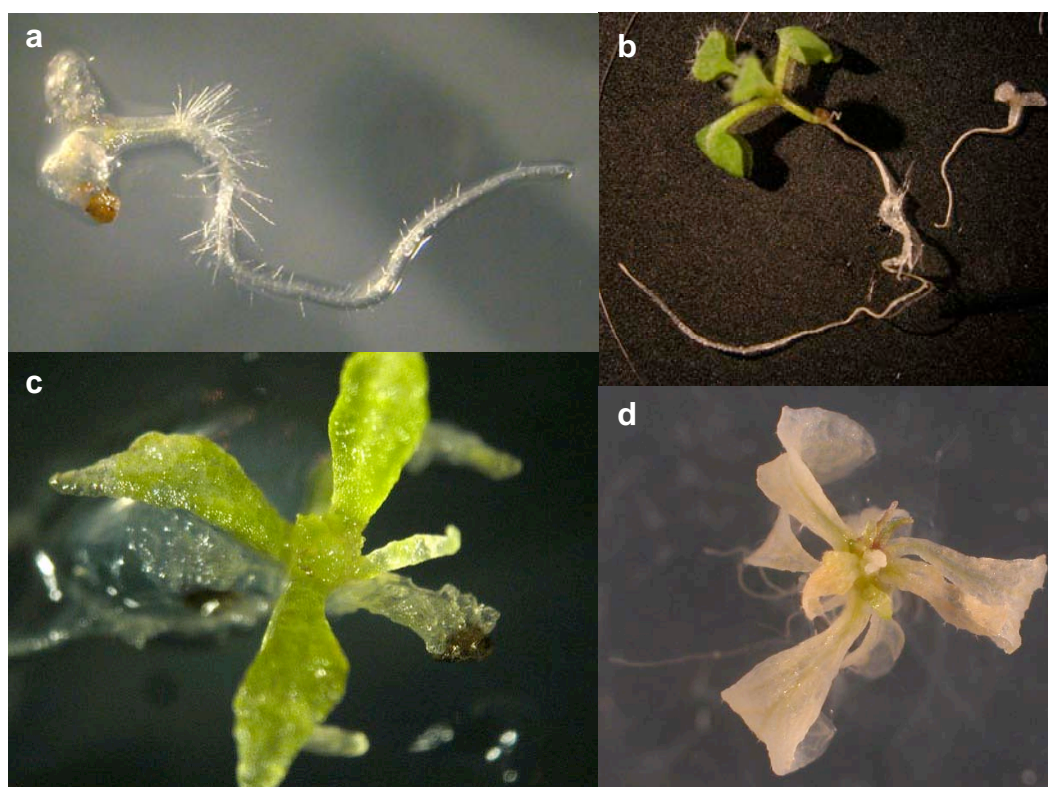


Figure 41. Phénotype morphologique des plantes *rnaII-1*. **a** plante *rnaII-1* âgée de trois semaines. **b** plante sauvage (droite) et plante *rnaII-1* (gauche) âgées de trois semaines. **c** plante *rnaII-1* âgée de 5 semaines. **d** plante *rnaII-1* âgée de 2 mois.

Ce phénotype est identique à celui observé pour deux autres lignées ayant des insertions distinctes dans le gène *AtmtRNaseII*. Cependant les bases moléculaires du phénotype de ces mutants d'insertion n'étaient pas établies lors de la rédaction de l'article 2. Bien qu'une affectation de la maturation des ARN du gène *atp9* ait été observée dans les mutants *rnall-1*, il n'était pas possible d'accorder la responsabilité de la totalité du phénotype à l'absence d'expression d'*AtmtRNaseII*. Des études complémentaires ont été menées au laboratoire par Heike Lange, en collaboration avec Thomas J. Bollenbach (Cornell University Ithaca, NY 14853). Ces études ont mis en évidence que la protéine *AtmtRNaseII* était doublement adressée à la mitochondrie et au chloroplaste. Des analyses des transcrits chloroplastiques ont montré que dans les mutants *rnall-1*, la maturation des ARN ribosomiques 23S, 16S et 5S était affectée. Ce défaut de maturation des ARN ribosomiques chloroplastiques pourrait être à l'origine d'une diminution de la traduction chloroplastique et de fait affecter le développement de la plante.

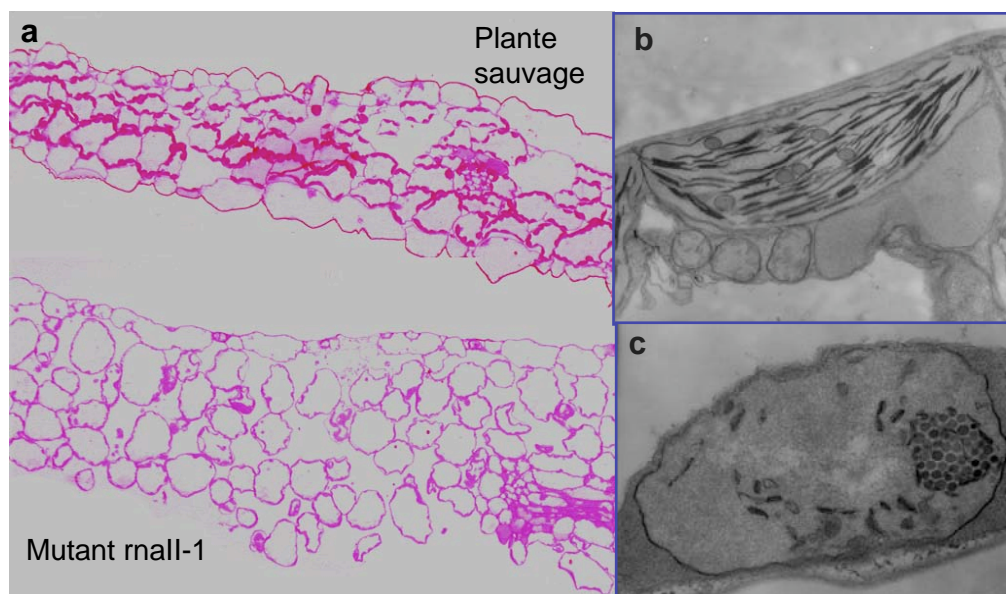


Figure 42. Phénotype cellulaire des plantes *rnall-1*. **a** coupes transversales de cotylédons teints au bleu de toluidine. **b** et **c** ultrastructures des chloroplastes étudiées par microscopie électronique de cotylédon de plante sauvage (6) et de plante mutée *rnall-1* (7).

III.2.5.3. Analyses moléculaires des ARN mitochondriaux des mutants

PNP-

III.2.5.3.1. Accumulation d'intermédiaires de dégradation des ARN d'*atp9* dans les plantes PNP-

Lors de l'analyse des sites de polyadénylation des transcrits du gène *atp9* de *S. tuberosum*, deux séquences correspondaient à des sites internes du début de l'orf (**figure 43**). De même, lors de l'analyse des sites de polyadénylation des transcrits du gène *atp9* chez *A. thaliana*, un site a été localisé au même nucléotide qu'un des sites identifiés pour *atp9* de *S. tuberosum*. Pour observer s'il y avait une variation de l'accumulation de tels fragments polyadénylés de transcrits du gène *atp9* chez les plantes PNP-, une expérience de RT-PCR a été conduite. En faisant migrer sur gel les produits d'amplification obtenus avec une amorce située en amont des sites de polyadénylation décrits ci-dessus et l'adaptateur correspondant à l'oligo-dT, on remarque une forte amplification du signal dans les plantes pour lesquelles l'expression de la PNPase est abolie. En obtenant les séquences de quelques produits d'amplification, on remarque que les sites de polyadénylation identifiés chez les plantes PNP- sont à proximité de ceux caractérisés précédemment chez *S. tuberosum* ou les plantes sauvages d'*A. thaliana*.

Ces fragments correspondent à des intermédiaires de dégradation des transcrits d'*atp9*. Ces intermédiaires s'accumulent donc dans les plantes où la AtmtPNPase ne s'exprime plus. Cependant, il n'est pas possible de distinguer l'origine de ces fragments. C'est à dire qu'ils peuvent être générés par une coupure endonucléolytique puis polyadénylés, ou être issus d'un décrochement de la PNPase dans cette région et être à nouveau polyadénylés.

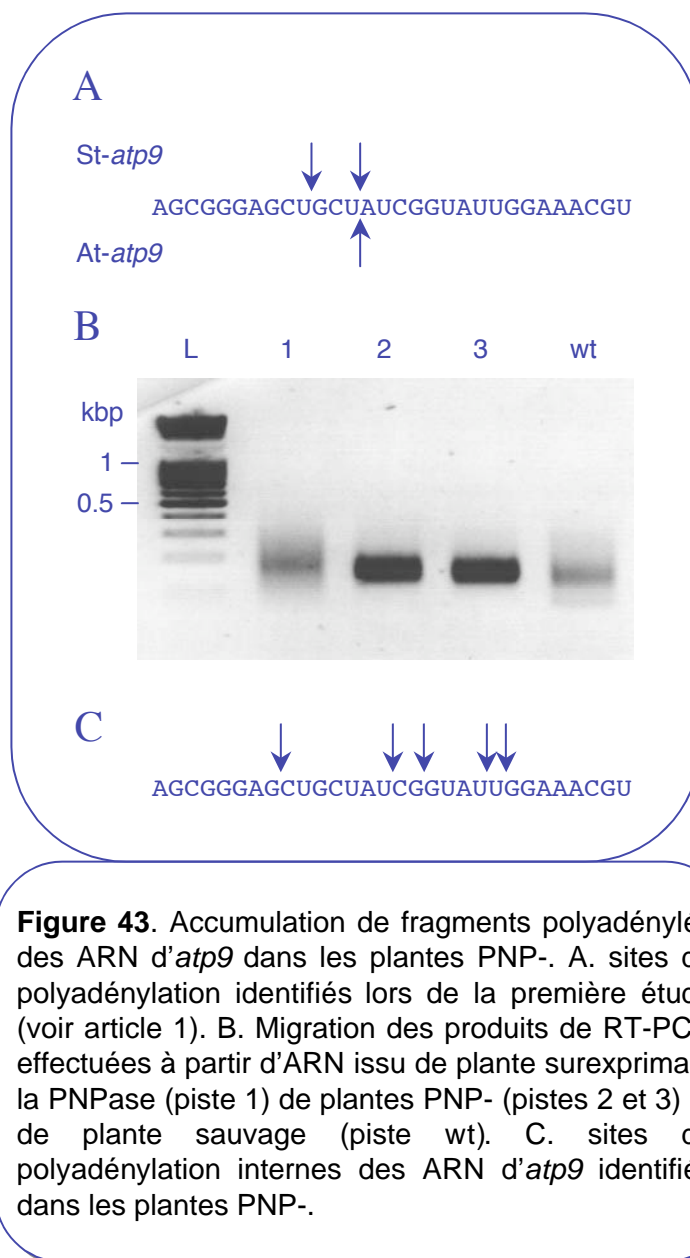


Figure 43. Accumulation de fragments polyadénylés des ARN d'*atp9* dans les plantes PNP-. A. sites de polyadénylation identifiés lors de la première étude (voir article 1). B. Migration des produits de RT-PCR effectuées à partir d'ARN issu de plante surexprimant la PNPase (piste 1) de plantes PNP- (pistes 2 et 3) et de plante sauvage (piste wt). C. sites de polyadénylation internes des ARN d'*atp9* identifiés dans les plantes PNP-.

III.2.5.4. Schéma des rôles de AtmtPNPase et AtmtRNaseII dans la maturation des ARN mitochondriaux

A partir des données de l'article 2, un modèle de la maturation des ARN messagers mitochondriaux de plante a été imaginé. Il est présenté sur la **figure 44**.

Dans l'article précédent, nous avons montré que la polyadénylation jouait un rôle dans un mécanisme de dégradation des ARN messagers de la mitochondrie végétale. Or, il est vraisemblable, du fait de l'importance de la PNPase dans l'élimination des séquen-

ces transcrites “superflues”, que la polyadénylation ait aussi un rôle dans la maturation des transcrits mitochondriaux d’*A. thaliana*.

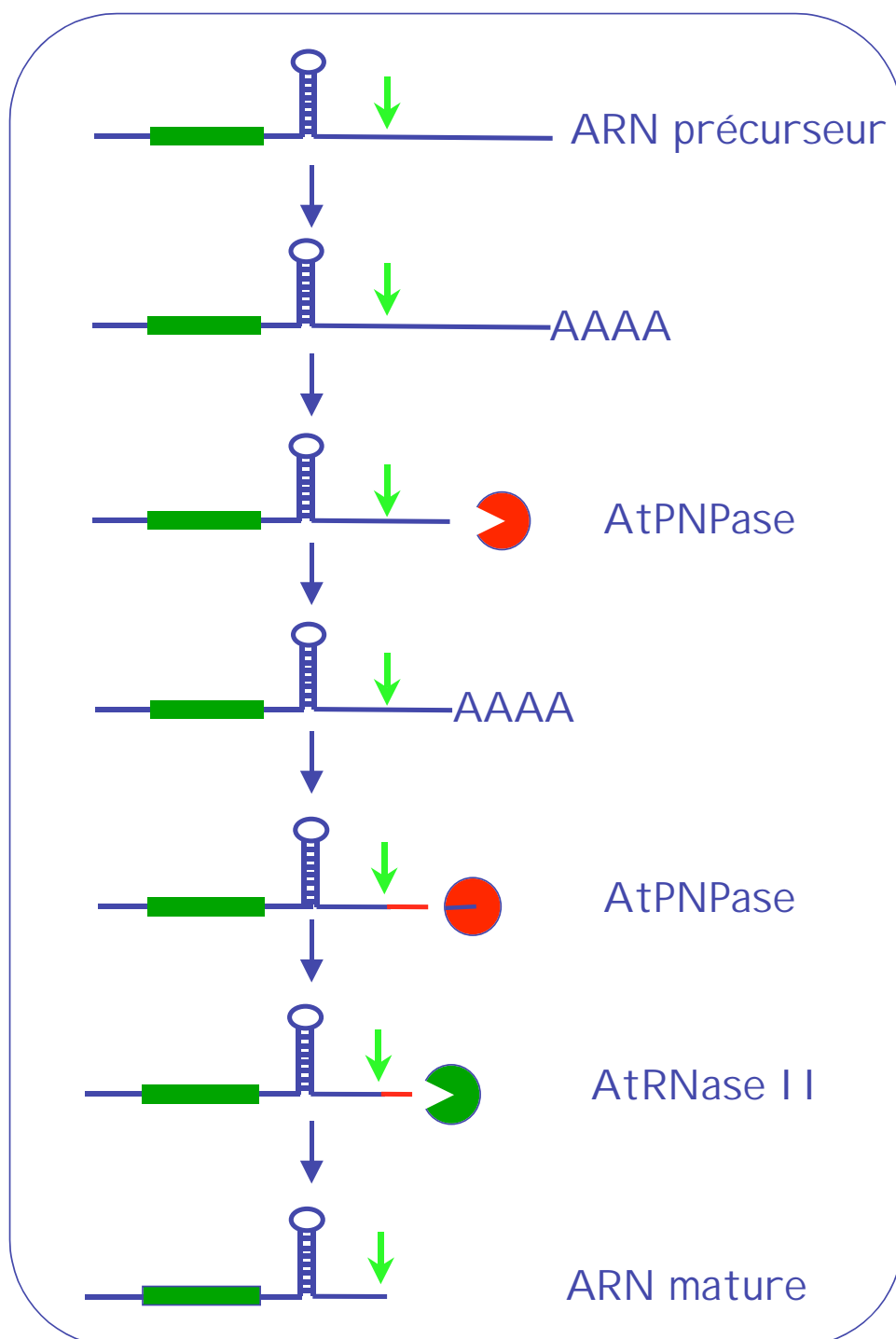


Figure 44. Schéma du rôle d’AtPNPase et d’AtRNase II dans la maturation des ARN messagers mitochondriaux d’*A. thaliana*. De longs ARNs précurseurs sont synthétisés, puis polyadénylés à leur extrémité 3’. Plusieurs cycles de polyadénylation et de digestion exonucléolytique peuvent être nécessaires pour éliminer la grande extension en 3’. Enfin, AtRNase II achève la maturation en éliminant quelques nucléotides en 3’ pour parvenir aux extrémités 3’ matures désignées par la flèche verte verticale.

III.3. AtmtPNPase est requise pour de multiples aspects du métabolisme de l'ARNr 18S chez les mitochondries d'*Arabidopsis thaliana*

III.3.1. Introduction

Pourquoi rechercher des ARN ribosomiques polyadénylés ? Il existe plusieurs arguments pour soutenir cette question. Le premier intérêt est de déterminer si la polyadénylation est exclusivement réservée à la dégradation des ARNm ou si elle peut tenir d'autres rôles dans le métabolisme des ARN mitochondriaux et en premier lieu si elle concerne d'autres classes d'ARN dit stables comme les ARN ribosomiques. Par ailleurs, le choix de la cible a été primordial pour compléter l'analyse du rôle de la polyadénylation dans les mitochondries de plante. En effet, nous avons vu au chapitre précédent que la polyadénylation pouvait être essentielle à la maturation de grands précurseurs pour les ARNm. Était-il possible que la polyadénylation joue aussi un rôle dans la maturation des ARN ribosomiques ? Afin de répondre à cette question, nous avons choisi d'analyser l'état de polyadénylation des transcrits issus du locus codant pour les ARN ribosomiques 18S et 5S. En effet, ces ARN dans toutes les plantes analysées à ce jour se présentent sous la forme d'un co-transcrit, le 18S et le 5S étant séparés par une région intergénique d'environ 170 nt. L'élimination de cette séquence fait partie intégrante de la maturation de ces ARNr. La question de départ était de savoir si la polyadénylation prenait part à l'élimination de cette région intergénique.

La recherche d'ARN ribosomiques polyadénylés chez *S. tuberosum* a débuté en même temps que la recherche d'ARNm polyadénylés. La première identification d'un ARNr polyadénylé chez *S. tuberosum* a été freinée par le fait qu'il existait une région riche en A directement en aval de l'extrémité 3' mature du 5S (voir **figure 34**). La région intergénique qui sépare le 18S et le 5S est d'environ 170 nt. Donc, même en utilisant des

amorces placées dans le 18S, le fragment le plus favorablement amplifié correspondait toujours à l'hybridation de l'oligo-dT dans la région riche en A en 3' du 5S. Ce produit d'amplification provient donc des précurseurs du 18S-5S. Pour parvenir à identifier des sites de polyadénylation entre le 18S et le 5S chez *S. tuberosum*, il a fallu cloner des produits d'amplification de plus petite taille que le produit principal d'amplification en sélectionnant les parties de gels situées sous le produit principal d'amplification. Une importante mise au point et la définition de nouvelles amorces a aussi été nécessaire pour augmenter la spécificité d'amplification des fragments polyadénylés des précurseurs du 18S.

La **figure 45** présente les sites de polyadénylation identifiés pour le co-transcrit 18S-5S chez *S. tuberosum*. L'image présentée figure 45.b a été obtenue après une optimisation importante de la RT-PCR et le design d'amorces spécifiques permettant l'amplification de transcrits du locus 18S-5S uniquement. Le clonage de la totalité des produits d'amplification a permis le séquençage de 51 clones correspondant à des sites de polyadénylation de l'unité de transcription 18S-5S. Parmi les séquences obtenues, quatorze correspondent à l'hybridation de l'oligod(T)₁₂ dans la région riche en A codée par le génome en aval de l'extrémité 3' du 5S (**figure 45 c.**). Cinq séquences correspondent à des sites internes de polyadénylation du 18S, ce qui suggère que la polyadénylation est impliquée dans le processus de dégradation de cet ARNr. Vingt-huit séquences correspondent à des sites de polyadénylation situés aux extrémités 3' matures du 18S, et représentent 75% des séquences obtenues si l'on ne tient pas compte des 14 clones correspondant à l'hybridation de l'oligod(T)₁₂ dans la région riche en A.

Cette situation est assez similaire à celle observée pour la polyadénylation des transcrits du gène *atp9* de *S. tuberosum*. De manière très intéressante, deux séquences correspondent à des sites de polyadénylation situés dans la région intergénique, et pourraient correspondre soit à des intermédiaires de dégradation de précurseurs du 18S surnuméraires, soit à des intermédiaires de maturation du 18S. Dans les deux cas, cela étend les fonctions de la polyadénylation dans la mitochondrie végétale. Enfin, deux séquences

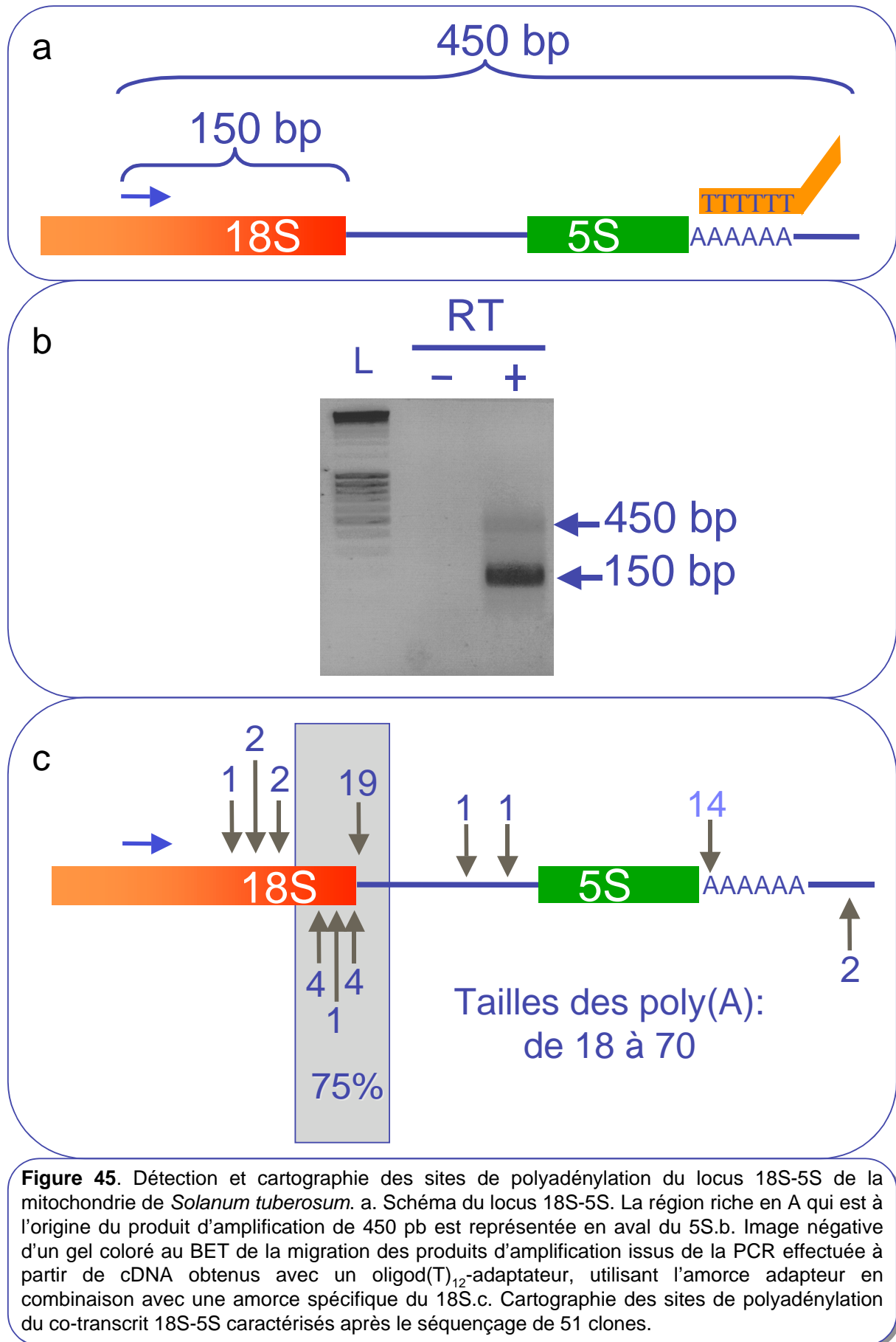
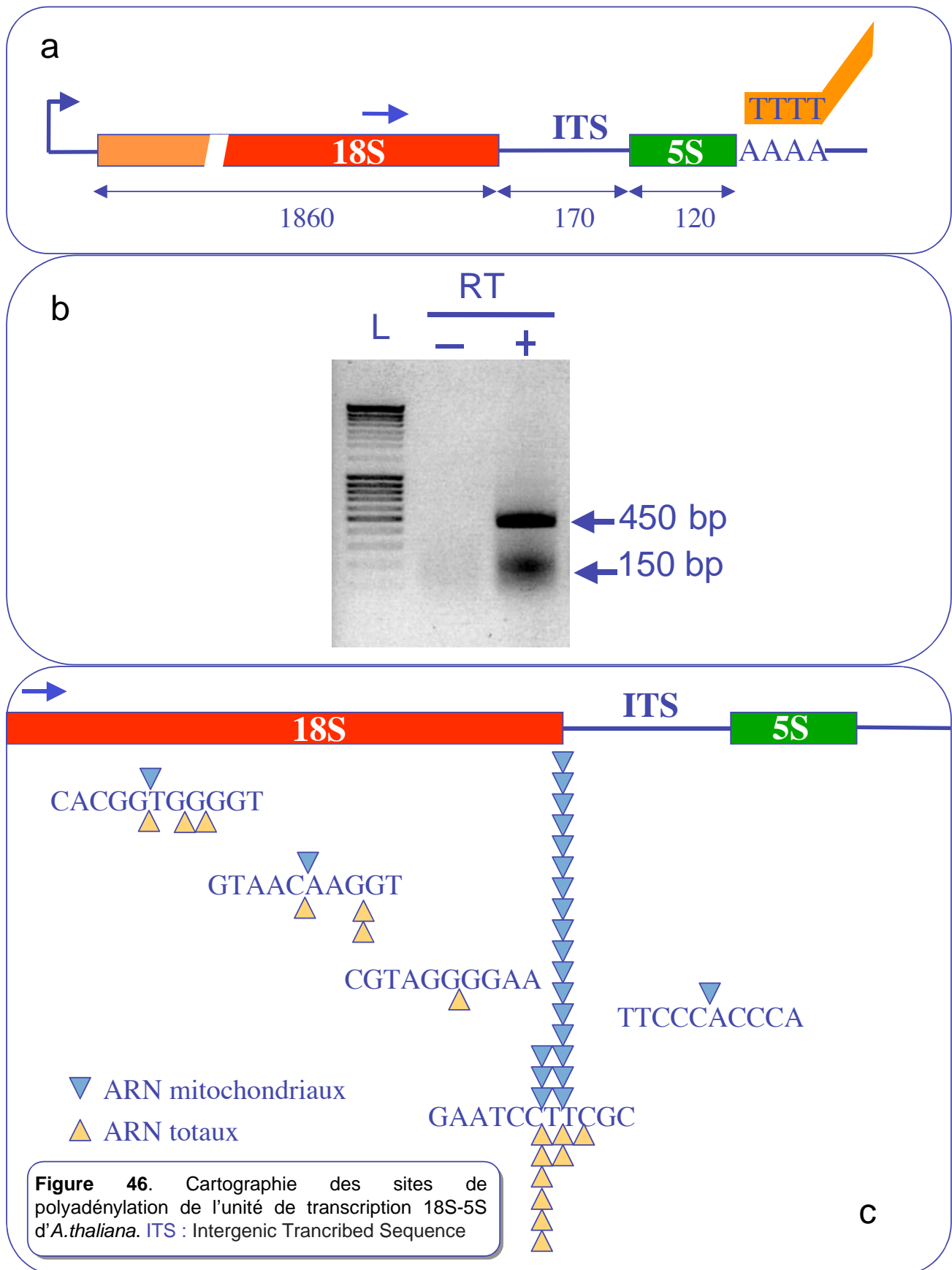


Figure 45. Détection et cartographie des sites de polyadénylation du locus 18S-5S de la mitochondrie de *Solanum tuberosum*. a. Schéma du locus 18S-5S. La région riche en A qui est à l'origine du produit d'amplification de 450 pb est représentée en aval du 5S. b. Image négative d'un gel coloré au BET de la migration des produits d'amplification issus de la PCR effectuée à partir de cDNA obtenus avec un oligod(T)₁₂-adaptateur, utilisant l'amorce adaptateur en combinaison avec une amorce spécifique du 18S. c. Cartographie des sites de polyadénylation du co-transcrit 18S-5S caractérisés après le séquençage de 51 clones.

correspondent à des sites de polyadénylation identifiés en aval de la région riche en A en 3' du 5S. Ces deux sites de polyadénylation rappellent la situation des grands transcrits polyadénylés identifiés dans les plantes PNP-. Ces deux sites suggèrent que la maturation en 3' du 5S pourrait nécessiter la polyadénylation.

Cette même expérience a été transposée chez la mitochondrie d'*Arabidopsis* avec succès. En effet, après la caractérisation des mutants pour les exonucléases AtmtRNAse II et AtmtPNPase, il était intéressant d'observer les différences de maturation et de dégradation des ARN ribosomiques dans ces mutants par rapport au sauvage. Ainsi, l'état de polyadénylation des transcrits du locus 18S-5S a été caractérisé en premier lieu dans les mitochondries d'*Arabidopsis* sauvages avec des ARN issus de plantes entières et des ARN issus de mitochondries purifiées à partir de cellules d'*Arabidopsis* en culture. Il est intéressant de noter que toutes les études effectuées chez *S. tuberosum*, étaient faites à partir d'ARN isolés de mitochondries purifiées. Alors, qu'avec *Arabidopsis*, la plupart des expériences ont été menées avec des ARN totaux issus souvent de plantules entières. Cette contrainte technique n'a pas réellement posé de problème grâce à l'abondance des co-transcrits 18S-5S mitochondriaux et à la spécificité des amorces définies.

La même expérience a donc été menée sur des ARN issus de plantules d'*Arabidopsis* et d'ARN extraits de mitochondries purifiées à partir de cellules d'*Arabidopsis* en culture. Une image négative d'un gel représentatif de la migration du produit de la RT-PCR effectuée avec une amorce spécifique du 18S couplée à l'amorce identique à l'adaptateur de l'oligod(T)₁₂-adaptateur est présentée **figure 46 b**. Le résultat est proche de celui obtenu avec les ARN extraits de mitochondries de *S. tuberosum*, où est observé un produit majoritaire de 450 pb qui correspond à l'hybridation de l'oligodT dans la région riche en A, en aval du 5S. Une bande plus diffuse est observée à 150 pb qui correspond à tous les sites de polyadénylation situés entre l'amorce spécifique du 18S et le 5S. Un schéma qui représente les sites de polyadénylation identifiés pour le co-transcrit 18S-5S d'*Arabidopsis*



est montré **figure 46 c**. Les triangles bleus avec une pointe vers le bas correspondent aux sites identifiés à partir d'ARN extraits de mitochondries isolées d'une culture cellulaire d'*Arabidopsis*; les triangles jaunes avec une pointe vers le haut correspondent aux sites de polyadénylation identifiés à partir d'ARN extraits de plantes d'*Arabidopsis*. Les résultats obtenus sont très comparables à ceux obtenus pour les ARN extraits de mitochondries de *S. tuberosum*. La majorité des sites de polyadénylation se situent aux extrémités 3' matures du 18S. Certains sites sont internes au 18S, représentant des intermédiaires de dégradation du 18S, ce qui suggère une implication de la polyadénylation dans le processus de dégradation de cet ARN ribosomique. Un site a été identifié dans l'ITS (Intergenic Transcribed Sequence), qui suggère de même un rôle possible pour la polyadénylation dans l'élimination de cette jonction entre le 18S et le 5S. En revanche, aucun site n'a été identifié en aval de la région riche en A en 3' du 5S.

Après la caractérisation de l'état de polyadénylation du co-transcrit 18S-5S dans la plante sauvage d'*Arabidopsis*, il était intéressant de faire la même expérimentation avec des ARN extraits des plantes PNP-. De plus, l'objectif de cet axe de recherche était de rassembler le plus d'informations possibles sur la maturation et la dégradation des ARN ribosomiques de la mitochondrie végétale puisque aucun système *in vitro* n'avait jusqu'à présent été mis au point pour la maturation des ARN ribosomiques. L'étude complète de l'implication de la polyadénylation dans la maturation et la dégradation de l'ARN 18S d'*Arabidopsis* est présentée dans l'article 3.

III.3.2. Article 3



[signalé bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

Romary Perrin, Heike Lange, Jean-Michel Grienenberger, and Dominique Gagliardi
AtmtPNase is required for multiple aspects of the 18S rRNA metabolism in
***Arabidopsis thaliana* mitochondria.**

Nucleic acids research 32, 5174-5182 (2004)

Pages 5174-5182 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

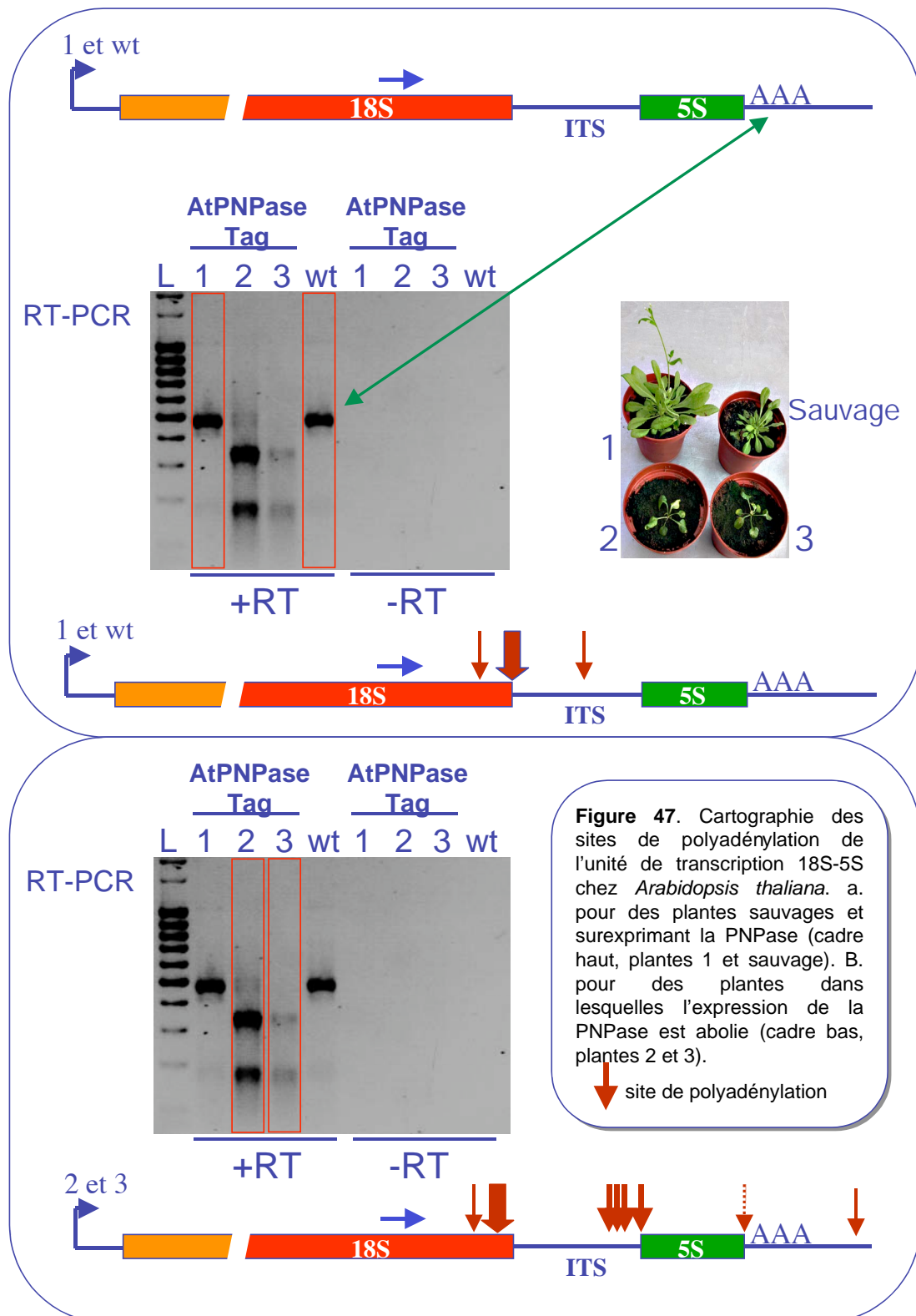
Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur

<http://nar.oxfordjournals.org/cgi/reprint/32/17/5174.pdf>

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr.

III.3.3. Retour sur la cartographie des sites de polyadénylation de l'unité de transcription 18S-5S chez Arabidopsis thaliana dans les plantes sauvages et les plantes PNP-

La **figure 47** présente la schématisation des sites de polyadénylation identifiés pour des plantes sauvages, des plantes surexprimant la PNPase mais présentant un phénotype normal (cadre haut figure 47) et des plantes PNP- pour lesquelles l'expression de la PNPase est abolie (cadre bas figure 47). Le profil de polyadénylation de ces plantes est très différent. Alors que dans les premières, la majorité des sites de polyadénylation se trouve aux extrémités 3' matures du 18S, aucun site correspondant n'a été identifié dans les plantes PNP-. Ceci peut être expliqué par le fait qu'en l'absence de PNPase, aucun transcrit 18S n'est mûré correctement. Une autre différence majeure est l'accumulation de précurseurs du 18S polyadénylés dans la partie 5' de l'ITS dans les plantes PNP-. Cette accumulation est telle qu'avec les ARN extraits des plantes PNP-, l'oligoDT ne s'hybride pratiquement plus dans la région riche en A en aval du 5S, alors que le produit d'amplification correspondant à cette hybridation pour les plantes au phénotype sauvage est clairement le produit majoritaire. La figure 47 complète et appuie les résultats présentés sur la figure 3 de l'article 3.



III.3.4. Résultats complémentaires

III.3.4.1. Redéfinition de l'initiation de la transcription de l'ARN ribosomique 18S chez *Arabidopsis thaliana*

Nous avons montré que dans les plantes PNP-, la séquence leader du 18S s'accumulait et que ce fragment issu de la maturation du 18S pouvait être polyadénylé (figure 6 article 3). Dans une publication de 1996 (Giese *et al.* 1996), le début de la transcription avait été situé à 69 nucléotides en amont de l'extrémité 5' mature du 18S par extension d'amorce. Pourtant sur la figure correspondant à cette expérience, une bande était présente à la bonne taille. Mais les auteurs croyaient que ce produit résultait d'une hybridation aspécifique de l'amorce. Or le northern effectué avec une sonde située juste en amont de l'extrémité 5' mature du 18S révèle l'accumulation d'un fragment d'une taille d'environ 140 nucléotides correspondant exactement à cette bande prise au départ pour un artefact. Pour définir le premier nucléotide transcrit de la séquence leader du 18S, une cRT-PCR particulière a été effectuée. Avant l'étape de ligation des ARN par la T4 RNA ligase, une étape de déphosphorylation avec la CIP pour enlever les trois phosphates du premier nucléotide, puis une étape de phosphorylation avec la PNK pour ajouter un phosphate indispensable à l'action de la T4 RNA ligase ont été effectuées. Après amplification, clonage et séquençage, l'extrémité 5' et l'extrémité 3' de la séquence leader du 18S ont pu être définies. Les résultats de cette expérience sont schématisés **figure 48**. De manière intéressante, le motif nucléotidique qui est en amont du premier nucléotide transcrit est plus proche du motif consensus du promoteur de la transcription défini pour le génome de la mitochondrie de maïs (monocotylédone) que du motif consensus défini pour les dicotylédones. Cette expérience a permis de redéfinir l'initiation de la transcription pour le locus 18S-5S de la mitochondrie d'*Arabidopsis thaliana*. Dans une étude récente des promoteurs des gènes mitochondriaux d'*Arabidopsis*, le site d'initiation de la transcription

est déterminé deux nucléotides en amont du site décrit dans la **figure 48** (Kuhn *et al* 2005).

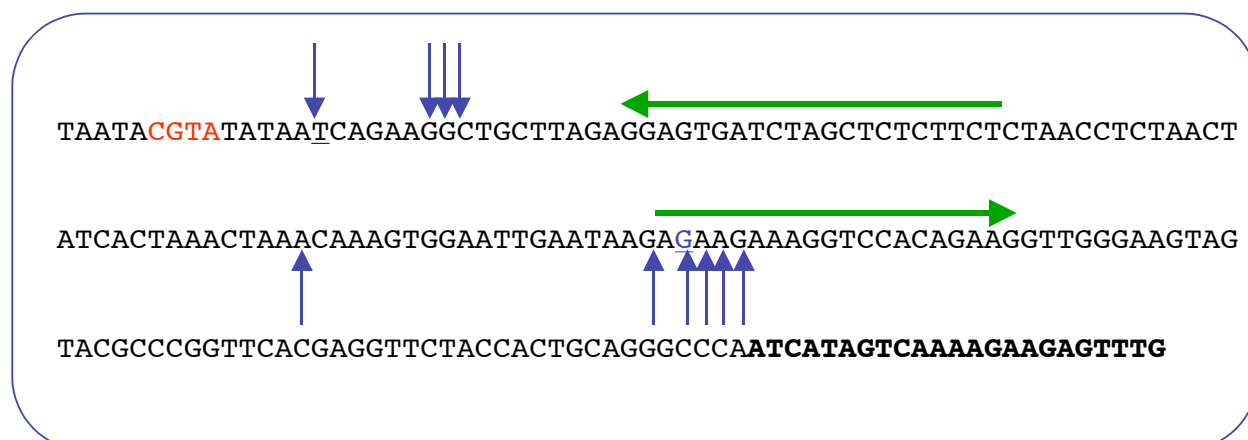
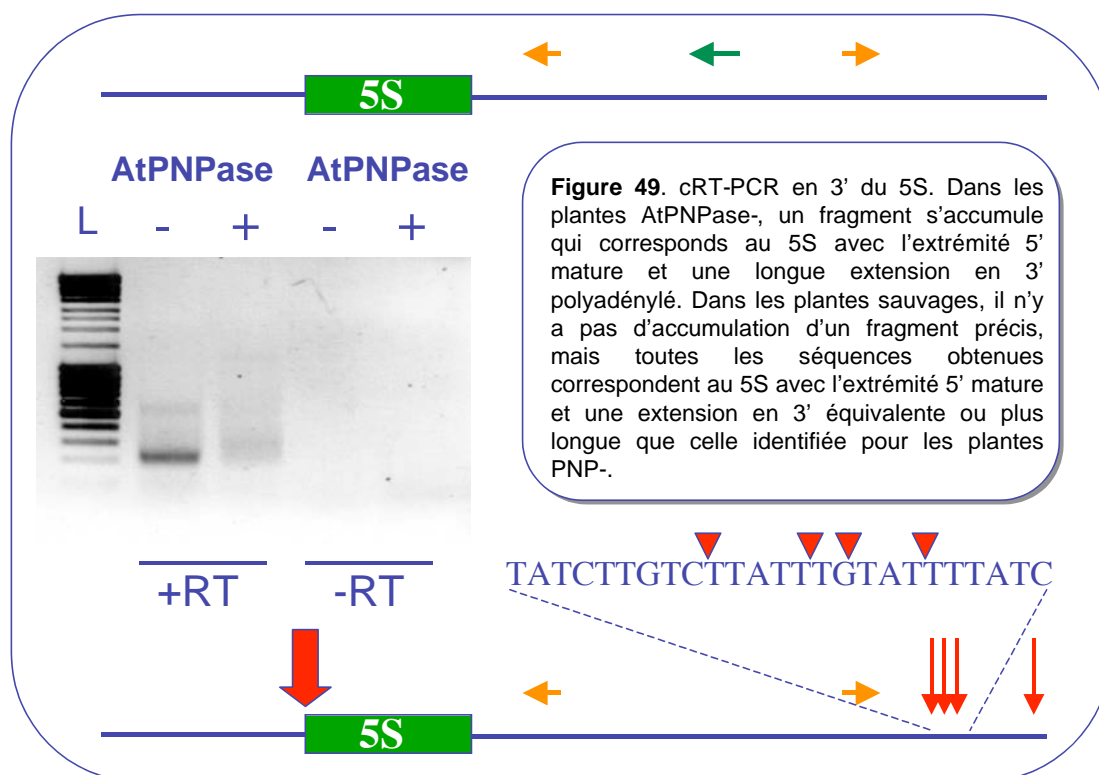


Figure 48. Définition du premier nucléotide transcrit de la séquence leader du 18S chez *Arabidopsis thaliana*. Les amorces qui ont servi à l'amplification sont représentées par des flèches vertes horizontales. Les extrémités 5' de la séquence leader du 18S identifiées par la cRT-PCR sont représentées par des flèches bleues vers le bas. Les extrémités 3' du fragment leader du 18S sont représentés par des flèches bleues vers le haut. Le premier nucléotide transcrit est souligné en noir. Le premier nucléotide transcrit comme défini précédemment dans l'article de Giese *et al* est bleu, souligné bleu. En gras, l'extrémité 5' du 18S mature. A noter, en rouge les nucléotides en amont du site d'initiation de la transcription, un motif nucléotidique correspondant au consensus du promoteur mitochondrial chez les monocotylédones (voir introduction, figure 7).

III.3.4.2. L'extrémité 3' du 5S serait générée par une activité exonucléase

L'accumulation du précurseur du 18S comprenant la majorité de l'ITS dans les plantes PNP- invitait à penser que l'extrémité 5' du 5S était générée par une endonucléase. Afin de déterminer comment l'extrémité 3' du 5S pouvait être générée, une autre cRT-PCR fut effectuée en 3' du 5S. Cette expérience est schématisée **figure 49**. Les résultats obtenus montrent une accumulation d'un fragment correspondant au 5S avec l'extrémité 5' mature et avec une longue extension polyadénylée en 3' dans les plantes PNP-. Dans les plantes sauvages, il n'y a pas d'accumulation de fragments précis, mais toutes les séquences obtenues contiennent le 5S avec l'extrémité 5' mature et une longue extension en 3'. Ces résultats complètent le puzzle de la maturation du co-transcrit 18S-5S et indi-

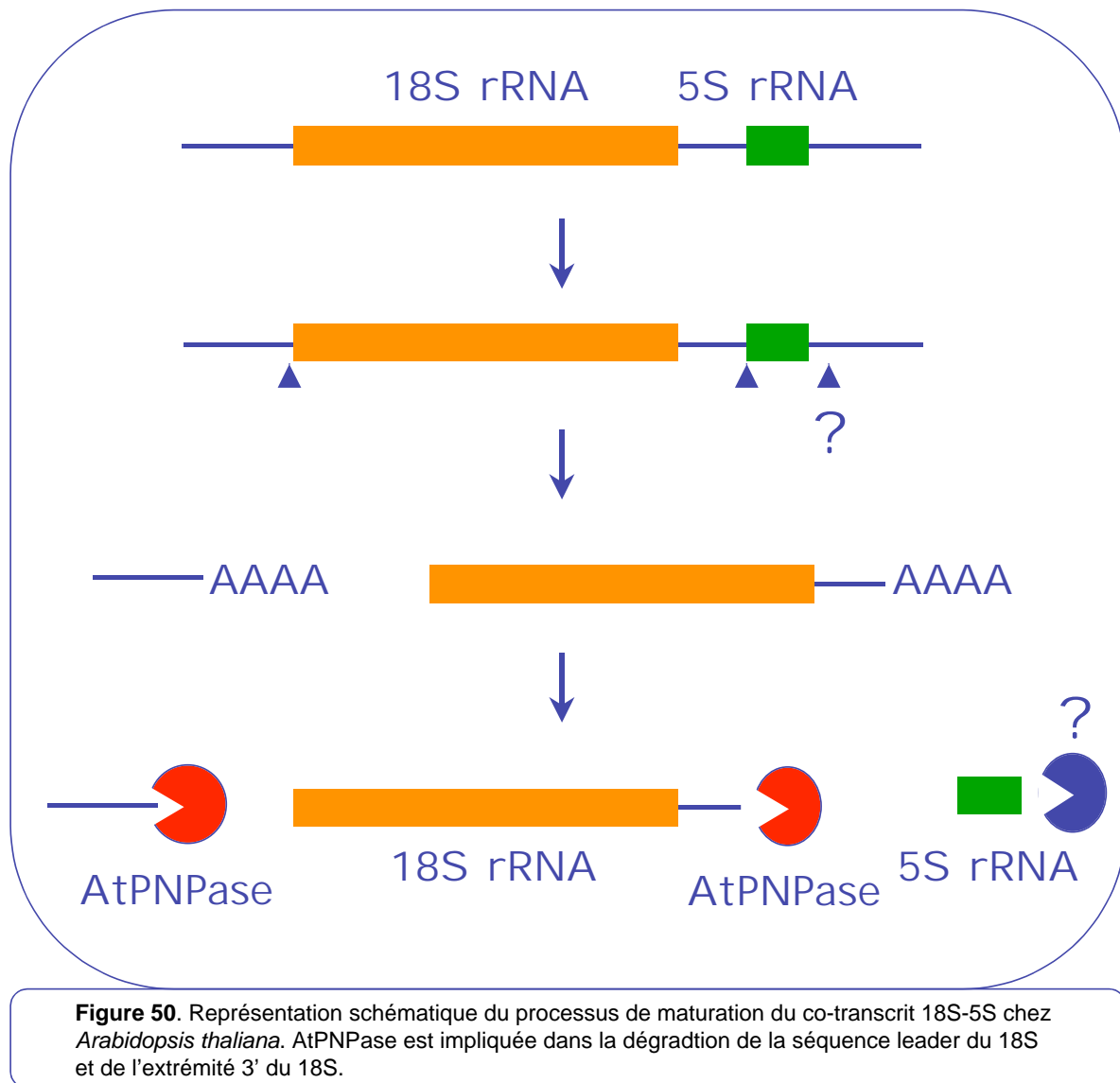
quent donc que l'extrémité 5' du 5S est bien générée par une endonucléase. En synthétisant du cDNA avec une amorce située loin en 3' de l'extrémité 3' du 5S, toutes les séquences obtenues contiennent le 5S entier. En effet, parmi les séquences obtenues aucune n'a d'extrémité 5' en amont de l'extrémité 3' du 5S. Il semble donc qu'aucune coupure endonucléolytique n'intervienne pour produire l'extrémité 3' du 5S de la mitochondrie d'*A. thaliana*. Ces résultats suggèrent que l'extrémité 3' du 5S serait générée de manière exonucléasique.



III.3.4.3. Schématisation de l'ensemble des résultats obtenus pour le co-transcrit 18S-5S chez *Arabidopsis thaliana*

Pour résumer les résultats obtenus pour le co-transcrit 18S-5S chez *Arabidopsis thaliana* un schéma est présenté **figure 50**. En premier lieu, des coupures endonucléolytiques situées aux extrémités 5' matures du 18S et du 5S séparent la séquence leader et le 5S du précurseur du 18S. Puis les extrémités 3' des fragments ainsi générés sont polyadénylées. Ce qui a pour conséquence de recruter AtPNPase. AtPNPase est impliquée dans la dé-

gradation de la séquence leader et de l'ITS. Mais la polyadénylation du précurseur du 18S est peut-être aussi suffisante pour déclencher sa dégradation entière. Il est fort probable que la maturation en 3' du 5S soit effectuée par la PNPase. Enfin, AtPNPase est impliquée dans la destruction du 18S mature. Il n'est pas possible d'affirmer que AtPNPase est l'unique responsable de ces processus. Elle peut être associée à d'autres protéines comme des hélicases.



IV. DISCUSSION

IV.1.Introduction

Cette thèse avait pour projet de contribuer à l'étude des mécanismes de dégradation des ARN de la mitochondrie végétale. L'expression d'un génome est conditionnée en partie par le contrôle de la quantité de transcrits traduisibles à un instant donné. Cette quantité de transcrits d'un gène dépend d'une part de l'efficacité de sa synthèse et de sa maturation, et d'autre part de sa stabilité. Comme l'expression du génome mitochondrial de plante n'est pratiquement pas régulée au niveau transcriptionnel (Giege *et al.* 2000; Leino *et al.* 2005), nous souhaitons avancer dans la connaissance des déterminants de la stabilité des ARN chez la mitochondrie de plante. En particulier, nous espérons par cette étude identifier des signaux qui influent sur la stabilité des ARN mitochondriaux de plante et des protéines impliquées dans leur dégradation. En effet, très peu d'informations étaient disponibles concernant ce mécanisme dans la mitochondrie végétale en comparaison avec les nombreuses études effectuées chez *E. coli*, le chloroplaste ou chez la levure dans le cas du mécanisme de dégradation des ARN messagers codés par le génome nucléaire.

IV.2.La polyadénylation est un signal suffisant pour déclencher une voie de dégradation exonucléolytique des ARN messagers dans la mitochondrie de plante.

Le rôle de la polyadénylation dans la dégradation des ARN a été mis en évidence en premier chez *E. coli* (Hajnsdorf *et al.* 1995; O'Hara *et al.* 1995; Xu et Cohen 1995). Puis les investigations qui ont été faites chez le chloroplaste ont révélé également un rôle de la polyadénylation dans la dégradation des ARN chez cet organe de plante (Kudla *et al.* 1996; Lisitsky *et al.* 1996). Ces découvertes successives ont conduit plusieurs équipes à s'interroger sur la présence et la fonction éventuelle de la polyadénylation chez la mitochondrie végétale. Trois publications antérieures ou simultanées à la première étude pré-

sentée dans ce travail de thèse concernaient la caractérisation d'ARN polyadénylés et l'étude fonctionnelle de la polyadénylation chez la mitochondrie végétale (Gagliardi et Leaver 1999; Lupold *et al.* 1999; Kuhn *et al.* 2001).

Le premier lien entre l'augmentation de la polyadénylation d'un ARN mitochondrial de plante et l'augmentation de son instabilité a été établi en 1999 (Gagliardi et Leaver 1999). Dans cette étude, une activité RNase mitochondriale capable de dégrader préférentiellement des ARN polyadénylés, a été mise en évidence chez le tournesol. Elle est présente à la fois chez le tournesol et la pomme de terre et est capable de dégrader préférentiellement des ARN polyadénylés. Cette étude montrait pour la première fois qu'un transcrite mitochondrial de plante pouvait être polyadénylé et que cette polyadénylation entraînait sa destabilisation *in vitro* et *in vivo*. De plus cette étude montrait que la stabilité d'un transcrite mitochondrial dépendait d'un facteur nucléaire. Cette destabilisation préférentielle de transcrits polyadénylés est régulée suivant le stade de développement et le tissu considérés.

Cependant, cette étude avait pour objet un substrat qui correspondait à un gène chimérique résultant d'une recombinaison. Cette recombinaison a été identifiée dans le cadre d'un système bien particulier de CMS chez le tournesol. Il était toutefois possible que ce qui se produisait dans ce cas particulier ne fut pas généralisable à l'ensemble des transcrits mitochondriaux. Pour valider l'existence d'un mécanisme de dégradation des ARN poly(A)-dépendant dans les mitochondries de plante, il était donc indispensable d'étudier la dégradation d'ARN correspondant à des gènes "classiques" présents dans tous les génomes mitochondriaux de plante.

Trois études distinctes ont eu pour objet la caractérisation chez les plantes de la polyadénylation de transcrits issus de gènes mitochondriaux "classiques". Ces études ont porté sur : *cox2* de maïs (Lupold *et al.* 1999), *atp9* de pois, *atp1* d'oenothère (Kuhn *et al.* 2001), et *atp9* de pomme de terre (Gagliardi *et al.* 2001). De plus, un système *in vitro* de dégradation des ARN a été développé dans chaque cas pour étudier le rôle fonctionnel de la polyadénylation dans cet organite. La première étape commune à toutes les études

a été de détecter et de cartographier les sites de polyadénylation des transcrits du gène cible.

IV.3. Cartographie des sites de polyadénylation

Dans l'étude concernant les transcrits de *atpA-orf522*, la détection des sites de polyadénylation a été effectuée par RT-PCR avec un oligod(T)₁₈-adaptateur. La PCR de 30 cycles a été faite avec une amorce située en 3' d'*orf522* en combinaison avec l'adaptateur. Il en résulte un produit majeur d'amplification de 190 nt. Après clonage et séquençage, 20 clones présentaient une extension de 17 à 21 A (correspondant approximativement à la longueur de l'oligod(T) utilisé), très majoritairement situées aux abords des extrémités 3' matures (19 clones sont localisés dans une fenêtre de 12 nt entourant les extrémités 3' matures cartographiées par protection à la RNase).

Dans l'étude concernant la polyadénylation des transcrits du gène *cox2* de maïs, la même méthode a été utilisée pour la cartographie des sites de polyadénylation. Mais la PCR effectuée avec une amorce située en 5' de l'exon 2 de *cox2* génère deux produits majoritaires de 400 et 700 pb, après 50 cycles d'amplification. Après clonage, 60 clones ont été analysés. La moitié des sites de polyadénylation est répartie de manière aléatoire le long de l'ARN étudié. L'autre moitié des clones est répartie en deux sites majoritaire dont l'un correspond aux extrémités 3' cartographiées par protection à la nucléase S1, et représente 42% des séquences obtenues. La séquence génomique des deux sites majoritaires est connue et permet d'affirmer qu'il s'agit de sites de polyadénylation réels. Cependant, la séquence génomique complète du gène *cox2* de maïs n'était pas connue. Il était donc impossible de savoir si les autres sites répartis sur toute la séquence étaient des sites de polyadénylation réels ou correspondaient à l'hybridation de l'oligodT dans une région riche en A codée par le génome. De ce fait, le nombre et la répartition des sites de polyadénylation dans la partie 3' UTR du gène *cox2* de maïs pouvait ne pas refléter la situation réelle. La séquence génomique du gène *cox2* de maïs est disponible depuis avril 2005

dans la banque de données GenBank ([AY973492](#)). L'observation de la séquence publiée permet de constater la présence d'au moins trois sites riches en A dans la partie étudiée par les auteurs où l'oligodT aurait pu s'hybrider.

Dans l'étude de la présence et de la fonction de nucléotides non codés par le génome en 3' des transcrits d'*atp9* de pois et *atp1* d'oenothère, les sites de polyadénylation ont été cartographiés après deux amplifications de 35 cycles. Un profil d'amplification complexe est obtenu après migration des produits sur gel. Il est probable que cette méthode compliquée augmente la possibilité d'artefacts d'expérimentation et fausse la situation présente *in vivo*. Cependant, l'analyse de la séquence de 18 clones indique la présence d'extensions poly(A) qui ne sont pas codées par le génome à l'extrémité 3' des transcrits du gène *atp9* de pois. Ces sites de polyadénylation, localisés, soit en aval, soit à des sites internes de la seconde tige-boucle potentielle, correspondent aux extrémités 3' cartographiées par protection à la nucléase. Pour les transcrits du gène *atp1* d'oenothère, 10 séquences ont été obtenues. La plupart des sites de polyadénylation sont localisés directement en 3' de la structure en double tige-boucle et correspondent aux extrémités 3' matures précédemment cartographiées.

Les études précédentes analysaient la présence de sites de polyadénylation seulement dans les 200 à 300 derniers nucléotides des transcrits du gène choisi. Dans notre étude (article 1), 51 clones correspondant à des ARN polyadénylés d'*atp9* de pomme de terre ont été analysés. Nous avons utilisé une méthode similaire (RT-PCR avec oligod(T)₁₈), pour détecter la présence de sites de polyadénylation sur la totalité de l'orf du gène cible. Dans notre cas, deux expériences indépendantes ont été effectuées. Nous avons effectué une amplification avec une amorce située en 3' de l'orf d'*atp9* (expérience comparable aux autres études). Une seconde amplification a été effectuée avec une amorce située en 5' de l'orf d'*atp9*. Ces deux expériences nous ont permis de montrer que les ARN d'*atp9* de pomme de terre pouvaient être polyadénylés et que la très grande majorité des sites de polyadénylation correspondent aux extrémités 3' matures d'*atp9*. Toutefois, avec la seconde expérience, deux clones sur un total de 49 correspondaient à

des sites internes de polyadénylation localisés à +60 et +63 nt (par rapport au premier nucléotide du codon d'initiation). De plus, la partie 5'UTR des transcrits d'*atp9* a aussi été étudiée avec la même méthode. Tous les clones issus de cette expérience correspondant à une hybridation de l'oligo(dT) dans une région riche en A codée par le génome, il fut impossible de conclure quant à la présence ou non de sites de polyadénylation dans la partie 5'UTR des transcrits du gène *atp9* de pomme de terre.

Cependant, si, seule notre étude permet de conclure que les transcrits mitochondriaux d'*atp9* de pomme de terre sont majoritairement polyadénylés aux extrémités 3' matures, les études similaires ne concernant que la partie 3'UTR de transcrits mitochondriaux s'accordent sur le fait que les sites de polyadénylation se trouvent majoritairement aux extrémités 3' matures plutôt qu'en amont de structures en tige-boucle. Ces observations distinguent nettement le système de la mitochondrie végétale des systèmes du chloroplaste et d'*E. coli*, dans lesquels, s'il existe des ARN polyadénylés à leur extrémité 3' mature, la très grande majorité des sites de polyadénylation sont localisés à des sites internes correspondant à des coupures endonucléolytiques. Ces sites sont situés en particulier en amont de structures en tige-boucle pour les transcrits d'*E. coli* et chloroplastiques qui comportent une structure de ce type à leur extrémité 3' (Hayes *et al.* 1999; Regnier et Arraiano 2000). Cette caractéristique particulière de la localisation des sites de polyadénylation des ARN de la mitochondrie de plante suggère l'existence d'un mécanisme de dégradation des ARN poly(A)-dépendant majoritairement exonucléasique.

Par ailleurs, il existe une différence majeure dans la détection des ARN polyadénylés chez la mitochondrie de plante par rapport à *E. coli*. Sans modifier au préalable l'expression de RNases impliquées dans la dégradation des ARN chez *E. coli*, les ARN polyadénylés détectés ne comportent des extensions que de 1 à 3 A. En revanche la détection d'ARN polyadénylés chez la mitochondrie végétale comportant une dizaine de A peut se faire facilement à partir d'ARN total extrait d'une plante sauvage. De même, pour le chloroplaste, les fragments d'ARN polyadénylés sont relativement accessibles chez une plante sauvage. Ces résultats peuvent être expliqués par une différence de ratio d'ARN

polyadénylés / ARN non polyadénylés entre *E. coli* et les organites de plante. Ou bien, plus simplement, on peut supposer que cette différence d'accessibilité est due à une différence existant entre la demi-vie des ARN polyadénylés bactériens et la demie-vie des ARN polyadénylés mitochondriaux et chloroplastiques. Il est possible que dans la bactérie, les ARN polyadénylés soient reconnus très rapidement par le système de dégradation, alors que dans la mitochondrie et le chloroplaste, il existe une latence entre la polyadénylation et la destruction des ARN polyadénylés.

IV.4. Acteurs et caractéristiques de la polyadénylation de systèmes procaryotiques et d'origine procaryotique

Le chloroplaste comme la mitochondrie sont d'origine procaryotique. Plusieurs caractéristiques du système d'expression des gènes du chloroplaste sont similaires aux bactéries. En particulier, les mécanismes de dégradation des ARN ont de nombreux points communs entre *E. coli* et le chloroplaste (Hayes *et al.* 1999; Schuster *et al.* 1999; Monde *et al.* 2000). Cependant, des différences significatives ont été observées entre les deux systèmes. Chez *E. coli*, la PAP est responsable de l'activité de polyadénylation, alors que dans le chloroplaste des plantes supérieures c'est la PNPase qui pourrait être impliquée à la fois dans la polyadénylation et la dégradation des produits de clivages endonucléolytiques au cours du processus de dégradation des ARN. Ainsi chez *E. coli*, les extensions poly(A) sont majoritairement homopolymériques (Cao *et al.* 1997; Sarkar 1997), alors que dans le chloroplaste, les extensions poly(A) sont hétérogènes et incluent les trois autres nucléotides (Yehudai-Resheff *et al.* 2001). Des extensions poly(A) hétérogènes sont observées chez *E. coli* lorsque la PAP est inactivée. Cette inactivation n'est pas létale car, dans ce cas, la PNPase fonctionne pour polymériser ces extensions hétérogènes et reflète alors une situation comparable au chloroplaste de plante supérieure. Cependant, lorsque l'expression de la PNPase chloroplastique est réprimée, des extensions poly(A) restent détectables en 3' des ARN du plaste (Walter *et al.* 2002). Il est donc possible qu'une

activité complémentaire soit responsable de la polyadénylation dans les chloroplastes de plante supérieure. De manière intéressante, l'analyse de la polyadénylation et de la dégradation des ARN chez *Synechosystis*, une cyanobactérie considérée comme évolutivement proche de l'ancêtre du chloroplaste, a montré qu'il était très probable que la polyadénylation dans cet organisme soit effectuée par la PNPase (Rott *et al.* 2003). Cependant, chez le chloroplaste de l'algue unicellulaire *C. reinhardtii*, seules des extensions poly(A) homopolymériques ont été observées. Ces résultats suggèrent qu'une activité de type PAP est responsable de la polyadénylation dans cet organite (Komine *et al.* 2000).

Chez la mitochondrie humaine, bien qu'une protéine homologue de la PNPase d'*E. coli* soit adressée à la mitochondrie (Piwowarski *et al.* 2003), il semble que les extensions poly(A) majoritairement homopolymériques soient générées par une PAP appartenant à une nouvelle famille de poly(A) polymérase récemment caractérisée (Nagaike *et al.* 2005; Slomovic *et al.* 2005). Aucune information n'est disponible actuellement concernant la composition des extensions poly(A) présentes dans la mitochondrie de *T. brucei*. Toutefois, l'analyse des produits de dégradation dans un système *in vitro* a montré qu'une extension de 20 A en 3' était suffisante pour déclencher la dégradation d'un substrat ARN par une activité exonucléase hydrolytique RNase II-like (Ryan *et al.* 2003). Par ailleurs, les résultats d'une recherche biochimique et bioinformatique suggèrent qu'il n'existe aucun homologue de la PNPase dans ce système (Kao et Read 2005). La polyadénylation serait donc plus vraisemblablement due à une activité de type PAP chez la mitochondrie de *T. brucei*.

Chez la mitochondrie de plante, toutes les études publiées à ce jour s'accordent sur le fait que les extensions poly(A) sont majoritairement homopolymériques (Lupold *et al.* 1999; Gagliardi *et al.* 2001; Kuhn *et al.* 2001). La suppression de l'expression de la PNPase conduit à l'accumulation de précurseurs d'ARN messagers polyadénylés à 80% (Perrin *et al.* 2004). Ces données suggèrent fortement que la polyadénylation dans la mitochondrie de plante n'est pas effectuée par la PNPase. De plus, un gène candidat codant pour une PAP de type bactérien a été identifié par bioinformatique dans le génome d'*A. thaliana* (Martin et Keller 2004). Cependant, si ce gène candidat comporte une séquence d'adres-

sage prédite comme mitochondriale, il reste à le vérifier expérimentalement et à valider l'activité du produit de ce gène.

Les analyses de la polyadénylation montrent que, dans la cellule végétale, des modes de polyadénylation diverses cohabitent dans des sous-compartiments d'origine procaryotique. Chez le chloroplaste, les extensions poly(A) sont hétérologues et la PNPa-se est majoritairement responsable de cette polyadénylation. De manière différente, dans la mitochondrie végétale, les extensions poly(A) sont majoritairement homopolymériques et cette polyadénylation est vraisemblablement effectuée par une activité de type PAP bactérienne. Pourtant dans ces deux compartiments sub-cellulaires, la polyadénylation a une fonction comparable dans le mécanisme de dégradation des ARN. Or, il a été montré que pour "l'ancêtre" du chloroplaste, la cyanobactérie, la PNPase était vraisemblablement responsable de la polyadénylation (Rott *et al.* 2003). Qu'en est-il pour les α -protéobactéries qui sont à l'origine de la mitochondrie ? Comportent-elles un mécanisme de dégradation des ARN similaire ? La polyadénylation chez cette bactérie est-elle effectuée par une Poly(A) polymérase ? La séparation entre ces deux systèmes de polyadénylation a-t-elle eu lieu avant les endosymbioses ou après ? De manière étonnante, alors que la polyadénylation est effectuée par deux protéines différentes dans la mitochondrie et le chloroplaste, une même protéine, la RNase II, est partagée par les deux organelles. Dans ces deux compartiments, elle participe à la maturation des ARN. Mais, dans la mitochondrie, la RNase II a pour substrats les ARN messagers (Perrin *et al.* 2004), alors que chez le chloroplaste, elle joue un rôle dans la maturation des ARN ribosomiques (Bollenbach *et al.* 2005). Ces observations conduisent à s'interroger sur l'évolution, dans un même contexte cellulaire, de deux organelles d'origines bactériennes différentes.

IV.5. Fonction de la polyadénylation des ARNm dans les mitochondries de plante

La démarche expérimentale générale pour étudier l'influence de la polyadénylation sur la dégradation des ARN de la mitochondrie végétale est relativement commune

aux différentes études. Il s'agit d'incuber des substrats polyadénylés ou non qui sont synthétisés *in vitro* en présence d'UTP radioactif. Ces substrats qui correspondent à la partie 3' UTR des transcrits mitochondriaux sont ensuite incubés dans un extrait de protéines mitochondriales obtenu à partir d'un lysat total de mitochondries. La fraction du lysat étudiée est variable suivant les études.

L'étude de la stabilité des transcrits *atpA-orf522* avait mis en évidence *in vivo* la corrélation entre le taux de polyadénylation et la déstabilisation préférentielle d'un transcrit mitochondrial de plante (Gagliardi et Leaver 1999). De plus, deux activités RNases avaient été caractérisées à partir de mitochondries isolées de cotylédons étiolés de tournesol. L'expérience fut reproduite avec des mitochondries isolées de tubercules de pommes de terre. Les deux activités ont été incubés séparément avec des substrats polyadénylés ou non. L'activité RNase 1 ne fait aucune distinction entre les deux substrats dont l'extrémité 3' est différente. En revanche, incubés avec l'activité RNase 2, le substrat non polyadénylé est relativement stable, alors que le substrat polyadénylé est fortement dégradé. Ces résultats montraient que la polyadénylation était impliquée dans un processus de dégradation des transcrits mitochondriaux de plante.

Dans le cadre de l'étude fonctionnelle de la polyadénylation chez la mitochondrie de maïs, des substrats correspondant à la partie 3'UTR de *cox2*, polyadénylés ou non, ont été incubés dans des extraits S100 de mitochondries de maïs (S100 correspond à la partie soluble d'un lysat de mitochondrie après une centrifugation à 100 000 g). Les résultats montrent que les substrats polyadénylés sont légèrement moins stables que les substrats non polyadénylés. Après 90 minutes d'incubation, il ne restait que 31% du substrat polyadénylé initial contre 50% du substrat non polyadénylé. De plus, la différence entre les taux de dégradation des deux substrats diminue s'ils sont incubés ensemble. Bien que l'effet de la polyadénylation soit mineur sur l'instabilité des ARN dans cette étude, les auteurs concluent que la polyadénylation est partie intégrante d'une voie de dégradation des ARN dans la mitochondrie de plante. Les faibles différences entre les taux de dégradation des substrats polyadénylés ou non peuvent être expliquées par l'absence de certaines activités RNases dans l'extrait S100 choisi. D'après nos résultats, il semblerait que

les deux activités RNases ne soient pas séparées dans l'extrait S100 de mitochondries de maïs et que celui-ci comporterait encore l'activité RNase 1. Or l'activité RNase 1 a été caractérisée comme endonucléase. La présence d'une endonucléase expliquerait le peu de différence de taux de dégradation observée entre les substrats polyadénylés et non polyadénylés. La différence entre les taux de dégradation des substrats polyadénylés et non polyadénylés paraît trop faible dans cette étude pour permettre de conclure de manière définitive quant à l'implication de la polyadénylation dans une voie de dégradation des ARN mitochondriaux de plante.

L'effet de l'addition de poly(A) en 3' a aussi été testé dans un système *in vitro* pour les transcrits d'*atp9* de pois. Les substrats étudiés consistaient en des ARN chimériques composés d'une partie du vecteur d'expression (pBluescript) et 113 nucléotides de la partie 3' UTR des transcrits d'*atp9* de pois, contenant une double structure en tige-boucle. Ces ARN ne correspondaient donc à aucun ARN ou partie d'ARN existant *in vivo*. Après incubation de ces substrats polyadénylés dans un lysat de mitochondrie de pois, l'extension poly(A) est dégradée. En conclusion, les substrats polyadénylés retournent à l'état mature par l'action d'une exonucléase qui dégrade rapidement les extensions poly(A) mais s'arrête à la jonction entre l'extension poly(A) et le reste du substrat. Dans ce système *in vitro*, la dégradation complète du substrat n'a pratiquement pas lieu. Pourtant, dans les mêmes conditions, des substrats sans tige-boucle et polyadénylés sont significativement déstabilisés en comparaison des mêmes substrats non-polyadénylés. Il est possible, d'après nos résultats, que l'extrait protéique utilisé lors de cette étude contienne principalement l'activité RNR1 (=AtRNase II). En effet, l'activité RNR1 caractérisée *in vitro* correspond bien à ces observations, puisqu'elle est capable de dégrader facilement des extensions poly(A) et toutes les extrémités peu ou pas structurées et qu'elle s'arrête à la moindre structure secondaire. Mais, selon les auteurs, ces données indiquent que les structures en tige-boucle aux extrémités 3' contrebalançant l'effet déstabilisateur de la polyadénylation. Ces structures seraient responsables de la maturation correcte des extrémités 3' et de la stabilisation des transcrits de la mitochondrie végétale, comme cela

avait été montré précédemment (Dombrowski *et al.* 1997). La présence de sites de polyadénylation dans les tiges-boucles indique qu'il pourrait s'agir d'intermédiaires de dégradation et que des cycles répétés de polyadénylation et d'élimination de l'extension poly(A) avec quelques nucléotides supplémentaires pourraient être à l'origine d'un mécanisme de dégradation des ARN mitochondriaux. Ce mécanisme est probable pour les ARN qui comportent une structure en tige-boucle à leur extrémité 3' mature. Toutefois, il semble que ce type de structures ne soient pas présentes aux extrémités de l'ensemble des ARN mitochondriaux.

L'étude qui révélait la présence d'extensions poly(A) non codées par le génome en 3' d'ARN de la mitochondrie de plante, montrait que la polyadénylation était impliquée dans un mécanisme de dégradation des ARN que ce soit *in vivo* ou dans un système *in vitro* (Gagliardi et Leaver 1999). Le rôle de la polyadénylation dans la déstabilisation des ARN de la mitochondrie de maïs était considéré au contraire comme mineur (Lupold *et al.* 1999). De plus, selon les expériences *in vitro* effectuées avec un extrait protéique de pois, le rôle déstabilisateur de la polyadénylation était annulé par les structures en tige-boucle présentes en 3' UTR des transcrits mitochondriaux (Kuhn *et al.* 2001).

Dans la première partie mon travail de thèse, il était donc indispensable de confirmer ou d'infirmer le rôle que pouvait avoir la polyadénylation dans la déstabilisation des transcrits mitochondriaux. Afin d'étudier l'influence de la polyadénylation sur le taux de dégradation des ARN mitochondriaux, le choix du substrat était important. Le substrat qui était l'objet de notre étude correspond aux derniers 131 nucléotides de la 3' UTR des transcrits du gène *atp9* de *S. tuberosum*.

Dans les conditions de notre étude, de 55 à 74% du substrat polyadénylé de départ sont totalement dégradés alors que seulement 0 à 5% du substrat non polyadénylé sont dégradés par l'activité RNase 2. La différence entre les deux taux de dégradation est bien supérieure à celle observée lors des deux études précédentes (Lupold *et al.* 1999; Kuhn *et al.* 2001). Il existe donc bien une activité mitochondriale qui dégrade préférentiellement

les ARN polyadénylés. Cependant, un intermédiaire de dégradation est généré au cours de l'incubation du substrat polyadénylé. Cet intermédiaire correspond à l'élimination de l'extension poly(A) et 30% du substrat initial se retrouvent sous cette forme. Cet intermédiaire peut résulter de la présence de protéine liant l'ARN en 3' des transcrits et qui empêche la progression des exonucléases. Ou alors il est produit par une activité qui n'est pas très processive et qui se dissocie en partie du substrat à la jonction entre l'extension poly(A) et le reste du substrat. Enfin, cet intermédiaire est peut-être le produit d'une RNase qui dégrade préférentiellement les extensions poly(A).

Le substrat que nous avons choisi pour l'étude de la fonction de la polyadénylation avec un système *in vitro* comportait une structure secondaire forte 70 nt en amont des extrémités 3'. L'existence de cette structure fut vérifiée par une digestion à la phosphodiesterase. Or, dans le système *in vitro*, la dégradation préférentielle des ARN polyadénylés ne semble pas empêchée par la présence de cette structure secondaire forte.

Ainsi, notre étude montre que, pour les transcrits du gène *atp9* de *S. tuberosum*, la polyadénylation est un signal suffisant pour déclencher la dégradation préférentielle de substrats polyadénylés, même s'ils comportent des structures secondaires internes. De plus nos résultats montrent qu'il existe une activité RNase mitochondriale capable de retirer les extensions poly(A).

Par la suite, nous avons identifié deux RNases mitochondriales impliquées dans la maturation des ARN (Perrin *et al.* 2004). Ces deux RNases présentent des homologies significatives avec RNase 2 et la PNPase. Nous avons montré que AtmtRNase II dégrade les extensions non structurées en 3' des ARN, dont les extensions poly(A). Or, l'analyse de la demi-vie des ARN à l'échelle du génome chez différents mutants d'*E. coli* a montré que l'inactivation des deux RNases avait des conséquences différentes sur l'expression d'une partie des ARNm (Mohanty et Kushner 2003). En particulier, l'inactivation de RNase II conduit à une diminution de l'expression de 31% des ARNm incluant la plupart des ARN codant pour les protéines ribosomales. Il est possible d'envisager que AtmtR-

NaseII ait une influence comparable sur la demi-vie de certains ARN mitochondriaux en les protégeant de la dégradation par le retrait des extensions poly(A).

Un processus de dégradation des ARN poly(A)-dépendant a donc été mis en évidence dans les mitochondries de plante. Plus récemment, le rôle de la polyadénylation a été étudié chez les mitochondries d'autres organismes.

IV.6. Le(s) rôle(s) de la polyadénylation chez les mitochondries d'autres organismes

Chez la mitochondrie humaine

Bien que des maladies mitochondriales humaines puissent correspondre à des défauts de maturation et de stabilité des ARN mitochondriaux, les mécanismes post-transcriptionnels de la mitochondrie humaine ont été peu étudiés jusqu'à présent. Cependant une étude chez un patient présentant une pathologie mitochondriale a montré qu'une microdélétion de l'ADN mitochondrial provoquait la déstabilisation d'un ARN (Temperley *et al.* 2003). La microdélétion résulte chez le patient en la perte du U terminal de l'ARN 14 (ATP6/8) à partir duquel la polyadénylation aurait dû former un codon stop correct. Les ARN 14 dans des cellules non mutées comportent des extensions poly(A) de 50 résidus en moyenne. Dans la lignée cellulaire du patient qui a la microdélétion, la maturation et la polyadénylation se déroulent normalement, mais la majorité des ARN 14 ont une extension poly(A) beaucoup plus petite de 0 à 10 résidus. Lors de l'analyse d'une transcription *de novo*, les ARN 14 sont d'abord polyadénylés normalement (c'est à dire une cinquantaine de résidus en moyenne), et les ARN 14 avec une courte extension apparaissent ensuite. Ceci n'est pas un défaut de maturation, mais bien une déadénylation qui est à l'origine des ARN 14 avec des courtes extensions. Lorsque la traduction est inhibée, cela empêche l'apparition des ARN 14 avec des courtes extensions. Si l'inhibition de la

traduction n'a pas d'effet sur l'accumulation de l'ARN 14 dans des cellules contrôles, elle augmente nettement l'accumulation de l'ARN 14 dans les cellules affectées, au point d'atteindre la quantité présente dans les cellules sauvages. Ceci signifie que dans ce cas, la longueur de l'extension poly(A) joue un rôle dans la stabilité des ARN 14. Il semble que les ARN 14 avec une extension courte soient plus vite dégradés qu'avec une extension plus longue. Enfin, il semble que la traduction ait une influence sur la déadénylation des ARN 14 mutés. Il est possible de penser que la polyadénylation joue un rôle dans la stabilité des ARN de la mitochondrie humaine, toutefois il ne faut pas oublier que cette étude concerne des ARN qui ne possèdent pas de codon stop. La dégradation des ARN mutés ne reflète peut-être pas le mécanisme général des ARN mitochondriaux dans la mitochondrie des mammifères. De plus, ces résultats sont obtenus dans un système où la polyadénylation n'est pas affectée. Cependant, on ne peut exclure que la dégradation rapide des ARN 14 mutés soit due à un mécanisme de contrôle de la qualité des ARN mitochondriaux qui reconnaît les ARN aberrants.

Le mécanisme naturel de dégradation des ARN de la mitochondrie humaine n'est pas connu. Cependant au moins trois enzymes de la mitochondrie humaine ont été identifiées comme des homologues de protéines qui sont connues pour participer à la dégradation des ARN dans d'autres systèmes. Il s'agit de hPNPase, une exonucléase comparable aux PNPase bactérienne, chloroplastique et mitochondriale de plante, de hmtPAP, une poly(A) polymérase, et peut-être hSUV3, qui est un homologue d'une ARN hélicase composant du dégradosome de la mitochondrie de levure. La poly(A) polymérase de la mitochondrie humaine a montré que cette dernière appartenait à une nouvelle famille de poly(A) polymérase cytoplasmique régulatrice identifiée chez *C.elegans* et *S. pombe*. Les membres de cette famille ont peu d'homologies avec les PAPs classiques excepté leur domaine catalytique. Contrairement aux PAPs classiques, elles ne possèdent pas de motif de reconnaissance à l'ARN, et requièrent donc une protéine de liaison à l'ARN pour être fonctionnelles. Il est possible que ce type de PAP soit dirigé vers des ARN spécifiques par leur partenaire de liaison à l'ARN. La longueur des queues poly(A) a été analysée sur

plusieurs transcrits: elle varie de 10 à 62 résidus, avec une moyenne de 43 (+/- 14). Les extensions poly(A) sont très majoritairement homopolymériques, ce qui indique que ni la PNPase, ni une CCAse n'est responsable de la synthèse des queues poly(A) dans la mitochondrie humaine. L'étude du rôle fonctionnel de la PNPase par RNAi a été effectuée par deux équipes (Tomecki *et al.* 2004; Nagaike *et al.* 2005). De manière surprenante, ces deux études parviennent à des conclusions contradictoires quant au rôle de la polyadénylation dans les mitochondries humaines. Si les auteurs de ces deux études s'accordent sur le fait que hmtPAP est impliquée dans la polyadénylation des ARN mitochondriaux, les premiers concluent que les longues extensions poly(A) ne sont pas indispensables pour la stabilité des ARN mitochondriaux (Tomecki *et al.* 2004), alors que les seconds, à l'opposé, concluent que la polyadénylation est déterminante pour la stabilité de plusieurs ARN messagers.

Une étude plus récente s'est intéressée à l'existence éventuelle de sites internes de polyadénylation avec des méthodes de bioinformatique et de biologie moléculaire (Slovovic *et al.* 2005). Il s'avère qu'il existe un nombre important de sites internes de polyadénylation correspondant à des ARN tronqués et polyadénylés en 3' de manière transitoire. Basée sur la corrélation entre l'existence de telles molécules et l'existence d'un mécanisme de dégradation poly(A) dépendant dans d'autres systèmes, les auteurs proposent que cette polyadénylation interne fasse partie d'un mécanisme de dégradation des ARN de la mitochondrie humaine. Ces observations révèlent la coexistence de deux effets opposés de la polyadénylation dans les mitochondries humaines. D'une part, une polyadénylation constitutive aux extrémités 3' matures des ARN qui semble jouer un rôle dans la stabilité des ARN, d'autre part, une polyadénylation interne et transitoire qui semble faire partie d'un processus de dégradation commun aux procaryotes et aux organelles. Cette coexistence pose la question de la régulation de la polyadénylation, et essentiellement, le processus de distinction entre une extrémité 3' mature polyadénylée d'un transcrit et un transcrit tronqué polyadénylé en 3'.

Chez la mitochondrie de *T. brucei*

Une situation similaire a été décrite chez la mitochondrie de *Trypanosoma brucei*. Chez la mitochondrie de ce protiste, deux populations d'ARN polyadénylés coexistent constitutivement : une population d'ARN comporte de courtes extensions poly(A) (20 nt en moyenne) et une autre comporte de longues extensions poly(A) (de 120 à 200 nt). La proportion de ces deux populations d'ARN varie au cours des différents stades du cycle de vie complexe du parasite. Il existe une activité exonucléase 3'-5' dont la stimulation est maximale pour des substrats comportant 20 A en 3'. Mais ce qui distingue le cas *T. brucei* de la mitochondrie humaine, c'est l'édition intensive par addition de U des transcrits mitochondriaux. Dans le cas des ARN de la protéine ribosomale S12, l'état de polyadénylation est corrélé à l'état d'édition des transcrits (Militello et Read 1999). Si les ARN messagers ne sont pas édités, ils ne comportent que des extensions courtes à leurs extrémités 3'. En revanche, s'ils sont partiellement ou totalement édités, ils contiennent les deux types de longueurs d'extensions poly(A).

Cette étude fut prolongée par des expériences *in vitro* de dégradation de substrats édités ou non édités, polyadénylés ou non (Kao et Read 2005). Il s'avère qu'un substrat édité non polyadénylé est dégradé plus rapidement que le substrat similaire non édité. En revanche, la dégradation d'un substrat entièrement édité et polyadénylé est très ralentie par rapport au substrat similaire non édité et polyadénylé. Ces résultats montrent qu'il existe dans cet organelle deux effets opposés de la polyadénylation sur la stabilité d'un ARN suivant son état de modification post-transcriptionnel.

IV.7. La maturation des ARN mitochondriaux de plante

La terminaison de la transcription

De manière comparable à ce qui a été observé pour les ARN chloroplastiques (Stern et Grussem 1987), les structures en tige-boucle présentes à l'extrémité 3' de cer-

tains transcrits mitochondriaux ne sont pas des “*terminateurs*” de transcription mais plus vraisemblablement des signaux de maturation (Dombrowski *et al.* 1997). De plus des expériences de transcription *in vitro* ont montré que la transcription pouvait se poursuivre loin en aval des extrémités 3' matures des ARNm et ARNr (Finnegan et Brown 1990). Les résultats que nous avons obtenus lorsque l'expression de la PNPase est réprimée corroborent fortement ces observations antérieures. En effet, lorsque la PNPase n'est plus exprimée, nous pouvons observer des transcrits qui peuvent atteindre plusieurs fois la taille du transcrit mature et qui sont issus d'un défaut de maturation en 3'. L'ensemble de ces résultats suggèrent qu'il n'y a pas de terminaison de la transcription dans les mitochondries de plante.

Maturation exonucléolytique ou endonucléolytique ?

Les résultats décrits dans l'article 2 (Perrin *et al.* 2004), suggéraient que l'accumulation de pré-transcrits comportant de longues extensions en 3' lors de l'absence de PNPase était révélateur d'un processus de maturation en 3' majoritairement exonucléasique effectué essentiellement par la PNPase. Cependant, nous ne pouvons exclure que la suppression de l'expression de la PNPase peut avoir des effets indirects sur un processus de terminaison de la transcription ou sur un mécanisme de dégradation impliquant une endonucléase. D'autant plus que dans les autres systèmes comme *E. coli* et le chloroplaste, les endonucléases jouent un grand rôle à la fois dans la maturation et la dégradation des ARN. Chez le chloroplaste, au moins une endonucléase est impliquée dans la dégradation des ARN : CSP41a (Bollenbach *et al.* 2003), mais actuellement aucune information n'indique que CSP41a pourrait jouer un rôle dans la maturation des ARN chloroplastiques. Excepté les RNases P et RNase Z, aucune endonucléase de la mitochondrie de plante n'a pour l'instant été caractérisée.

Pour les ARN du gène *atp9*, nous avons identifié chez la plante sauvage des fragments d'ARN polyadénylés qui correspondent à des sites internes de polyadénylation. Ces fragments s'accumulent dans les plantes PNP-. Cependant, si ces fragments sont

vraisemblablement des intermédiaires de dégradation, il est difficile d'en déterminer l'origine. En effet ces fragments peuvent aussi bien correspondre à une digestion endonucléolytique, qu'à l'arrêt d'une digestion exonucléolytique. Cet arrêt peut être dû à des structures secondaires fortes ou bien à des facteurs protéiques liés à l'ARN qui gênent la progression des exonucléases.

Pour les ARN ribosomiques de la mitochondrie de plante, plusieurs sites internes de polyadénylation ont été caractérisés pour l'ARN ribosomique 18S. Ces sites proviennent certainement d'intermédiaires de dégradation dont il est aussi difficile de savoir si ils sont issus d'une activité exonucléolytique ou endonucléolytique. En revanche, nous pouvons affirmer que les extrémités 5' des ARN 18S et 5S sont produites par une ou des endonucléases. Le mode de maturation des ARN ribosomiques mitochondriaux est discuté dans le paragraphe suivant.

La maturation des ARN ribosomiques 18S et 5S de plante

Les résultats obtenus lors de l'étude des ARN ribosomiques sont quant à eux sans ambiguïté: ce sont des coupures endonucléolytiques qui sont à l'origine des extrémités 5' des ARN 5S et 18S (Perrin *et al.* 2004). Il existe donc bien une ou des endonucléases dans la mitochondrie végétale pour ce type de maturation, mais leur identification et leur caractérisation restent à effectuer. D'autre part, dans le cas des ARN ribosomiques, nous avons mis en évidence qu'aucune activité exonucléase 5'-3' n'était impliquée dans la maturation des extrémités 5' du 5S et du 18S (Perrin *et al.* 2004).

En ce qui concerne les extrémités 3' des ARN 18S et 5S, l'étude de l'accumulation des précurseurs dans les plantes PNP- a permis de révéler l'implication de la PNPase dans la maturation des extrémités 3' de l'ARN 18S de la mitochondrie d'*Arabidopsis thaliana*. Avec cette réserve : nous ne pouvons exclure que la PNPase soit impliquée dans la dégradation complète des précurseurs du 18S qui s'accumuleraient de manière excessive. Cependant, il semblerait que l'extrémité 3' du 5S, soit elle aussi produite par l'action

d'une exonucléase qui vraisemblablement pourrait être la PNPase (voir le paragraphe 4.4.2 des Résultats).

Chez *E. coli*, au moins trois endonucléases (RNases G, E, III) sont impliquées dans la maturation des extrémités 5' et 3' des ARN ribosomiques (Condon 2003)) et une exonucléase (RNase T) est requise pour la maturation des extrémités 3' du 23S et du 5S (Li *et al.* 1999). Chez les bactéries, les ARN ribosomiques sont organisés en opéron codant pour les ARN 16S, 23S et 5S, qui sont transcrits en grands précurseurs de 30S. Un ou deux ARNt sont présents dans la région intergénique entre le 16S et le 18S, de même qu'en aval du 5S (Srivastava et Schlessinger 1990). La maturation du grand prétranscrit 30S est encore mal connue. Par ailleurs, la polyadénylation des précurseurs des ARN ribosomiques a été caractérisée dans des lignées mutantes chez lesquelles l'activité de plusieurs exonucléases était réduite de plus de 95% (Li *et al.* 1998). Le rôle de cette polyadénylation n'a pas été identifié. Toutefois, connaissant la fonction de la polyadénylation dans la dégradation des ARNm, il est permis de supposer que les ARNr d'*E. coli* pourraient être dégradés de manière similaire ou bien que la polyadénylation en 3' est impliquée dans un processus de maturation. L'hypothèse privilégiée par l'auteur est que la polyadénylation de précurseurs d'ARN "stables" reflète davantage un processus de contrôle qualité qui éliminerait les molécules qui sont incorrectement synthétisées ou maturées, ou produites en surnombre.

Chez le chloroplaste, les ARN ribosomiques sont codés sous la forme d'un opéron. Ce "cluster" hautement conservé, code pour les ARN ribosomiques 16S, 23S, 4.5S et 5S, ainsi que trois ARNt. La maturation du transcrit primaire commence par l'excision des ARNt et par des clivages endonucléolytiques qui génèrent les précurseurs du 16S et du 5S et un intermédiaire de maturation : le transcrit dicistronique 23S-4.5S. La maturation endonucléolytique de ce transcrit s'achève dans le ribosome et précède la maturation des extrémités 3' (Bellaoui et Gruissem 2004).

La modification de l'expression de la PNPase chloroplastique affecte la maturation de l'extrémité 3' du 23S (Walter *et al.* 2002). Mais ce défaut de maturation n'a pas d'influence sur la biogenèse du chloroplaste et le développement de la plante.

RNR1 (encore appelée AtmtRNase II) appartient à la même famille que la RNase R impliquée dans la dégradation des ARN 16S et 23S et les ARNm bactériens fortement structurés (Cheng et Deutscher 2003; Cheng et Deutscher 2005). Lorsque l'expression de cette protéine est affectée, le développement de la plante est fortement compromis (Perrin *et al.* 2004). Or, si cette RNase est impliquée dans l'étape finale de maturation de l'extrémité 3' des ARN du gène *atp9* (voir article 2), elle est aussi importée dans le chloroplaste. L'analyse de l'expression des gènes ribosomiques chloroplastiques chez plusieurs mutants *rnr1*, montre que cette exonucléase a un rôle clé dans la maturation de ces ARN (Bollenbach *et al.* 2005).

En conclusion, si les deux systèmes de dégradation / maturation des ARN chloroplastiques et mitochondriaux comportent chacun une exonucléase phosphorolytique très similaire (AtmtPNPase et AtcpPNPase) et partagent une même exonucléase hydrolytique (RNR1), l'importance respective du type de RNase dans le développement et la viabilité de la plante est inversée selon l'organelle considéré. En effet, si l'expression de la PNPase mitochondriale est affectée, la plante meurt. Alors, que pour la biogenèse du chloroplaste et le bon fonctionnement de la plante, c'est l'expression de RNR1 qui est déterminante.

IV.8. Machinerie de dégradation des ARN et maturation des ARN ribosomiques nucléaires de levure

La voie de maturation des ARN ribosomiques la mieux caractérisée est celle des ARN ribosomiques codés par le génome nucléaire de levure. Dans la levure et les eucaryotes, trois des quatre ARN ribosomiques sont synthétisés sous la forme d'un long pré-

curseur appelé 35S. Ce précurseur est ensuite clivé et mûri pour générer les ARNr 18S, 5.8S et 25S (Kressler *et al.* 1999; Venema et Tollervey 1999). La recherche de mutants affectés dans la maturation du 5.8S a conduit à l'identification d'une exonucléase (Rrp4p) (Mitchell *et al.* 1996). Les efforts pour caractériser l'activité de cette exonucléase ont montré que cette enzyme appartenait à un complexe cellulaire d'une dizaine d'exonucléases 3'-5' homologues à des exonucléases bactériennes. Ce complexe a été appelé l'exosome (Mitchell *et al.* 1997). L'exosome existe sous différentes formes selon qu'il se trouve dans le noyau ou le cytoplasme. Dans le cytoplasme, il est impliqué dans une voie de dégradation des ARNm. Dans le noyau, l'exosome est indispensable pour la maturation de l'extrémité 3' de l'ARNr 5.8S et pour la dégradation de la séquence leader du grand prétranscrit 35S. Ces fonctions sont très proches de celles qui sont identifiées pour la PNPase dans la dégradation de la séquence leader du co-transcrit 18S-5S et la maturation de l'extrémité 3' du 18S chez la mitochondrie d'*Arabidopsis thaliana* (voir article 3). D'autre part, l'exosome eucaryotique nucléaire joue un rôle dans la maturation des petits ARN nucléaire (snRNA) et petits ARN nucléolaires (snoRNA) (Allmang *et al.* 1999; van Hoof *et al.* 2000). Enfin, l'exosome participe dans le noyau à un mécanisme de contrôle qualité des ARNm en dégradant les précurseurs non épissés ou non adénylés (Bousquet-Antonelli *et al.* 2000; Burkard et Butler 2000; Hilleren *et al.* 2001).

De manière très intéressante, il a été montré récemment que l'exosome nucléaire de levure pouvait être recruté par un complexe de polyadénylation nucléaire appelé TRAMP (LaCava *et al.* 2005). Il a été montré que le complexe TRAMP était impliqué dans la polyadénylation et la dégradation des ARN ribosomiques dans le noyau, ainsi que des précurseurs des snoRNA, deux types d'ARN connus pour être des substrats de l'exosome. De plus, le complexe TRAMP est non seulement impliqué dans la polyadénylation et la dégradation de régions intergéniques qui étaient supposées non transcrites, mais aussi responsable de la dégradation de plusieurs transcrits synthétisés par la Pol I et la Pol II (Wyers *et al.* 2005). Cela suggère fortement que le complexe TRAMP est impliqué dans un mécanisme de contrôle qualité des ARN nucléaires qui limitent l'expression in-

appropriée d'information génétique. Enfin, la polyadénylation qui stimule la dégradation des ARN chez les procaryotes apparaît comme la fonction ancestrale de la polyadénylation qui a été maintenue dans le noyau des eucaryotes. Ce n'est finalement que dans le cytoplasme des eucaryotes, la mitochondrie humaine et la mitochondrie de *T. brucei* que la polyadénylation semble avoir acquis d'autres rôles dans la traduction.

V. CONCLUSION GÉNÉRALE / PERSPECTIVES

V.1. Conclusion générale

Dans ce travail de thèse, nous avons montré que la polyadénylation fait partie d'une voie de dégradation des ARN messagers et ribosomiques de la mitochondrie végétale et est probablement impliquée aussi dans la maturation de ces deux types d'ARN. Le mécanisme de dégradation des ARN poly(A)-dépendant des bactéries, comme la majorité des systèmes d'origine procaryotique tels ceux du chloroplaste et de la mitochondrie végétale, ont en commun le fait que la polyadénylation favorise le recrutement de la PNPase. Ce n'est que dans les mitochondries de *T. brucei* ou de mammifères que la polyadénylation est constitutive. Dans ces organismes, la polyadénylation semble avoir un rôle dans la stabilisation des ARN messagers mitochondriaux. A l'opposé, dans la mitochondrie de levure, la polyadénylation est absente. Cette absence est d'ailleurs en corrélation avec l'absence d'une exonucléase mitochondriale de type PNPase.

Récemment, le rôle de la polyadénylation dans la dégradation des ARN nucléaires de levure a été révélé. Il apparaît donc que l'implication de la polyadénylation dans une voie de dégradation des ARN n'est pas cantonnée aux procaryotes ou aux systèmes d'origine procaryotique. De fait, la polyadénylation est une modification post-transcriptionnelle quasi ubiquitaire, et l'un de ses rôles ancestraux semble être de faciliter le recrutement de RNases ou de complexes exonucléolytiques pour déclencher la dégradation des ARN. Les autres rôles connus pour la polyadénylation comme le transport nucléocytoplasmique, la stabilisation des ARN cytoplasmiques chez les eucaryotes ou la génération de codons stop pour les ARN de la mitochondrie humaine semblent avoir été ajoutés ou être apparus de manière opportuniste au cours de l'évolution.

V.2.Perspectives

Le travail réalisé dans cette thèse était nécessaire pour établir une base d'étude de la polyadénylation dans la mitochondrie végétale. Il a été montré précédemment que la polyadénylation pouvait influencer la dégradation tissu-spécifique d'un transcrit chimérique impliqué dans la stérilité mâle cytoplasmique d'une lignée de tournesol. La polyadénylation peut donc être régulée au cours du développement dans le cas de cet ARN. Est-ce que la polyadénylation des ARN de gènes "classiques" mitochondriaux peut être modulée au cours du développement de la plante ? Les études de l'expression du génome mitochondrial au niveau des promoteurs montrent qu'il n'existe pas de différence significative de taux de synthèse des ARN mitochondriaux en fonction du tissu étudié. De même, il ne semble pas exister de différences importantes dans l'accumulation d'un ARN donné au cours du développement. Il semble donc peu probable que la polyadénylation des ARN de gènes "classiques" soit modifiée en fonction du stade de développement de la plante. Toutefois, l'impact sur la polyadénylation, et par conséquent, les variations de stabilité des transcrits mitochondriaux pourront être étudiés dans différentes conditions de stress biotiques et abiotiques. Aucun facteur protéique ayant une influence sur la polyadénylation d'un ARN mitochondrial particulier n'a encore été identifié. Dans le génome d'*Arabidopsis*, deux familles de protéines à motif liant l'ARN (PPR et RRM) importées dans les organelles ont été caractérisées. Ces protéines, notamment les PPR, sont soupçonnées de jouer des rôles importants dans des modifications post-transcriptionnelles des ARN mitochondriaux. La caractérisation de plantes mutées dans la séquence codant pour les protéines PPR et RRM pourrait permettre d'identifier des facteurs responsables dans la stabilisation ou la maturation spécifique d'un transcrit mitochondrial. Il sera alors possible d'étudier l'impact de la modification de l'expression de telles protéines sur la polyadénylation des ARN mitochondriaux.

Du point de vue mécanistique, le rôle de plusieurs partenaires des RNases décrites dans ce travail devra être caractérisé. Un gène codant pour une poly(A) polymérase mi-

tochondriale a été identifié par bioinformatique. En premier lieu, il est nécessaire de vérifier son adressage mitochondrial. Ensuite, par une stratégie de génétique inverse, sa fonction dans la polyadénylation des transcrits mitochondriaux pourra être confirmée. Par ailleurs, il n'est pas exclu que des protéines se liant aux extensions poly(A) soient présentes dans la matrice mitochondriale. Si leur présence est avérée, elle pourraient avoir un rôle déterminant dans le contrôle de la stabilité de certains transcrits mitochondriaux.

La stratégie lors de ce travail fut d'étudier la polyadénylation de substrats définis par avance, chez des plantes sauvages et chez des plantes pour lesquelles l'expression de RNases mitochondriales avait été modifiée. Nous avons montré que dans les plantes PNP-, des intermédiaires de maturation et de dégradation s'accumulent et sont polyadénylés. Dans des études en cours au laboratoire, c'est l'ensemble des ARN polyadénylés s'accumulant en l'absence de PNPase qui sont analysés. Ce type de démarche nous permettra d'identifier la plupart des intermédiaires de dégradation et nous donnera une image plus globale du profil d'expression du génome de la mitochondrie de plantes supérieures.

VI. BIBLIOGRAPHIE

- Allmang, C., Kufel, J., Chanfreau, G., Mitchell, P., Petfalski, E. et Tollervey, D. (1999). "Functions of the exosome in rRNA, snoRNA and snRNA synthesis." EMBO J. **18**(19): 5399-5410.
- August, J. T., Ortiz, P. J. et Hurwitz, J. (1962). "Ribonucleic acid-dependent ribonucleotide incorporation. I. Purification and properties of the enzyme." J. Biol. Chem. **237**: 3786-3793.
- Backert, S., Meissner, K. et Borner, T. (1997). "Unique features of the mitochondrial rolling circle-plasmid mp1 from the higher plant *Chenopodium album* (L.)." Nucleic Acids Res. **25**(3): 582-589.
- Baginsky, S., Shteiman-Kotler, A., Liveanu, V., Yehudai-Resheff, S., Bellaoui, M., Settlage, R. E., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., Schuster, G. et Gruissem, W. (2001). "Chloroplast PNPase exists as a homo-multimer enzyme complex that is distinct from the *Escherichia coli* degradosome." RNA **7**(10): 1464-1475.
- Bass, B. L. (2002). "RNA editing by adenosine deaminases that act on RNA." Annu. Rev. Biochem. **71**: 817-846.
- Beaudry, D. et Perreault, J. P. (1995). "An efficient strategy for the synthesis of circular RNA molecules." Nucleic Acids Res. **23**(15): 3064-3066.
- Begu, D., Graves, P. V., Domec, C., Arselin, G., Litvak, S. et Araya, A. (1990). "RNA editing of wheat mitochondrial ATP synthase subunit 9: direct protein and cDNA sequencing." Plant Cell **2**(12): 1283-1290.
- Bellaoui, M. et Gruissem, W. (2004). "Altered expression of the Arabidopsis ortholog of DCL affects normal plant development." Planta **219**(5): 819-826.
- Bellaoui, M., Pelletier, G. et Budar, F. (1997). "The steady-state level of mRNA from the *Ogura* cytoplasmic male sterility locus in Brassica hybrids is determined post-transcriptionally by its 3' region." EMBO J. **16**(16): 5057-5068.
- Bentolila, S., Alfonso, A. A. et Hanson, M. R. (2002). "A pentatricopeptide repeat-containing gene restores fertility to cytoplasmic male-sterile plants." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **99**(16): 10887-10892.
- Bessarab, D. A., Kaberdin, V. R., Wei, C. L., Liou, G. G. et Lin-Chao, S. (1998). "RNA components of *Escherichia coli* degradosome: evidence for rRNA decay." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **95**(6): 3157-3161.
- Binder, S. et Brennicke, A. (2003). "Gene expression in plant mitochondria: transcriptional and post-transcriptional control." Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. **358**(1429): 181-188; discussion 188-189.
- Birnboim, H. C. et Doly, J. (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." Nucleic Acids Res. **7**(6): 1513-1523.
- Blum, E., Carpousis, A. J. et Higgins, C. F. (1999). "Polyadenylation promotes degradation of 3'-structured RNA by the *Escherichia coli* mRNA degradosome in vitro." J. Biol. Chem. **274**(7): 4009-4016.
- Blum, E., Py, B., Carpousis, A. J. et Higgins, C. F. (1997). "Polyphosphate kinase is a component of the *Escherichia coli* RNA degradosome." Mol. Microbiol. **26**(2): 387-398.
- Bollenbach, T. J., Lange, H., Gutierrez, R., Erhardt, M., Stern, D. B. et Gagliardi, D. (2005). "RNR1, a 3'-5' exoribonuclease belonging to the RNR superfamily, catalyzes 3' ma-

- turation of chloroplast ribosomal RNAs in *Arabidopsis thaliana*." Nucleic Acids Res. **33**(8): 2751-2763.
- Bollenbach, T. J., Tatman, D. A. et Stern, D. B. (2003). "CSP41a, a multifunctional RNA-binding protein, initiates mRNA turnover in tobacco chloroplasts." Plant J. **36**(6): 842-852.
- Boudreau, E., Nickelsen, J., Lemaire, S. D., Ossenbuhl, F. et Rochaix, J. D. (2000). "The Nac2 gene of *Chlamydomonas* encodes a chloroplast TPR-like protein involved in psbD mRNA stability." EMBO J. **19**(13): 3366-3376.
- Bousquet-Antonelli, C., Presutti, C. et Tollervey, D. (2000). "Identification of a regulated pathway for nuclear pre-mRNA turnover." Cell **102**(6): 765-775.
- 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., Zabaleta, E., Dombrowski, S., Hoffmann, M. et Binder, S. (1999). "Transcription signals of mitochondrial and nuclear genes for mitochondrial proteins in dicot plants." J. Hered. **90**(3): 345-350.
- Burger, G., Gray, M. W. et Lang, B. F. (2003). "Mitochondrial genomes: anything goes." Trends Genet. **19**(12): 709-716.
- Burkard, K. T. et Butler, J. S. (2000). "A nuclear 3'-5' exonuclease involved in mRNA degradation interacts with Poly(A) polymerase and the hnRNA protein Npl3p." Mol. Cell. Biol. **20**(2): 604-616.
- Butow, R. A., Zhu, H., Perlman, P. et Conrad-Webb, H. (1989). "The role of a conserved dodecamer sequence in yeast mitochondrial gene expression." Genome **31**(2): 757-760.
- Cannistraro, V. J. et Kennell, D. (2001). "Escherichia coli ribonuclease II." Methods Enzymol. **342**: 309-330.
- Cao, G. J., Kalapos, M. P. et Sarkar, N. (1997). "Polyadenylated mRNA in *Escherichia coli*: modulation of poly(A) RNA levels by polynucleotide phosphorylase and ribonuclease II." Biochimie **79**(4): 211-220.
- Cao, G. J. et Sarkar, N. (1992). "Identification of the gene for an *Escherichia coli* poly(A) polymerase." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **89**(21): 10380-10384.
- Cao, G. J. et Sarkar, N. (1992). "Poly(A) RNA in *Escherichia coli*: nucleotide sequence at the junction of the lpp transcript and the polyadenylate moiety." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **89**(16): 7546-7550.
- Carpousis, A. J., Van Houwe, G., Ehretsmann, C. et Krisch, H. M. (1994). "Copurification of *E. coli* RNAase E and PNPase: evidence for a specific association between two enzymes important in RNA processing and degradation." Cell **76**(5): 889-900.
- Carrillo, C. et Bonen, L. (1997). "RNA editing status of nad7 intron domains in wheat mitochondria." Nucleic Acids Res. **25**(2): 403-409.
- Carrillo, C., Chapdelaine, Y. et Bonen, L. (2001). "Variation in sequence and RNA editing within core domains of mitochondrial group II introns among plants." Mol. Gen. Genet. **264**(5): 595-603.

- Chapdelaine, Y. et Bonen, L. (1991). "The wheat mitochondrial gene for subunit I of the NADH dehydrogenase complex: a trans-splicing model for this gene-in-pieces." Cell **65**(3): 465-472.
- Cheng, Z. F. et Deutscher, M. P. (2003). "Quality control of ribosomal RNA mediated by polynucleotide phosphorylase and RNase R." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **100**(11): 6388-6393.
- Cheng, Z. F. et Deutscher, M. P. (2005). "An important role for RNase R in mRNA decay." Mol. Cell **17**(2): 313-318.
- Coburn, G. A. et Mackie, G. A. (1996). "Overexpression, purification, and properties of Escherichia coli ribonuclease II." J. Biol. Chem. **271**(2): 1048-1053.
- Coburn, G. A. et Mackie, G. A. (1998). "Reconstitution of the degradation of the mRNA for ribosomal protein S20 with purified enzymes." J. Mol. Biol. **279**(5): 1061-1074.
- Coburn, G. A. et Mackie, G. A. (1999). "Degradation of mRNA in Escherichia coli: an old problem with some new twists." Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. **62**: 55-108.
- Coburn, G. A., Miao, X., Briant, D. J. et Mackie, G. A. (1999). "Reconstitution of a minimal RNA degradosome demonstrates functional coordination between a 3' exonuclease and a DEAD-box RNA helicase." Genes Dev. **13**(19): 2594-2603.
- Condon, C. (2003). "RNA processing and degradation in Bacillus subtilis." Microbiol. Mol. Biol. Rev. **67**(2): 157-174, table of contents.
- Cormack, R. S. et Mackie, G. A. (1992). "Structural requirements for the processing of Escherichia coli 5 S ribosomal RNA by RNase E in vitro." J. Mol. Biol. **228**(4): 1078-1090.
- Covello, P. S. et Gray, M. W. (1989). "RNA editing in plant mitochondria." Nature **341**(6243): 662-666.
- Deutscher, M. P. et Reuven, N. B. (1991). "Enzymatic basis for hydrolytic versus phospholytic mRNA degradation in Escherichia coli and Bacillus subtilis." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **88**(8): 3277-3280.
- Dmochowska, A., Golik, P. et Stepien, P. P. (1995). "The novel nuclear gene DSS-1 of Saccharomyces cerevisiae is necessary for mitochondrial biogenesis." Curr. Genet. **28**(2): 108-112.
- Dombrowski, S., Brennicke, A. et Binder, S. (1997). "3'-Inverted repeats in plant mitochondrial mRNAs are processing signals rather than transcription terminators." EMBO J. **16**(16): 5069-5076.
- Donovan, W. P. et Kushner, S. R. (1986). "Polynucleotide phosphorylase and ribonuclease II are required for cell viability and mRNA turnover in Escherichia coli K-12." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83**(1): 120-124.
- Drager, R. G., Girard-Bascou, J., Choquet, Y., Kindle, K. L. et Stern, D. B. (1998). "In vivo evidence for 5'→3' exoribonuclease degradation of an unstable chloroplast mRNA." Plant J. **13**(1): 85-96.
- Dreyfus, M. et Regnier, P. (2002). "The poly(A) tail of mRNAs: bodyguard in eukaryotes, scavenger in bacteria." Cell **111**(5): 611-613.
- Dziembowski, A., Piwowarski, J., Hoser, R., Minczuk, M., Dmochowska, A., Siep, M., van der Spek, H., Grivell, L. et Stepien, P. P. (2003). "The yeast mitochondrial degrado-

- some. Its composition, interplay between RNA helicase and RNase activities and the role in mitochondrial RNA metabolism." *J. Biol. Chem.* **278**(3): 1603-1611.
- Ehretsmann, C. P., Carpousis, A. J. et Krisch, H. M. (1992). "Specificity of Escherichia coli endoribonuclease RNase E: in vivo and in vitro analysis of mutants in a bacteriophage T4 mRNA processing site." *Genes Dev.* **6**(1): 149-159.
- Farre, J. C. et Araya, A. (2001). "Gene expression in isolated plant mitochondria: high fidelity of transcription, splicing and editing of a transgene product in electroporated organelles." *Nucleic Acids Res.* **29**(12): 2484-2491.
- Farre, J. C. et Araya, A. (2002). "RNA splicing in higher plant mitochondria: determination of functional elements in group II intron from a chimeric cox II gene in electroporated wheat mitochondria." *Plant J.* **29**(2): 203-213.
- Farre, J. C., Leon, G., Jordana, X. et Araya, A. (2001). "cis Recognition elements in plant mitochondrion RNA editing." *Mol. Cell. Biol.* **21**(20): 6731-6737.
- Feng, Y., Huang, H., Liao, J. et Cohen, S. N. (2001). "Escherichia coli poly(A)-binding proteins that interact with components of degradosomes or impede RNA decay mediated by polynucleotide phosphorylase and RNase E." *J. Biol. Chem.* **276**(34): 31651-31656.
- Fey, J. et Marechal-Drouard, L. (1999). "Compilation and analysis of plant mitochondrial promoter sequences: An illustration of a divergent evolution between monocot and dicot mitochondria." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **256**(2): 409-414.
- Fey, J. et Marechal-Drouard, L. (1999). "Expression of the two chloroplast-like tRNA(Asn) genes in potato mitochondria: mapping of transcription initiation sites present in the trnN1-trnY-nad2 cluster and upstream of trnN2." *Curr. Genet.* **36**(1-2): 49-54.
- Fey, J., Vermel, M., Grienberger, J., Marechal-Drouard, L. et Gualberto, J. M. (1999). "Characterization of a plant mitochondrial active chromosome." *FEBS Lett.* **458**(2): 124-128.
- Finnegan, P. M. et Brown, G. G. (1990). "Transcriptional and Post-Transcriptional Regulation of RNA Levels in Maize Mitochondria." *Plant Cell* **2**(1): 71-83.
- Gagliardi, D. et Leaver, C. J. (1999). "Polyadenylation accelerates the degradation of the mitochondrial mRNA associated with cytoplasmic male sterility in sunflower." *EMBO J.* **18**(13): 3757-3766.
- Gagliardi, D., Perrin, R., Marechal-Drouard, L., Grienberger, J. M. et Leaver, C. J. (2001). "Plant mitochondrial polyadenylated mRNAs are degraded by a 3' to 5'-exoribonuclease activity, which proceeds unimpeded by stable secondary structures." *J. Biol. Chem.* **276**(47): 43541-43547.
- Gagliardi, D., Stepien, P. P., Temperley, R. J., Lightowers, R. N. et Chrzanowska-Lightowers, Z. M. (2004). "Messenger RNA stability in mitochondria: different means to an end." *Trends Genet.* **20**(6): 260-267.
- Gaspari, M., Larsson, N. G. et Gustafsson, C. M. (2004). "The transcription machinery in mammalian mitochondria." *Biochim. Biophys. Acta.* **1659**(2-3): 148-152.
- Ghora, B. K. et Apirion, D. (1978). "Structural analysis and in vitro processing to p5 rRNA of a 9S RNA molecule isolated from an rne mutant of E. coli." *Cell* **15**(3): 1055-1066.

- Ghosh, S. et Deutscher, M. P. (1999). "Oligoribonuclease is an essential component of the mRNA decay pathway." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**(8): 4372-4377.
- Giege, P. et Brennicke, A. (1999). "RNA editing in Arabidopsis mitochondria effects 441 C to U changes in ORFs." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**(26): 15324-15329.
- Giege, P., Hoffmann, M., Binder, S. et Brennicke, A. (2000). "RNA degradation buffers asymmetries of transcription in Arabidopsis mitochondria." *EMBO Rep.* **1**(2): 164-170.
- Giege, P., Hoffmann, M., Binder, S. et Brennicke, A. (2000). "RNA degradation buffers asymmetries of transcription in Arabidopsis mitochondria." *EMBO Rep.* **1**(2): 164-170.
- Giese, A., Thalheim, C., Brennicke, A. et Binder, S. (1996). "Correlation of nonanucleotide motifs with transcript initiation of 18S rRNA genes in mitochondria of pea, potato and Arabidopsis." *Mol. Gen. Genet.* **252**(4): 429-436.
- Gott, J. M. et Emeson, R. B. (2000). "Functions and mechanisms of RNA editing." *Annu. Rev. Genet.* **34**: 499-531.
- Gray, M. W., Burger, G. et Lang, B. F. (1999). "Mitochondrial evolution." *Science* **283**(5407): 1476-1481.
- Gualberto, J. M., Lamattina, L., Bonnard, G., Weil, J. H. et Grienenberger, J. M. (1989). "RNA editing in wheat mitochondria results in the conservation of protein sequences." *Nature* **341**(6243): 660-662.
- Haff, L. A. et Bogorad, L. (1976). "Poly(adenylic acid)-containing RNA from plastids of maize." *Biochemistry* **15**(18): 4110-4115.
- Hajnsdorf, E., Braun, F., Haugel-Nielsen, J., Le Derout, J. et Regnier, P. (1996). "Multiple degradation pathways of the rpsO mRNA of Escherichia coli. RNase E interacts with the 5' and 3' extremities of the primary transcript." *Biochimie* **78**(6): 416-424.
- Hajnsdorf, E., Braun, F., Haugel-Nielsen, J. et Regnier, P. (1995). "Polyadenylation destabilizes the rpsO mRNA of Escherichia coli." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**(9): 3973-3977.
- Hajnsdorf, E. et Regnier, P. (2000). "Host factor Hfq of Escherichia coli stimulates elongation of poly(A) tails by poly(A) polymerase I." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**(4): 1501-1505.
- Hajnsdorf, E., Steier, O., Coscoy, L., Teyssset, L. et Regnier, P. (1994). "Roles of RNase E, RNase II and PNPase in the degradation of the rpsO transcripts of Escherichia coli: stabilizing function of RNase II and evidence for efficient degradation in an *ams pnp rnb* mutant." *EMBO J.* **13**(14): 3368-3377.
- Hanic-Joyce, P. J. et Gray, M. W. (1990). "Processing of transfer RNA precursors in a wheat mitochondrial extract." *J. Biol. Chem.* **265**(23): 13782-13791.
- Haugel-Nielsen, J., Hajnsdorf, E. et Regnier, P. (1996). "The rpsO mRNA of Escherichia coli is polyadenylated at multiple sites resulting from endonucleolytic processing and exonucleolytic degradation." *EMBO J.* **15**(12): 3144-3152.
- Hayes, R., Kudla, J. et Gruissem, W. (1999). "Degrading chloroplast mRNA: the role of polyadenylation." *Trends Biochem. Sci.* **24**(5): 199-202.

- Hayes, R., Kudla, J., Schuster, G., Gabay, L., Maliga, P. et Gruissem, W. (1996). "Chloroplast mRNA 3'-end processing by a high molecular weight protein complex is regulated by nuclear encoded RNA binding proteins." *EMBO J.* **15**(5): 1132-1141.
- He, L., Soderbom, F., Wagner, E. G., Binnie, U., Binns, N. et Masters, M. (1993). "PcnB is required for the rapid degradation of RNAI, the antisense RNA that controls the copy number of ColE1-related plasmids." *Mol. Microbiol.* **9**(6): 1131-1142.
- Heazlewood, J. L., Tonti-Filippini, J. S., Gout, A. M., Day, D. A., Whelan, J. et Millar, A. H. (2004). "Experimental analysis of the Arabidopsis mitochondrial proteome highlights signaling and regulatory components, provides assessment of targeting prediction programs, and indicates plant-specific mitochondrial proteins." *Plant Cell* **16**(1): 241-256.
- Hedtke, B., Borner, T. et Weihe, A. (2000). "One RNA polymerase serving two genomes." *EMBO Rep.* **1**(5): 435-440.
- Hiesel, R., Wissinger, B., Schuster, W. et Brennicke, A. (1989). "RNA editing in plant mitochondria." *Science* **246**(4937): 1632-1634.
- Hilleren, P., McCarthy, T., Rosbash, M., Parker, R. et Jensen, T. H. (2001). "Quality control of mRNA 3'-end processing is linked to the nuclear exosome." *Nature* **413**(6855): 538-542.
- Hirsch, M. et Penman, S. (1974). "Post-transcriptional addition of polyadenylic acid to mitochondrial RNA by a cordycepin-insensitive process." *J. Mol. Biol.* **83**(2): 131-142.
- Hoch, B., Maier, R. M., Appel, K., Igloi, G. L. et Kossel, H. (1991). "Editing of a chloroplast mRNA by creation of an initiation codon." *Nature* **353**(6340): 178-180.
- Hoffmann, M., Dombrowski, S., Guha, C. et Binder, S. (1999). "Cotranscription of the rpl5-rps14-cob gene cluster in pea mitochondria." *Mol. Gen. Genet.* **261**(3): 537-545.
- Ikeda, T. M. et Gray, M. W. (1999). "Characterization of a DNA-binding protein implicated in transcription in wheat mitochondria." *Mol. Cell. Biol.* **19**(12): 8113-8122.
- Jager, S., Fuhrmann, O., Heck, C., Hebermehl, M., Schiltz, E., Rauhut, R. et Klug, G. (2001). "An mRNA degrading complex in *Rhodobacter capsulatus*." *Nucleic Acids Res.* **29**(22): 4581-4588.
- Kaberdin, V. R., Miczak, A., Jakobsen, J. S., Lin-Chao, S., McDowall, K. J. et von Gabain, A. (1998). "The endoribonucleolytic N-terminal half of *Escherichia coli* RNase E is evolutionarily conserved in *Synechocystis* sp. and other bacteria but not the C-terminal half, which is sufficient for degradosome assembly." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**(20): 11637-11642.
- Kabeya, Y., Hashimoto, K. et Sato, N. (2002). "Identification and characterization of two phage-type RNA polymerase cDNAs in the moss *Physcomitrella patens*: implication of recent evolution of nuclear-encoded RNA polymerase of plastids in plants." *Plant Cell Physiol.* **43**(3): 245-255.
- Kao, C. Y. et Read, L. K. (2005). "Opposing effects of polyadenylation on the stability of edited and unedited mitochondrial RNAs in *Trypanosoma brucei*." *Mol. Cell. Biol.* **25**(5): 1634-1644.

- Kazama, T. et Toriyama, K. (2003). "A pentatricopeptide repeat-containing gene that promotes the processing of aberrant atp6 RNA of cytoplasmic male-sterile rice." FEBS Lett. **544**(1-3): 99-102.
- Knoop, V., Schuster, W., Wissinger, B. et Brennicke, A. (1991). "Trans splicing integrates an exon of 22 nucleotides into the nad5 mRNA in higher plant mitochondria." EMBO J. **10**(11): 3483-3493.
- Komine, Y., Kwong, L., Anguera, M. C., Schuster, G. et Stern, D. B. (2000). "Polyadenylation of three classes of chloroplast RNA in *Chlamydomonas reinhardtii*." RNA **6**(4): 598-607.
- Kressler, D., Linder, P. et de La Cruz, J. (1999). "Protein trans-acting factors involved in ribosome biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*." Mol. Cell. Biol. **19**(12): 7897-7912.
- Kubo, T., Nishizawa, S., Sugawara, A., Itchoda, N., Estiati, A. et 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**(13): 2571-2576.
- Kudla, J., Hayes, R. et Grussem, W. (1996). "Polyadenylation accelerates degradation of chloroplast mRNA." EMBO J. **15**(24): 7137-7146.
- Kuhn, J. et Binder, S. (2002). "RT-PCR analysis of 5' to 3'-end-ligated mRNAs identifies the extremities of cox2 transcripts in pea mitochondria." Nucleic Acids Res. **30**(2): 439-446.
- Kuhn, J., Tengler, U. et Binder, S. (2001). "Transcript lifetime is balanced between stabilizing stem-loop structures and degradation-promoting polyadenylation in plant mitochondria." Mol. Cell. Biol. **21**(3): 731-742.
- Kuhn, K., Weihe, A. et Borner, T. (2005). "Multiple promoters are a common feature of mitochondrial genes in *Arabidopsis*." Nucleic Acids Res. **33**(1): 337-346.
- Kunzmann, A., Brennicke, A. et Marchfelder, A. (1998). "5' end maturation and RNA editing have to precede tRNA 3' processing in plant mitochondria." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **95**(1): 108-113.
- Kushner, S. R. (2002). "mRNA decay in *Escherichia coli* comes of age." J. Bacteriol. **184**(17): 4658-4665; discussion 4657.
- Kuwano, M., Ono, M., Endo, H., Hori, K., Nakamura, K., Hirota, Y. et Ohnishi, Y. (1977). "Gene affecting longevity of messenger RNA: a mutant of *Escherichia coli* with altered mRNA stability." Mol. Gen. Genet. **154**(3): 279-285.
- LaCava, J., Houseley, J., Saveanu, C., Petfalski, E., Thompson, E., Jacquier, A. et Tollervey, D. (2005). "RNA degradation by the exosome is promoted by a nuclear polyadenylation complex." Cell **121**(5): 713-724.
- Lang, B. F., Burger, G., O'Kelly, C. J., Cedergren, R., Golding, G. B., Lemieux, C., Sankoff, D., Turmel, M. et Gray, M. W. (1997). "An ancestral mitochondrial DNA resembling a eubacterial genome in miniature." Nature **387**(6632): 493-497.
- Le Derout, J., Folichon, M., Briani, F., Deho, G., Regnier, P. et Hajnsdorf, E. (2003). "Hfq affects the length and the frequency of short oligo(A) tails at the 3' end of *Escherichia coli* rpsO mRNAs." Nucleic Acids Res. **31**(14): 4017-4023.

- Leino, M., Landgren, M. et Glimelius, K. (2005). "Alloplasmic effects on mitochondrial transcriptional activity and RNA turnover result in accumulated transcripts of Arabidopsis orfs in cytoplasmic male-sterile Brassica napus." *Plant J.* **42**(4): 469-480.
- Li, H. et Zassenhaus, H. P. (1999). "Purification and characterization of an RNA dodecamer sequence binding protein from mitochondria of Saccharomyces cerevisiae." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **261**(3): 740-745.
- Li, Z., Pandit, S. et Deutscher, M. P. (1998). "Polyadenylation of stable RNA precursors in vivo." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**(21): 12158-12162.
- Li, Z., Pandit, S. et Deutscher, M. P. (1999). "Maturation of 23S ribosomal RNA requires the exoribonuclease RNase T." *RNA* **5**(1): 139-146.
- Lisitsky, I., Klaff, P. et Schuster, G. (1996). "Addition of destabilizing poly (A)-rich sequences to endonuclease cleavage sites during the degradation of chloroplast mRNA." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**(23): 13398-13403.
- Lizama, L., Holuigue, L. et Jordana, X. (1994). "Transcription initiation sites for the potato mitochondrial gene coding for subunit 9 of ATP synthase (atp9)." *FEBS Lett.* **349**(2): 243-248.
- Lopilato, J., Bortner, S. et Beckwith, J. (1986). "Mutations in a new chromosomal gene of Escherichia coli K-12, pcnB, reduce plasmid copy number of pBR322 and its derivatives." *Mol. Gen. Genet.* **205**(2): 285-290.
- Lupold, D. S., Caoile, A. G. et Stern, D. B. (1999). "The maize mitochondrial cox2 gene has five promoters in two genomic regions, including a complex promoter consisting of seven overlapping units." *J. Biol. Chem.* **274**(6): 3897-3903.
- Lupold, D. S., Caoile, A. G. et Stern, D. B. (1999). "Polyadenylation occurs at multiple sites in maize mitochondrial cox2 mRNA and is independent of editing status." *Plant Cell* **11**(8): 1565-1578.
- Lurin, C., Andres, C., Aubourg, S., Bellaoui, M., Bitton, F., Bruyere, C., Caboche, M., Debast, C., Gualberto, J., Hoffmann, B., Lecharny, A., Le Ret, M., Martin-Magniette, M. L., Mireau, H., Peeters, N., Renou, J. P., Szurek, B., Taconnat, L. et Small, I. (2004). "Genome-wide analysis of Arabidopsis pentatricopeptide repeat proteins reveals their essential role in organelle biogenesis." *Plant Cell* **16**(8): 2089-2103.
- Lutz, K. A. et Maliga, P. (2001). "Lack of conservation of editing sites in mRNAs that encode subunits of the NAD(P)H dehydrogenase complex in plastids and mitochondria of Arabidopsis thaliana." *Curr. Genet.* **40**(3): 214-219.
- Mackie, G. A. (1998). "Ribonuclease E is a 5'-end-dependent endonuclease." *Nature* **395**(6703): 720-723.
- Maier, R. M., Neckermann, K., Igloi, G. L. et Kossel, H. (1995). "Complete sequence of the maize chloroplast genome: gene content, hotspots of divergence and fine tuning of genetic information by transcript editing." *J. Mol. Biol.* **251**(5): 614-628.
- Malek, O., Lattig, K., Hiesel, R., Brennicke, A. et Knoop, V. (1996). "RNA editing in bryophytes and a molecular phylogeny of land plants." *EMBO J.* **15**(6): 1403-1411.

- Maloney, A. P., Traynor, P. L., Levings, C. S., 3rd et Walbot, V. (1989). "Identification in maize mitochondrial 26S rRNA of a short 5'-end sequence possibly involved in transcription initiation and processing." *Curr. Genet.* **15**(3): 207-212.
- Maloney, A. P. et Walbot, V. (1990). "Structural analysis of mature and dicistronic transcripts from the 18 S and 5 S ribosomal RNA genes of maize mitochondria." *J. Mol. Biol.* **213**(4): 633-649.
- Marchfelder, A. et Brennicke, A. (1994). "Characterization and partial purification of tRNA processing activities from potato mitochondria." *Plant Physiol.* **105**(4): 1247-1254.
- Marchfelder, A., Brennicke, A. et Binder, S. (1996). "RNA editing is required for efficient excision of tRNA(Phe) from precursors in plant mitochondria." *J. Biol. Chem.* **271**(4): 1898-1903.
- Marchfelder, A., Schuster, W. et Brennicke, A. (1990). "In vitro processing of mitochondrial and plastid derived tRNA precursors in a plant mitochondrial extract." *Nucleic Acids Res.* **18**(6): 1401-1406.
- Marechal-Drouard, L., Cosset, A., Remacle, C., Ramamonjisoa, D. et Dietrich, A. (1996). "A single editing event is a prerequisite for efficient processing of potato mitochondrial phenylalanine tRNA." *Mol. Cell. Biol.* **16**(7): 3504-3510.
- Marechal-Drouard, L., Kumar, R., Remacle, C. et Small, I. (1996). "RNA editing of larch mitochondrial tRNA(His) precursors is a prerequisite for processing." *Nucleic Acids Res.* **24**(16): 3229-3234.
- Martin, G. et Keller, W. (2004). "Sequence motifs that distinguish ATP(CTP):tRNA nucleotidyl transferases from eubacterial poly(A) polymerases." *RNA* **10**(6): 899-906.
- Marujo, P. E., Hajnsdorf, E., Le Derout, J., Andrade, R., Arraiano, C. M. et Regnier, P. (2000). "RNase II removes the oligo(A) tails that destabilize the rpsO mRNA of *Escherichia coli*." *RNA* **6**(8): 1185-1193.
- Matsunaga, M. et Jaehning, J. A. (2004). "Intrinsic promoter recognition by a "core" RNA polymerase." *J. Biol. Chem.* **279**(43): 44239-44242.
- McDowall, K. J. et Cohen, S. N. (1996). "The N-terminal domain of the rne gene product has RNase E activity and is non-overlapping with the arginine-rich RNA-binding site." *J. Mol. Biol.* **255**(3): 349-355.
- McDowall, K. J., Hernandez, R. G., Lin-Chao, S. et Cohen, S. N. (1993). "The ams-1 and rne-3071 temperature-sensitive mutations in the ams gene are in close proximity to each other and cause substitutions within a domain that resembles a product of the *Escherichia coli* mre locus." *J. Bacteriol.* **175**(13): 4245-4249.
- McDowall, K. J., Kaberdin, V. R., Wu, S. W., Cohen, S. N. et Lin-Chao, S. (1995). "Site-specific RNase E cleavage of oligonucleotides and inhibition by stem-loops." *Nature* **374**(6519): 287-290.
- McDowall, K. J., Lin-Chao, S. et Cohen, S. N. (1994). "A+U content rather than a particular nucleotide order determines the specificity of RNase E cleavage." *J. Biol. Chem.* **269**(14): 10790-10796.

- Menassa, R., L'Homme, Y. et Brown, G. G. (1999). "Post-transcriptional and developmental regulation of a CMS-associated mitochondrial gene region by a nuclear restorer gene." *Plant J.* **17**(5): 491-499.
- Michel, F., Jacquier, A. et Dujon, B. (1982). "Comparison of fungal mitochondrial introns reveals extensive homologies in RNA secondary structure." *Biochimie* **64**(10): 867-881.
- Miczak, A., Kaberdin, V. R., Wei, C. L. et Lin-Chao, S. (1996). "Proteins associated with RNase E in a multicomponent ribonucleolytic complex." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**(9): 3865-3869.
- Militello, K. T. et Read, L. K. (1999). "Coordination of kRNA editing and polyadenylation in *Trypanosoma brucei* mitochondria: complete editing is not required for long poly(A) tract addition." *Nucleic Acids Res.* **27**(5): 1377-1385.
- Militello, K. T. et Read, L. K. (2000). "UTP-dependent and -independent pathways of mRNA turnover in *Trypanosoma brucei* mitochondria." *Mol. Cell. Biol.* **20**(7): 2308-2316.
- Mitchell, P., Petfalski, E., Shevchenko, A., Mann, M. et Tollervey, D. (1997). "The exosome: a conserved eukaryotic RNA processing complex containing multiple 3'→5' exoribonucleases." *Cell* **91**(4): 457-466.
- Mitchell, P., Petfalski, E. et Tollervey, D. (1996). "The 3' end of yeast 5.8S rRNA is generated by an exonuclease processing mechanism." *Genes Dev.* **10**(4): 502-513.
- Mohanty, B. K. et Kushner, S. R. (1999). "Analysis of the function of *Escherichia coli* poly(A) polymerase I in RNA metabolism." *Mol. Microbiol.* **34**(5): 1094-1108.
- Mohanty, B. K. et Kushner, S. R. (2000). "Polynucleotide phosphorylase functions both as a 3' right-arrow 5' exonuclease and a poly(A) polymerase in *Escherichia coli*." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**(22): 11966-11971.
- Mohanty, B. K. et Kushner, S. R. (2000). "Polynucleotide phosphorylase, RNase II and RNase E play different roles in the in vivo modulation of polyadenylation in *Escherichia coli*." *Mol. Microbiol.* **36**(4): 982-994.
- Mohanty, B. K. et Kushner, S. R. (2002). "Polyadenylation of *Escherichia coli* transcripts plays an integral role in regulating intracellular levels of polynucleotide phosphorylase and RNase E." *Mol. Microbiol.* **45**(5): 1315-1324.
- Mohanty, B. K. et Kushner, S. R. (2003). "Genomic analysis in *Escherichia coli* demonstrates differential roles for polynucleotide phosphorylase and RNase II in mRNA abundance and decay." *Mol. Microbiol.* **50**(2): 645-658.
- Monde, R. A., Schuster, G. et Stern, D. B. (2000). "Processing and degradation of chloroplast mRNA." *Biochimie* **82**(6-7): 573-582.
- Monéger, F., Smart, C. J. et Leaver, C. J. (1994). "Nuclear restoration of cytoplasmic male sterility in sunflower is associated with the tissue-specific regulation of a novel mitochondrial gene." *EMBO J.* **13**(1): 8-17.
- Morita, T., Kawamoto, H., Mizota, T., Inada, T. et Aiba, H. (2004). "Enolase in the RNA degradosome plays a crucial role in the rapid decay of glucose transporter mRNA in the response to phosphosugar stress in *Escherichia coli*." *Mol. Microbiol.* **54**(4): 1063-1075.

- Mulligan, R. M., Maloney, A. P. et Walbot, V. (1988). "RNA processing and multiple transcription initiation sites result in transcript size heterogeneity in maize mitochondria." *Mol. Gen. Genet.* **211**(3): 373-380.
- Nagaike, T., Suzuki, T., Katoh, T. et Ueda, T. (2005). "Human mitochondrial mRNAs are stabilized with polyadenylation regulated by mitochondria-specific poly(A) polymerase and polynucleotide phosphorylase." *J. Biol. Chem.* **280**(20): 19721-19727.
- Neuburger, M., Journet, E. P., Bligny, R., Carde, J. P. et Douce, R. (1982). "Purification of plant mitochondria by isopycnic centrifugation in density gradients of Percoll." *Arch. Biochem. Biophys.* **217**(1): 312-323.
- Notsu, Y., Masood, S., Nishikawa, T., Kubo, N., Akiduki, G., Nakazono, M., Hirai, A. et 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**(4): 434-445.
- O'Hara, E. B., Chekanova, J. A., Ingle, C. A., Kushner, Z. R., Peters, E. et Kushner, S. R. (1995). "Polyadenylation helps regulate mRNA decay in *Escherichia coli*." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**(6): 1807-1811.
- Oda, K., Yamato, K., Ohta, E., Nakamura, Y., Takemura, M., Nozato, N., Akashi, K., Kanegae, T., Ogura, Y., Kohchi, T. et al. (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): 1-7.
- Ono, M. et Kuwano, M. (1979). "A conditional lethal mutation in an *Escherichia coli* strain with a longer chemical lifetime of messenger RNA." *J. Mol. Biol.* **129**(3): 343-357.
- Ostheimer, G. J., Williams-Carrier, R., Belcher, S., Osborne, E., Gierke, J. et Barkan, A. (2003). "Group II intron splicing factors derived by diversification of an ancient RNA-binding domain." *Embo Journal* **22**(15): 3919-3929.
- Pepe, C. M., Maslesa-Galic, S. et Simons, R. W. (1994). "Decay of the IS10 antisense RNA by 3' exoribonucleases: evidence that RNase II stabilizes RNA-OUT against PNPase attack." *Mol. Microbiol.* **13**(6): 1133-1142.
- Pereira de Souza, A., Jubier, M. F., Delcher, E., Lancelin, D. et Lejeune, B. (1991). "A trans-splicing model for the expression of the tripartite *nad5* gene in wheat and maize mitochondria." *Plant Cell* **3**(12): 1363-1378.
- Perrin, R., Lange, H., Grienberger, J. M. et Gagliardi, D. (2004). "AtmtPNPase is required for multiple aspects of the 18S rRNA metabolism in *Arabidopsis thaliana* mitochondria." *Nucleic Acids Res.* **32**(17): 5174-5182.
- Perrin, R., Meyer, E. H., Zaepfel, M., Kim, Y. J., Mache, R., Grienberger, J. M., Gualberto, J. M. et Gagliardi, D. (2004). "Two Exoribonucleases Act Sequentially to Process Mature 3'-Ends of *atp9* mRNAs in *Arabidopsis* Mitochondria." *J. Biol. Chem.* **279**(24): 25440-25446.
- Piowowski, J., Grzechnik, P., Dziembowski, A., Dmochowska, A., Minczuk, M. et Stepień, P. P. (2003). "Human polynucleotide phosphorylase, hPNPase, is localized in mitochondria." *J. Mol. Biol.* **329**(5): 853-857.

- Puig, O., Caspary, F., Rigaut, G., Rutz, B., Bouveret, E., Bragado-Nilsson, E., Wilm, M. et Seraphin, B. (2001). "The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification." *Methods* **24**(3): 218-229.
- Py, B., Causton, H., Mudd, E. A. et Higgins, C. F. (1994). "A protein complex mediating mRNA degradation in *Escherichia coli*." *Mol. Microbiol.* **14**(4): 717-729.
- Py, B., Higgins, C. F., Krisch, H. M. et Carpousis, A. J. (1996). "A DEAD-box RNA helicase in the *Escherichia coli* RNA degradosome." *Nature* **381**(6578): 169-172.
- Quinones, V., Zanolungo, S., Holuigue, L., Litvak, S. et Jordana, X. (1995). "The *cox1* initiation codon is created by RNA editing in potato mitochondria." *Plant Physiol.* **108**(3): 1327-1328.
- Raijmakers, R., Noordman, Y. E., van Venrooij, W. J. et Pruijn, G. J. (2002). "Protein-protein interactions of hCsl4p with other human exosome subunits." *J. Mol. Biol.* **315**(4): 809-818.
- Rauhut, R. et Klug, G. (1999). "mRNA degradation in bacteria." *FEMS Microbiol. Rev.* **23**(3): 353-370.
- Raynal, L. C. et Carpousis, A. J. (1999). "Poly(A) polymerase I of *Escherichia coli*: characterization of the catalytic domain, an RNA binding site and regions for the interaction with proteins involved in mRNA degradation." *Mol. Microbiol.* **32**(4): 765-775.
- Regnier, P. et Arraiano, C. M. (2000). "Degradation of mRNA in bacteria: emergence of ubiquitous features." *Bioessays* **22**(3): 235-244.
- Regnier, P. et Hajnsdorf, E. (1991). "Decay of mRNA encoding ribosomal protein S15 of *Escherichia coli* is initiated by an RNase E-dependent endonucleolytic cleavage that removes the 3' stabilizing stem and loop structure." *J. Mol. Biol.* **217**(2): 283-292.
- Rosen, D. et Edelman, M. (1976). "Poly(A)-associated RNA from the mitochondrial fraction of the fungus *Trichoderma*." *Eur. J. Biochem.* **63**(2): 525-532.
- Rott, R., Zipor, G., Portnoy, V., Liveanu, V. et Schuster, G. (2003). "RNA polyadenylation and degradation in cyanobacteria are similar to the chloroplast but different from *Escherichia coli*." *J. Biol. Chem.* **278**(18): 15771-15777.
- Ryan, C. M., Militello, K. T. et Read, L. K. (2003). "Polyadenylation regulates the stability of *Trypanosoma brucei* mitochondrial RNAs." *J. Biol. Chem.* **278**(35): 32753-32762.
- Sachs, A. et Wahle, E. (1993). "Poly(A) tail metabolism and function in eucaryotes." *J. Biol. Chem.* **268**(31): 22955-22958.
- Sarkar, N. (1997). "Polyadenylation of mRNA in prokaryotes." *Annu. Rev. Biochem.* **66**: 173-197.
- Schuster, G., Lisitsky, I. et Klaff, P. (1999). "Polyadenylation and degradation of mRNA in the chloroplast." *Plant Physiol.* **120**(4): 937-944.
- Serino, G. et Maliga, P. (1998). "RNA polymerase subunits encoded by the plastid *rpo* genes are not shared with the nucleus-encoded plastid enzyme." *Plant Physiol.* **117**(4): 1165-1170.
- Simpson, L., Sbicego, S. et Aphasizhev, R. (2003). "Uridine insertion/deletion RNA editing in trypanosome mitochondria: a complex business." *RNA* **9**(3): 265-276.

- Slomovic, S., Laufer, D., Geiger, D. et Schuster, G. (2005). "Polyadenylation and Degradation of Human Mitochondrial RNA: the Prokaryotic Past Leaves Its Mark." Mol. Cell. Biol. **25**(15): 6427-6435.
- Small, I. D. et Peeters, N. (2000). "The PPR motif - a TPR-related motif prevalent in plant organellar proteins." Trends Biochem Sci. **25**(2): 46-47.
- Smith, H. C., Gott, J. M. et Hanson, M. R. (1997). "A guide to RNA editing." RNA **3**(10): 1105-1123.
- Sohlberg, B., Lundberg, U., Hartl, F. U. et von Gabain, A. (1993). "Functional interaction of heat shock protein GroEL with an RNase E-like activity in Escherichia coli." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90**(1): 277-281.
- Southern, E. M. (1975). "Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis." J. Mol. Biol. **98**(3): 503-517.
- Spahr, P. F. (1964). "Purification and Properties of Ribonuclease Ii from Escherichia Coli." J. Biol. Chem. **239**: 3716-3726.
- Spickler, C. et Mackie, G. A. (2000). "Action of RNase II and polynucleotide phosphorylase against RNAs containing stem-loops of defined structure." J. Bacteriol. **182**(9): 2422-2427.
- Srivastava, A. K. et Schlessinger, D. (1990). "Mechanism and regulation of bacterial ribosomal RNA processing." Annu. Rev. Microbiol. **44**: 105-129.
- Stepien, P. P., Margossian, S. P., Landsman, D. et Butow, R. A. (1992). "The yeast nuclear gene *suv3* affecting mitochondrial post-transcriptional processes encodes a putative ATP-dependent RNA helicase." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **89**(15): 6813-6817.
- Stern, D. B. et Gruissem, W. (1987). "Control of plastid gene expression: 3' inverted repeats act as mRNA processing and stabilizing elements, but do not terminate transcription." Cell **51**(6): 1145-1157.
- Sutton, C. A., Zoubenko, O. V., Hanson, M. R. et Maliga, P. (1995). "A plant mitochondrial sequence transcribed in transgenic tobacco chloroplasts is not edited." Mol. Cell. Biol. **15**(3): 1377-1381.
- Symmons, M. F., Jones, G. H. et Luisi, B. F. (2000). "A duplicated fold is the structural basis for polynucleotide phosphorylase catalytic activity, processivity, and regulation." Structure Fold. Des. **8**(11): 1215-1226.
- Symmons, M. F., Williams, M. G., Luisi, B. F., Jones, G. H. et Carpousis, A. J. (2002). "Running rings around RNA: a superfamily of phosphate-dependent RNases." Trends Biochem Sci. **27**(1): 11-18.
- Takemura, M., Oda, K., Yamato, K., Ohta, E., Nakamura, Y., Nozato, N., Akashi, K. et Ohyama, K. (1992). "Gene clusters for ribosomal proteins in the mitochondrial genome of a liverwort, *Marchantia polymorpha*." Nucleic Acids Res. **20**(12): 3199-3205.
- Takenaka, M. et Brennicke, A. (2003). "In vitro RNA editing in pea mitochondria requires NTP or dNTP, suggesting involvement of an RNA helicase." Journal of Biological Chemistry **278**(48): 47526-47533.
- Tang, H. V., Pring, D. R., Shaw, L. C., Salazar, R. A., Muza, F. R., Yan, B. et Schertz, K. F. (1996). "Transcript processing internal to a mitochondrial open reading frame is

- correlated with fertility restoration in male-sterile sorghum." *Plant J.* **10**(1): 123-133.
- Taraseviciene, L., Bjork, G. R. et Uhlin, B. E. (1995). "Evidence for an RNA binding region in the Escherichia coli processing endoribonuclease RNase E." *J. Biol. Chem.* **270**(44): 26391-26398.
- Temperley, R. J., Seneca, S. H., Tonska, K., Bartnik, E., Bindoff, L. A., Lightowers, R. N. et Chrzanowska-Lightowers, Z. M. (2003). "Investigation of a pathogenic mtDNA microdeletion reveals a translation-dependent deadenylation decay pathway in human mitochondria." *Hum. Mol. Genet.* **12**(18): 2341-2348.
- Tomecki, R., Dmochowska, A., Gewartowski, K., Dziembowski, A. et Stepien, P. P. (2004). "Identification of a novel human nuclear-encoded mitochondrial poly(A) polymerase." *Nucleic Acids Res.* **32**(20): 6001-6014.
- Tsudzuki, T., Wakasugi, T. et Sugiura, M. (2001). "Comparative analysis of RNA editing sites in higher plant chloroplasts." *J. Mol. Evol.* **53**(4-5): 327-332.
- Unseld, M., Marienfeld, J. R., Brandt, P. et Brennicke, A. (1997). "The mitochondrial genome of Arabidopsis thaliana contains 57 genes in 366,924 nucleotides." *Nat. Genet.* **15**(1): 57-61.
- Vaistij, F. E., Boudreau, E., Lemaire, S. D., Goldschmidt-Clermont, M. et Rochaix, J. D. (2000). "Characterization of Mbb1, a nucleus-encoded tetratricopeptide-like repeat protein required for expression of the chloroplast psbB/psbT/psbH gene cluster in Chlamydomonas reinhardtii." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**(26): 14813-14818.
- van Hoof, A., Lennertz, P. et Parker, R. (2000). "Yeast exosome mutants accumulate 3'-extended polyadenylated forms of U4 small nuclear RNA and small nucleolar RNAs." *Mol. Cell. Biol.* **20**(2): 441-452.
- Vanzo, N. F., Li, Y. S., Py, B., Blum, E., Higgins, C. F., Raynal, L. C., Krisch, H. M. et Carpousis, A. J. (1998). "Ribonuclease E organizes the protein interactions in the Escherichia coli RNA degradosome." *Genes Dev.* **12**(17): 2770-2781.
- Venema, J. et Tollervey, D. (1999). "Ribosome synthesis in Saccharomyces cerevisiae." *Annu. Rev. Genet.* **33**: 261-311.
- Vermel, M., Guermann, B., Delage, L., Grienenberger, J. M., Marechal-Drouard, L. et Gualberto, J. M. (2002). "A family of RRM-type RNA-binding proteins specific to plant mitochondria." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**(9): 5866-5871.
- Wahleithner, J. A., MacFarlane, J. L. et Wolstenholme, D. R. (1990). "A sequence encoding a maturase-related protein in a group II intron of a plant mitochondrial nad1 gene." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**(2): 548-552.
- Wallace, R. B., Shaffer, J., Murphy, R. F., Bonner, J., Hirose, T. et Itakura, K. (1979). "Hybridization of synthetic oligodeoxyribonucleotides to phi chi 174 DNA: the effect of single base pair mismatch." *Nucleic Acids Res.* **6**(11): 3543-3557.
- Walter, M., Kilian, J. et Kudla, J. (2002). "PNPase activity determines the efficiency of mRNA 3'-end processing, the degradation of tRNA and the extent of polyadenylation in chloroplasts." *EMBO J.* **21**(24): 6905-6914.
- Williams, M. A., Johzuka, Y. et Mulligan, R. M. (2000). "Addition of non-genomically encoded nucleotides to the 3'-terminus of maize mitochondrial mRNAs: truncated

- rps12 mRNAs frequently terminate with CCA." *Nucleic Acids Res.* **28**(22): 4444-4451.
- Wissinger, B., Schuster, W. et Brennicke, A. (1991). "Trans splicing in *Oenothera* mitochondria: nad1 mRNAs are edited in exon and trans-splicing group II intron sequences." *Cell* **65**(3): 473-482.
- Wyers, F., Rougemaille, M., Badis, G., Rousselle, J. C., Dufour, M. E., Boulay, J., Regnault, B., Devaux, F., Namane, A., Seraphin, B., Libri, D. et Jacquier, A. (2005). "Cryptic pol II transcripts are degraded by a nuclear quality control pathway involving a new poly(A) polymerase." *Cell* **121**(5): 725-737.
- Xu, F. et Cohen, S. N. (1995). "RNA degradation in *Escherichia coli* regulated by 3' adenylation and 5' phosphorylation." *Nature* **374**(6518): 180-183.
- Xu, F., Lin-Chao, S. et Cohen, S. N. (1993). "The *Escherichia coli* pcnB gene promotes adenylation of antisense RNAI of ColE1-type plasmids in vivo and degradation of RNAI decay intermediates." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**(14): 6756-6760.
- Yang, J., Schuster, G. et Stern, D. B. (1996). "CSP41, a sequence-specific chloroplast mRNA binding protein, is an endoribonuclease." *Plant Cell* **8**(8): 1409-1420.
- Yehudai-Resheff, S., Hirsh, M. et Schuster, G. (2001). "Polynucleotide phosphorylase functions as both an exonuclease and a poly(A) polymerase in spinach chloroplasts." *Mol. Cell. Biol.* **21**(16): 5408-5416.
- Yehudai-Resheff, S., Portnoy, V., Yogev, S., Adir, N. et Schuster, G. (2003). "Domain analysis of the chloroplast polynucleotide phosphorylase reveals discrete functions in RNA degradation, polyadenylation, and sequence homology with exosome proteins." *Plant Cell* **15**(9): 2003-2019.
- Yokobori, S. et Paabo, S. (1995). "Transfer RNA editing in land snail mitochondria." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**(22): 10432-10435.
- Zanduetta-Criado, A. et Bock, R. (2004). "Surprising features of plastid ndhD transcripts: addition of non-encoded nucleotides and polysome association of mRNAs with an unedited start codon." *Nucleic Acids Res.* **32**(2): 542-550.
- Zanlungo, S., Quinones, V., Moenne, A., Holuigue, L. et Jordana, X. (1995). "Splicing and editing of rps10 transcripts in potato mitochondria." *Curr. Genet.* **27**(6): 565-571.
- Zuo, Y. et Deutscher, M. P. (2001). "Exoribonuclease superfamilies: structural analysis and phylogenetic distribution." *Nucleic Acids Res.* **29**(5): 1017-1026.