

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE STRASBOURG I

Présentée à la
Faculté des Sciences de la Vie

En vue de l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE LOUIS PASTEUR

DOMAINE : BIOLOGIE MOLECULAIRE VEGETALE

présentée par

Thalia SALINAS

Mécanisme d'importation des ARN de transfert cytosoliques dans la mitochondrie de plante

Date de soutenance : 20 décembre 2006 devant la commission d'examen

**Pr. Claire REMACLE
Pr. Hans-Peter BRAUN
Pr. Mario KELLER
Dr. Jacques JOYARD
Dr. Laurence MARECHAL-DROUARD**

**Rapporteur externe
Rapporteur externe
Rapporteur interne
Examineur
Directeur de thèse**

*Institut de Biologie Moléculaire des Plantes
UPR-CNRS 2357*

TABLE DES MATIERES

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| INTRODUCTION | 1 |
| I. LA MITOCHONDRIE | 1 |
| 1. <i>Structure mitochondriale</i> | <i>1</i> |
| 1.1 Membrane externe | 1 |
| 1.2 Membrane interne | 1 |
| 1.3 L'espace matriciel | 2 |
| 2. <i>Fonctions mitochondriales</i> | <i>2</i> |
| 3. <i>Origine endosymbiotique de la mitochondrie</i> | <i>3</i> |
| 4. <i>Le génome mitochondrial</i> | <i>4</i> |
| 4.1 Transfert et perte des gènes | 4 |
| 4.2 Structure des génomes | 5 |
| 4.2.1 Contenu en gènes | 5 |
| 4.2.2 Taille des génomes | 5 |
| 4.2.3 Densité des génomes | 5 |
| 4.3 Particularités du code génétique dans les mitochondries | 6 |
| 5. <i>Le génome mitochondrial de plante</i> | <i>6</i> |
| 5.1 Particularités du génome mitochondrial de plante | 7 |
| 5.2 Contenu du génome | 7 |
| 6. <i>Expression du génome mitochondrial de plante</i> | <i>8</i> |
| 6.1 Transcription et mécanismes post-transcriptionnels | 8 |
| 6.2 Traduction mitochondriale | 9 |
| 7. <i>Importation des macromolécules dans les mitochondries de plante : les protéines et les acides nucléiques</i> | <i>9</i> |
| 7.1 Importation des protéines | 9 |
| 7.1.1 Protéines avec une préséquence en N-terminale | 10 |
| 7.1.2 Les protéines sans préséquence en N-terminale | 10 |
| 7.1.3 Importation des acides nucléiques | 11 |
| a. Importation in vitro d'ADN | 11 |
| b. Importation d'ARNt cytosoliques | 11 |
| II. DU GÈNE À L'ARNt CYTOSOLIQUE FONCTIONNEL | 12 |
| 1. <i>L'ARN de transfert</i> | <i>12</i> |
| 2. <i>Expression et maturation des ARNt cytosoliques</i> | <i>13</i> |
| 2.1 Expression des gènes d'ARNt nucléaires | 13 |
| 2.2 Maturation des ARNt nucléaires | 13 |
| 3. <i>Éléments d'identité pour l'aminocyclation des ARNt</i> | <i>14</i> |
| 4. <i>Exportation des ARNt du noyau vers le cytosol</i> | <i>16</i> |
| III. IMPORTATION DES ARNt DANS LES MITOCHONDRIES | 17 |
| 1. <i>Importation des ARNt</i> | <i>17</i> |
| 1.1 Préambule | 17 |
| 1.2 Les organismes concernés par le phénomène d'importation d'ARNt | 17 |
| 1.2.1 Les protozoaires | 17 |
| 1.2.2 Les champignons | 18 |
| 1.2.3 Les animaux | 18 |
| 1.2.4 Le règne végétal | 18 |
| a. Les « algues » | 19 |
| b. Les plantes | 19 |
| 1.3 Autres ARN importés | 20 |
| 1.4 Importation d'ARNt dans les chloroplastes | 21 |
| 2. <i>Les différents mécanismes d'importation des ARNt</i> | <i>21</i> |
| 2.1 Chez la levure <i>S. cerevisiae</i> (cas de l'ARNt ^{Lys} (CUU)) | 22 |
| 2.1.1 Rôle fonctionnel de l'ARNt ^{Lys} (CUU) | 23 |
| 2.1.2 Éléments requis pour l'importation | 24 |
| 2.1.3 Déterminants d'importation portés par l'ARNt ^{Lys} (CUU) | 24 |
| 2.1.4 Modèle d'importation de l'ARNt ^{Lys} (CUU) | 25 |
| 2.1.5 Cas des ARNt ^{Gln} | 25 |
| 2.2 Chez les protozoaires | 26 |
| 2.2.1 Éléments requis pour l'importation | 26 |
| 2.2.2 Signaux d'importation portés par les ARNt | 27 |
| a. Chez <i>Trypanosoma brucei</i> | 27 |

| | | |
|-------|--------------------------------------------------------|----|
| b. | Chez <i>Leishmania</i> | 27 |
| 2.2.3 | Cas de <i>Tetrahymena thermophila</i> | 28 |
| 2.2.4 | Modèle d'importation (cas de <i>Leishmania</i>) | 29 |
| 2.3 | Chez les plantes | 30 |
| 2.3.1 | Éléments requis pour l'importation | 30 |
| 2.3.2 | Rôle des aminoacyl-ARNt synthétases | 30 |
| 2.3.3 | Déterminants d'importation | 31 |
| 2.4 | Bilan | 32 |

TRAVAUX DE THÈSE.....34

MATERIEL ET METHODES.....36

| | | |
|-------|----------------------------------------------------------------------|----|
| I. | MATERIEL | 36 |
| 1. | Matériel végétal | 36 |
| 2. | Souches bactériennes | 36 |
| 2.1 | Souches <i>Escherichia coli</i> | 36 |
| 2.2 | Souche <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | 36 |
| 3. | Plasmides | 37 |
| 4. | Constructions | 38 |
| 5. | Anticorps polyclonaux | 39 |
| 6. | Oligonucléotides | 40 |
| 7. | Outils informatiques | 40 |
| II. | METHODES | 41 |
| 1. | Techniques spécifiques à l'ADN | 41 |
| 1.1 | Amplification par PCR (« Polymerase Chain Reaction ») | 41 |
| 1.2 | Mutagenèse par PCR | 42 |
| 1.2.1 | Mutations ou délétions aux extrémités des gènes (Figure 15A) | 42 |
| 1.2.2 | Mutations ou délétions à l'intérieur des gènes (Figure 15B) | 42 |
| 1.2.3 | Gènes chimériques (Figure 15C) | 42 |
| 1.3 | Électrophorèse sur gel d'agarose | 42 |
| 1.4 | Purification des fragments d'ADN issus de gels d'agarose | 43 |
| 1.5 | Techniques de clonage | 43 |
| 1.5.1 | Clonage de fragments coupés par des enzymes de restriction | 43 |
| a. | Digestion par des enzymes de restriction | 43 |
| b. | Ligation | 43 |
| c. | Transformation et sélection | 44 |
| 1.5.2 | Clonage direct d'un produit PCR | 44 |
| a. | Principe | 44 |
| b. | Méthode | 45 |
| 1.6 | Criblage de colonies par PCR | 45 |
| 1.7 | Préparation de l'ADN plasmidique | 45 |
| 1.7.1 | Minipréparation d'ADN plasmidique | 45 |
| 1.7.2 | Midipréparation d'ADN plasmidique | 46 |
| 1.8 | Séquençage de l'ADN | 46 |
| 1.9 | Marquage d'oligonucléotides | 46 |
| 2. | Techniques spécifiques à l'ARN | 47 |
| 2.1 | Extraction d'ARN | 47 |
| 2.1.1 | ARN de cellules ou de cals de tabac | 47 |
| 2.1.2 | ARN mitochondriaux | 47 |
| 2.2 | Electrophorèse dénaturante sur gel de polyacrylamide | 47 |
| 2.3 | « Northern blot » | 48 |
| 2.3.1 | Transfert des ARN | 48 |
| 2.3.2 | Hybridation de la sonde | 48 |
| 2.4 | Transcription <i>in vitro</i> | 49 |
| 2.4.1 | Transcription non radioactive (Figure 16) | 49 |
| 2.4.2 | Transcription radioactive | 49 |
| 2.5 | Détermination de l'activité aminoacceptrice des ARNt | 50 |
| 2.5.1 | Préparation des extraits enzymatiques | 50 |
| a. | Extrait enzymatique total d'hypocotyles de haricot | 50 |
| b. | Extrait enzymatique « mitochondrial » d'hypocotyles de haricot | 51 |
| 2.5.2 | Cinétiques d'aminocyclation <i>in vitro</i> | 51 |
| 3. | Quantification de l'ADN et de l'ARN | 52 |
| 4. | Techniques relatives aux protéines | 52 |
| 4.1 | Quantification des protéines | 52 |
| 4.2 | Techniques de concentration de protéines | 53 |

| | | |
|-------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.2.1 | Précipitation à l'acétone..... | 53 |
| 4.2.2 | Cellule de concentration (« centrifugal filter devices » Amicon corporation)..... | 53 |
| 4.3 | Electrophorèse sur gel de polyacrylamide..... | 54 |
| 4.3.1 | Electrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)..... | 54 |
| 4.3.2 | Electrophorèse en conditions natives : Bleu Natif (BN-PAGE)..... | 54 |
| a. | Solubilisation des complexes membranaires mitochondriaux..... | 55 |
| b. | Première dimension..... | 55 |
| c. | Deuxième dimension..... | 55 |
| 4.4 | Détection des protéines après fractionnement électrophorétique..... | 56 |
| 4.5 | Immunorévélation de type « western blot »..... | 56 |
| 4.5.1 | Transfert des protéines sur membrane..... | 56 |
| 4.5.2 | Coloration des protéines après électrotransfert sur membrane..... | 56 |
| 4.5.3 | Fixation des anticorps..... | 57 |
| 4.5.4 | Révélation de la fixation des anticorps..... | 57 |
| 4.6 | Techniques permettant d'identifier l'interaction protéine/ARN..... | 57 |
| 4.6.1 | Technique de « northwestern »..... | 57 |
| 4.6.2 | Technique du gel retard..... | 58 |
| a. | Préparation de l'échantillon..... | 58 |
| b. | Préparation du gel..... | 59 |
| 4.7 | Surexpression de protéines dans <i>E.coli</i> | 59 |
| 4.8 | Techniques de purification de protéines..... | 59 |
| 4.8.1 | Petites préparations (3mL)..... | 60 |
| 4.8.2 | Grandes préparations (500 mL)..... | 60 |
| a. | Conditions natives..... | 61 |
| b. | Conditions dénaturantes..... | 61 |
| 5. | <i>Transformation des cellules végétales par Agrobacterium tumefaciens</i> | 61 |
| 6. | <i>Techniques relatives aux mitochondries de plantes</i> | 62 |
| 6.1 | Purification de mitochondries..... | 62 |
| 6.1.1 | Mitochondries de pomme de terre..... | 62 |
| 6.1.2 | Mitochondries de haricot..... | 63 |
| 6.1.3 | Mitochondries de cellules de tabac BY2..... | 63 |
| 6.2 | Traitement trypsique des mitochondries de pomme de terre..... | 64 |
| 6.3 | Fractionnement fait sur les mitochondries de pomme de terre : mitoplastes et membrane externe..... | 65 |
| 6.4 | Importation <i>in vitro</i> de protéines dans les mitochondries isolées de pommes de terre..... | 66 |
| 6.4.1 | Transcription et traduction <i>in vitro</i> | 66 |
| 6.4.2 | Test d'importation <i>in vitro</i> dans les mitochondries..... | 66 |
| 6.5 | Importation d'ARNt <i>in vitro</i> dans les mitochondries isolées..... | 67 |
| 6.6 | Expérience de fixation d'ARNt <i>in vitro</i> à la surface mitochondriale..... | 68 |

RESULTATS-DISCUSSION 70

CHAPITRE I ETUDE DE LA SPÉCIFICITÉ D'IMPORTATION DES ARNT CYTOSOLIQUES DANS LA MITOCHONDRIE DE PLANTE : LE MODÈLE DES ARNT^{GLY} ISOACCEPTEURS..... 70

| | | |
|-------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. | <i>L'importation des ARNt est un mécanisme spécifique</i> | 70 |
| 2. | <i>Etude des déterminants d'importation sur les ARNt</i> | 70 |
| 2.1 | Choix du modèle : les ARNt ^{Gly} des plantes dicotylédones..... | 71 |
| 2.1.1 | Importation sélective des ARNt ^{Gly} isoaccepteurs chez les plantes dicotylédones..... | 71 |
| 2.1.2 | Deux glycyL-ARNt synthétases sont importées dans le cytosol..... | 72 |
| 2.2 | Etude des déterminants d'importation des ARNt ^{Gly} | 73 |
| | Article 1..... | 73 |
| 3. | <i>Discussion</i> | 76 |
| 3.1 | Acheminement..... | 76 |
| 3.2 | Passage à travers les membranes..... | 77 |
| 3.3 | A l'intérieur des mitochondries..... | 78 |

CHAPITRE II IDENTIFICATION DE PROTÉINES MEMBRANAIRES MITOCHONDRIALES IMPLIQUÉS DANS L'IMPORTATION DES ARNT CHEZ LES PLANTES 80

| | | |
|-------|-------------------------------------------------------------------|----|
| 1. | <i>Etude des protéines de la membrane externe</i> | 81 |
| 1.1 | Etude du rôle de la protéine VDAC dans le transport des ARNt..... | 81 |
| | Article 2..... | 81 |
| 1.2 | Etude du rôle de la protéine TOM20..... | 84 |
| 1.2.1 | Les protéines TOM20 de plantes..... | 85 |

| | | |
|-------|---------------------------------------------------------------------|----|
| 1.2.2 | Surexpression de TOM20-1 de pomme de terre | 86 |
| 1.2.3 | Northwestern avec deTOM20-1 de pomme de terre | 87 |
| 1.2.4 | Gel-retard avec TOM20-3 d' <i>A. thaliana</i> | 87 |
| 2. | <i>Protéines de la membrane interne</i> | 89 |
| 2.1 | Transporteur ADP/ATP ou ANT | 90 |
| 2.2 | Complexe TIM..... | 91 |
| 2.3 | Sous-unité gamma de l'ATP synthase | 92 |
| 3. | <i>Modèle proposé</i> | 93 |
| 3.1 | Adressage des ARNt aux mitochondries | 93 |
| 3.2 | Interaction des ARNt avec le récepteur de la membrane externe | 94 |
| 3.3 | Passage des ARNt à travers la membrane externe | 94 |
| 3.3.1 | La protéine VDAC | 94 |
| 3.3.2 | Du récepteur à VDAC..... | 95 |
| 3.3.3 | Spécificité de la protéine VDAC | 95 |
| 3.3.4 | Structure des ARNt lors du passage à travers les membranes | 96 |
| 3.4 | Passage des ARNt à travers la membrane interne | 96 |
| 3.5 | Au niveau de la mitochondrie | 97 |

CHAPITRE III ETUDE DE L'INTERACTION DE LA PROTÉINE VDAC DE POMME DE TERRE AVEC L'ARNt 98

| | | |
|-----|----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 1. | <i>Les protéines VDAC</i> | 98 |
| 1.1 | Caractéristiques des protéines VDAC | 98 |
| 1.2 | Différents isoformes avec différentes fonctions ?..... | 99 |
| 2. | <i>Les protéines VDAC de pomme de terre</i> | 100 |
| 3. | <i>Choix des mutations</i> | 101 |
| 3.1 | Structure secondaire des protéines VDAC | 101 |
| 3.2 | Les constructions mutantes | 103 |
| 3.3 | Protéines chimères | 103 |
| 3.4 | Mutants de délétion..... | 104 |
| 4. | <i>Analyse par northwestern de l'interaction des différentes constructions avec les ARNt</i> | 104 |
| 4.1 | Protéines chimères | 105 |
| 4.2 | Mutants de délétion..... | 105 |
| 5. | <i>Discussion</i> | 105 |

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES..... 110

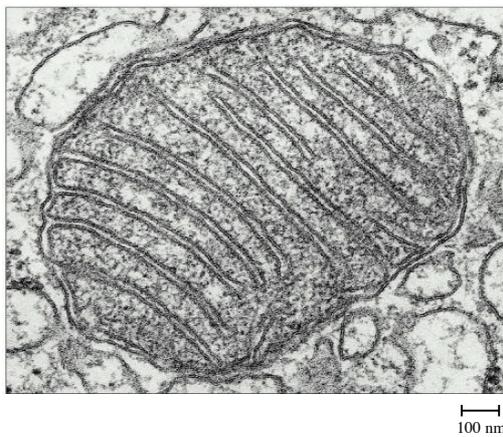
| | | |
|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 1. | <i>Conclusion générale : récapitulatif des résultats</i> | 110 |
| 1.1 | Déterminants d'importation | 110 |
| 1.2 | Facteurs membranaires impliqués dans l'importation | 110 |
| 1.3 | Eléments d'interaction entre VDAC et l'ARNt..... | 111 |
| 2. | <i>Perspectives dans l'étude du mécanisme d'importation des ARNt dans les mitochondries de plantes</i> | 112 |
| 2.1 | Comprendre la spécificité d'importation des ARNt..... | 112 |
| 2.2 | Le rôle de VDAC34 dans l'importation des ARNt | 114 |
| 2.3 | Etude des facteurs protéiques impliqués dans le mécanisme d'importation des ARNt..... | 115 |
| 2.3.1 | Au niveau de la membrane externe | 115 |
| 2.3.2 | Au niveau de la membrane interne | 116 |
| 3. | <i>Discussion générale : les systèmes d'importation des ARNt chez les différents organismes modèles</i> | 117 |
| 4. | <i>Importation des ARNt et voies thérapeutiques humaines</i> | 120 |

BIBLIOGRAPHIE 122

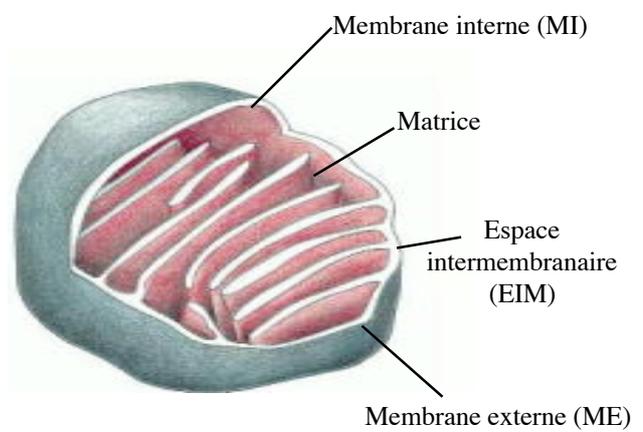
ABREVIATIONS

| | |
|--------------|---------------------------------------------------------------|
| ADN | Acide désoxyribonucléique |
| ADNc | Acide désoxyribonucléique complémentaire |
| ADP | Adénosine-5'-diphosphate |
| APS | Persulfate d'ammonium |
| ARN | Acide ribonucléique |
| ARNm | ARN messenger |
| ARNt | ARN de transfert |
| ATP | Adénosine 5'-triphosphate |
| BET | Bromure d'éthidium |
| BSA | Sérumalbumine bovine |
| Ci | Curie |
| CTP | Cytidine 5'-triphosphate |
| cpm | coups par minutes |
| ddNTP | Didésoxyribonucléoside triphosphate |
| °C | Degré(s) Celsius |
| Dnase | Désoxyribonucléase |
| dNTP | Désoxyribonucléoside triphosphate |
| DTT | Dithiothréitol |
| EDTA | Acide éthylène diamine tétraacétique |
| EGTA | Ethylène glycol tétraacétate |
| FAD | Flavine adénine dinucléotide |
| GFP | « Green Fluorescent Protein » |
| GTP | Guanosine 5'-triphosphate |
| HEPES | acide (N-[2-hydroxyéthyl] pipérazine-N'[2-éthane sulfonique]) |
| IPTG | Isopropyl-β-D-thiogalactoside |
| JPVBL | Juste pour vérifier que vous avez bien lu :-) |
| kDa | Kilo Dalton |
| kb | Kilopaire de bases |
| LB | Luria broth |
| mA | Milliampère |

| | |
|----------------|--------------------------------------------------|
| μF | Micro Farad |
| NAD9 | Sous-unité 9 de la NADH déshydrogénase |
| NAD | Nicotinamide adénine dinucléotide |
| NP40 | Nonidet P40 |
| nt | Nucléotide(s) |
| NTP | Nucléoside triphosphate |
| PCR | Polymerase Chain Reaction |
| PMSF | Phénylméthylsulfonylfluoride |
| p/v | Poids par volume |
| PVP | Polyvinylpyrrolidone |
| qsp | Quantité suffisante pour |
| RIC | RNA import complex |
| RNase | Ribonucléase |
| RNasine | Inhibiteur de ribonucléase |
| S | Unité de Svedberg |
| SDS | Dodécyl sulfate de sodium |
| SSC | Standard sodium citrate |
| TAE | Tris-acétate-EDTA |
| TE | Tris-EDTA |
| TBE | Tris-borate-EDTA |
| TEMED | N,N,N',N'-tétraméthyléthylène diamine |
| TIM | Translocase of the Mitochondrial inner Membrane |
| TOM | Translocase of the Mitochondrial outer Membrane |
| Tris | Tris(hydroxyméthyl)aminométhane |
| U | Unité enzymatique |
| UTP | Uridine 5'-triphosphate |
| UV | Ultra-violet |
| v/v | Volume par volume |
| VDAC | Voltage Dependant Anion Channel |
| W | Watt |
| X-GAL | 5-bromo-4-chloro-3-indole-β-D-galactopyrranoside |



A



B

Figure 1 : La mitochondrie (d'après Alberts et *al.*, 1995)

A : vue en microscopie électronique

B : Organisation structurale de la mitochondrie

INTRODUCTION

I. La mitochondrie

Les mitochondries sont des organites présents dans toutes les cellules eucaryotes à l'exception de certains protistes primitifs (Cavalier-Smith, 1987). Bien que leur fonction principale soit la production d'ATP via la phosphorylation oxydation, elles présentent une grande diversité dans l'abondance, l'activité enzymatique, la composition en protéines et en lipides, en fonction du type de tissu, du stade de développement et des réponses du milieu environnant.

1. Structure mitochondriale

Malgré leur diversité, la structure des mitochondries reste très similaire (Figure 1). Elles comprennent deux membranes très différentes dans leur composition et leurs fonctions : la membrane externe (ME) et la membrane interne (MI). Ces deux membranes délimitent l'espace inter-membranaire (EIM) puis l'espace matriciel.

1.1 Membrane externe

La membrane externe est perméable à toutes les molécules de 5 kDa ou moins (ATP, NAD(P)H, malate, etc), grâce à la présence de porines (Figure2). Ces porines mitochondriales connues également sous le nom de VDAC (« Voltage Dependent Anion Channel ») car elles forment de larges canaux anioniques voltage dépendant dans des membranes reconstituées, sont les protéines majoritaires de la membrane externe (Figure 2). La membrane externe contient également les protéines du complexe TOM (« Translocase of the Outer Membrane ») d'importation des protéines (Alberts et al., 1995).

1.2 Membrane interne

La membrane interne est fortement imperméable et se replie pour former de nombreuses crêtes (cristae), ce qui a pour conséquence d'augmenter sa surface totale. Sa

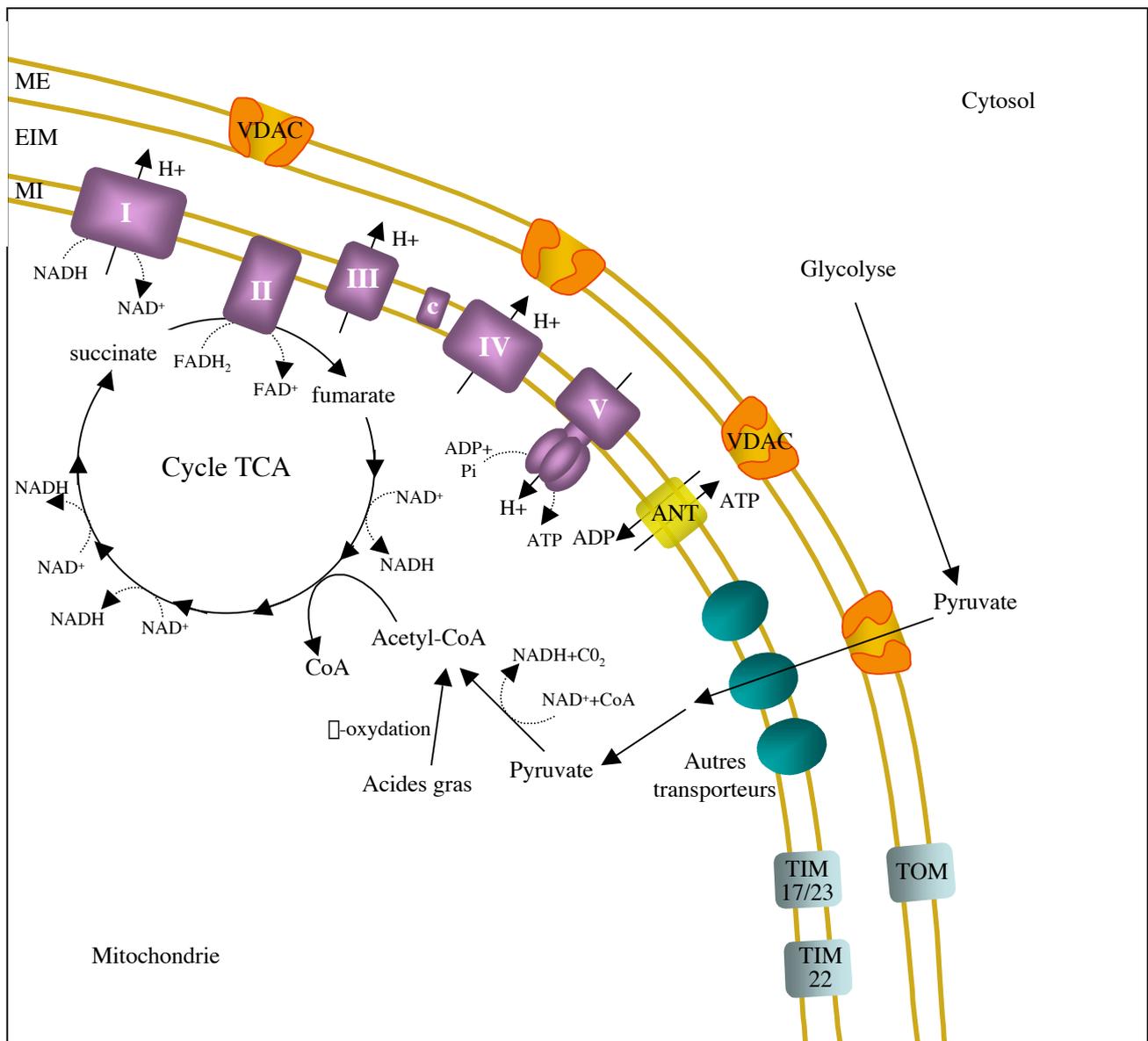


Figure 2 : Représentation schématique des deux membranes mitochondriales et de quelques protéines les composants

Au niveau de la membrane externe sont représentés les protéines VDAC et le complexe TOM.

Au niveau de la membrane interne sont représentés les différents complexes de la chaîne respiratoire (I à V), le transporteur ADP/ATP (ANT) et le complexe TIM (TIM17/23 et TIM22).

Des points de contact entre la membrane externe et la membrane interne existent entre les complexes TOM et TIM et entre VDAC et l'ANT.

Sont également représentées les principales étapes de la production d'ATP.

composition lipidique est particulière : elle contient une majorité de phosphatidylcholine et de cardiolipine. La cardiolipine qui est exclusivement mitochondriale semble jouer un rôle important dans l'assemblage ou dans le maintien dans une conformation fonctionnelle des complexes protéiques de la membrane interne (Schlame and Greenberg, 1997).

Cette membrane interne a également la particularité d'avoir le rapport protéine/lipide (75 %) le plus élevé de toutes les membranes biologiques étudiées (Scheffler, 1999) (Figure 2). En effet, cette membrane inclut les quatre complexes de la chaîne respiratoire, l'ATP synthase (Gilkerson et al., 2003) et de nombreux transporteurs qui assurent le passage d'éléments tels que le pyruvate, les acide gras, l'ATP et l'ADP (Picault et al., 2004; Arco and Satrustegui, 2005). Parmi ces transporteurs se trouve le transporteur ADP/ATP ou ANT (« Adenine Nucleotide translocator ») qui est la protéine majoritaire de la membrane interne (Klingenberg, 1989). Finalement, la membrane interne contient les protéines du complexe TIM (« Translocase of the Inner Membrane ») d'importation des protéines et qui avec le complexe TOM au niveau de la membrane externe constituent des points de contact entre les deux membranes.

1.3 L'espace matriciel

Dans l'espace matriciel, se trouvent de nombreuses enzymes nécessaires aux différentes fonctions de la mitochondrie (voir ci-dessous). Il renferme également plusieurs copies du génome mitochondrial ainsi que les éléments (protéines et ARN) nécessaires à sa transcription puis à la traduction de l'ARNm en protéines. La synthèse protéique mitochondriale ne concerne cependant qu'un nombre restreint de protéines car la grande majorité des protéines mitochondriales sont codées par le génome nucléaire et importées dans la mitochondrie.

2. Fonctions mitochondriales

Les fonctions mitochondriales incluent différentes voies de synthèse (acides gras, acides aminés, vitamines et hème), des voies de catabolisme (acides gras et acides aminés) ainsi que le système de régulation de la concentration intracellulaire de calcium (Voet and Voet, 1990; Alberts et al., 1995; Scheffler, 1999).

Toutefois, la fonction principale des mitochondries réside dans leur rôle de « centrale énergétique » dans les cellules eucaryotes (Figure 2). Le pyruvate généré par la glycolyse

entre dans la mitochondrie où il est transformé en acetyl-CoA qui est métabolisé par le cycle de l'acide tricarboxylique (cycle de Krebs ou TCA). La fixation du pyruvate sur le coenzyme A, la β -oxydation et le TCA sont couplés à la formation d'équivalents réducteurs comme le NADH ou le FADH₂. Ces molécules sont ensuite régénérées dans leur forme originelle oxydée par le transfert de leur énergie chimique à la chaîne respiratoire. Ce transfert d'électrons est couplé au relargage de protons dans l'espace intermembranaire. Il en résulte un gradient de protons entre l'espace inter membranaire et l'espace matriciel et c'est le flux dynamique des protons vers la matrice à travers l'ATP synthase qui permet la production d'ATP. Les mitochondries de plantes se caractérisent par la présence de voies respiratoires alternatives, utilisant les alternatives oxydases (Escobar et al., 2004) et les deshydrogénases alternatives (Rasmusson et al., 2004).

Une autre fonction importante des mitochondries est leur implication dans la mort cellulaire programmée. Chez les mammifères, ce processus se traduit par la sortie du cytochrome *c*, un transporteur d'électrons de la chaîne respiratoire, à travers un pore qui est le « Permeability Transition Pore Complex » ou PTPC dont les principaux composants sont les protéines VDAC et ANT. Le cytochrome *c* ainsi relargué dans le cytoplasme participe à l'assemblage d'un complexe protéique (apoptosome), responsable de l'activation de protéases, enzymes protéolytiques appelées caspases (Zamzami and Kroemer, 2001). Chez les plantes l'implication des cytochromes *c* dans la mort cellulaire programmée a aussi été récemment décrite (Balk and Leaver, 2001).

3. Origine endosymbiotique de la mitochondrie

La théorie endosymbiotique qui postule qu'une bactérie ancestrale serait à l'origine des mitochondries est désormais complètement admise (Gray et al., 1999). Le nombre croissant de génomes mitochondriaux entièrement séquencés ainsi que des multiples analyses génomiques indiquent que les mitochondries dérivent d'une α -protéobactérie (Gray et al., 2001; Burger and Lang, 2003; Rivera and Lake, 2004) proche de *Rickettsia prowazekii* dont le génome de 1111 kb code pour 834 protéines (Andersson et al., 1998a). Le génome mitochondrial du protiste *Reclinomonas americana* constitue le plus ancien génome mitochondrial séquencé à ce jour (Lang et al., 1997). Notons que sa taille est de 69 kb et qu'il ne comporte plus que 97 gènes. Ces deux génomes, celui de *R. prowazeki* et de *R. americana*, illustrent la plus petite différence évolutive connue aujourd'hui entre une

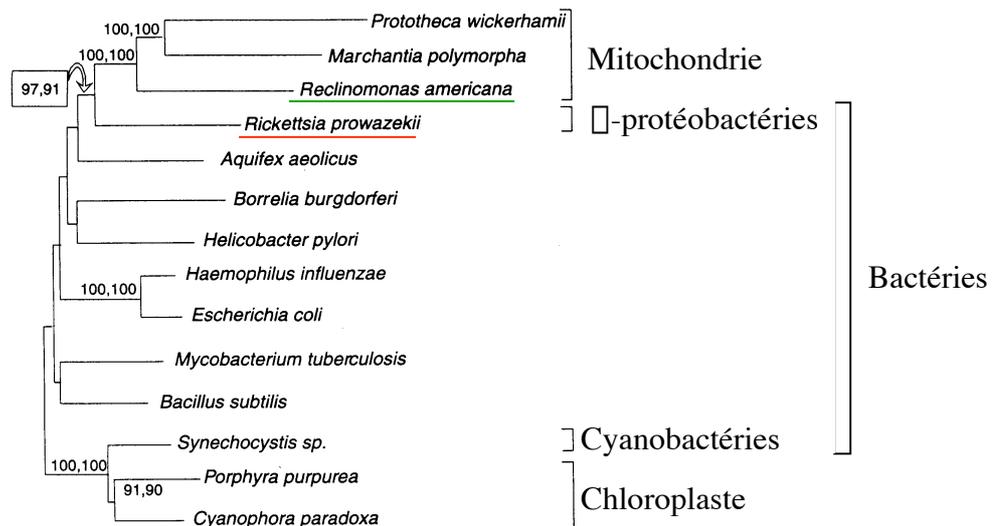


Figure 3 : Arbre phylogénétique basé sur la comparaison de séquences de protéines ribosomales (d'après Andersson *et al.*, 1998).

Relation entre des séquences peptidiques de protéines ribosomales bactériennes, mitochondriales et chloroplastiques, selon la méthode du plus proche voisin. Les valeurs de solidité des embranchements supérieures à 90 % sont indiquées. Séquences considérées : RPS (protéines ribosomales de la petite sous-unité) 2, 3, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 19 et RPL (protéines ribosomales de la grande sous-unité) 5, 6 et 16.

En rouge est souligné le génome de *Rickettsia prowazekii*, génome bactérien supposé être le plus proche de celui de l'ancêtre de la mitochondrie actuelle.

En vert est souligné le génome mitochondrial de *Reclinomonas americana*, l'organisme eucaryote vivant dont le génome mitochondrial est le plus proche de celui des α -protéobactéries.

mitochondrie primitive et une bactérie ancestrale originelle (Figure 3). Depuis, les mitochondries ont évolué de manière divergente à travers les différents types d'organismes. Cela les a conduites à obtenir des caractéristiques spécifiques dans la structure et dans l'expression de leur génome.

Il est à noter également que la cellule végétale, à la différence des autres cellules eucaryotes, possède un deuxième organite, le chloroplaste, issu d'un second événement endosymbiotique entre une cyanobactérie et la cellule eucaryotique (Dyall et al., 2004).

4. Le génome mitochondrial

4.1 Transfert et perte des gènes

Au cours de l'évolution, depuis l'endosymbiote jusqu'à la mitochondrie actuelle, les génomes mitochondriaux ont perdu une grande partie de leurs séquences codantes provenant du génome ancestral. Pour donner une idée de la sévérité de cette réduction, le génome de *Reclinomonas americana* contient seulement 11,6 % des gènes présents dans le génome de *Rickettsia prowazekii*. Certains gènes ont totalement disparu, d'autres ont été transférés vers le noyau (Adams et al., 2002) ou bien ils ont été remplacés par d'autres gènes (Adams and Palmer, 2003). Une fois dans le noyau, ces gènes ont pu être dupliqués, diversifiés et ont acquis des séquences d'adressage (Martin et al., 2002). Ce transfert vers le noyau est un phénomène qui continue encore actuellement à se produire. Chez les angiospermes, des récents et fréquents transferts fonctionnels ont été démontrés (Adams et al., 2002). La présence dans le génome nucléaire de grands fragments d'ADN mitochondriaux (Martin et al., 2003) ainsi que de gènes provenant de transcrits mitochondriaux édités retrotranscrits (Nugent and Palmer, 1991) laissent penser que le transfert de gènes s'est fait à la fois via l'ARN et l'ADN.

Une conséquence de ce transfert de gènes est que seule une petite fraction des protéines sont codées par le génome mitochondrial (8 protéines sur 750 pour la levure *S. cerevisiae* (Sickmann et al., 2003), 13 protéines sur 1500 pour l'homme (Taylor et al., 2003), 32 protéines sur 2000 à 3000 pour *A. thaliana* (Millar et al., 2005). Ainsi 99 % des protéines mitochondriales sont codées par le noyau, synthétisées dans le cytosol puis importées dans les mitochondries via la machinerie d'importation.

| Produit / gène | Nombre de gènes | | | | | |
|-----------------------------------------------------|-----------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | <i>A.t.</i> | <i>M.p.</i> | <i>C.r.</i> | <i>H.s.</i> | <i>S.c.</i> | <i>R.a.</i> |
| Complexes respiratoires | | | | | | |
| Complexe I (NADH déshydrogénase) / <i>nad</i> | 9 | 8 | 5 | 7 | 0 | 12 |
| Complexe II (Succinate déshydrogénase) / <i>sdh</i> | 1 | 2 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| Complexe III (Cytochrome c réductase) / <i>cob</i> | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Complexe IV (Cytochrome c oxydase) / <i>cox</i> | 3 | 3 | 1 | 3 | 3 | 3 |
| Complexe V (ATP synthétase) / <i>atp</i> | 5 | 4 | 0 | 2 | 3 | 5 |
| Biogenèse cytochrome c | | | | | | |
| Biogenèse des cytochromes c / <i>ccm</i> | 4 | 5 | 0 | 0 | 0 | 5 |
| Traduction | | | | | | |
| Protéines ribosomales / <i>rps - rpl</i> | 7 | 16 | 0 | 0 | 1 | 27 |
| ARNr / <i>rrn</i> | 3 | 3 | 2 | 2 | 2 | 3 |
| ARNt / <i>trn</i> | 22 | 29 | 3 | 22 | 24 | 26 |
| Autres | | | | | | |
| Gène intronique (Maturase) | 1 | 10 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| ARN polymérase / <i>rpo</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 |
| Composante ARN de la RNase P | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| Import de protéine / <i>secY</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Facteurs d'élongation / <i>tufA</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Total (ORF exclues) | 57 | 81 | 13 | 37 | 35 | 92 |

Table 1: Composition des génomes mitochondriaux.

Comparaison de l'information génétique présente dans les génomes mitochondriaux de divers organismes (d'après Unseld *et al.*, 1997).

Arabidopsis thaliana (*A.t.*), *Marchantia polymorpha* (*M.p.*), *Chlamydomonas reinhardtii* (*C.r.*), *Homo sapiens* (*H.s.*), *Saccharomyces cerevisiae* (*S.c.*) et *Reclinomonas americana* (*R.a.*).

4.2 Structure des génomes

4.2.1 Contenu en gènes

De façon générale, les génomes mitochondriaux codent pour les protéines de la chaîne respiratoire et pour les éléments de la machinerie traductionnelle, ARNr et ARNt (Table 1). Les génomes mitochondriaux de plantes supérieures et de protistes ont la particularité de coder également pour des protéines ribosomales et des protéines de la biogenèse du cytochrome *c*.

4.2.2 Taille des génomes

La taille des génomes mitochondriaux est très variable (Figure 4). Elle peut varier entre 15 à 16 kpb pour les animaux jusqu'à 570 kpb pour les plantes. Il existe cependant des exceptions. Le *Plasmodium falciparum* (l'agent de la malaria) possède un génome mitochondrial de seulement 6 kpb (Feagin, 2000) alors que pour certaines espèces de cucurbitacées il a été proposé que la taille du génome mitochondrial pourrait être supérieure à 2400 kpb (Ward et al., 1981).

4.2.3 Densité des génomes

Cette grande variabilité dans la taille des génomes n'est toutefois pas corrélée avec le nombre de gènes (Table 1). Par exemple, le génome mitochondrial d'*Arabidopsis thaliana* est 22 fois plus grand que celui de l'homme, mais il ne porte qu'une fois et demi plus de gènes (37 gènes pour l'homme et 57 gènes pour *A. thaliana*). La différence en taille est principalement due à la taille et à l'organisation des régions intergéniques. Par exemple le génome mitochondrial de l'homme est très compact et ne possède aucune région intergénique alors que les génomes de plantes possèdent de grandes régions intergéniques. Chez les plantes, ces régions intergéniques sont composées d'éléments mobiles et de séquences répétées qui vont permettre une recombinaison dynamique du génome (Andre et al., 1992; Palmer et al., 2000).

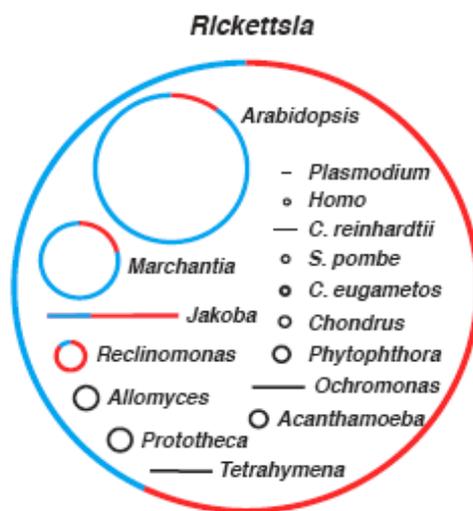


Figure 4 : Comparaison des différentes tailles de génomes mitochondriaux (d'après Gray et al., 1999).

En bleu sont représentées les régions identifiées et en rouge sont représentées les régions non-assignées. Les tailles des génomes mitochondriaux sont comparées à la taille du génome de l' α -protéobactérie *Rickettsia prowazekii* qui a une taille de 1111kb.

4.3 Particularités du code génétique dans les mitochondries

Comparé aux génomes nucléaires et chloroplastiques, le génome mitochondrial utilise souvent un code génétique différent du code génétique « universel ». De plus, d'un organisme à l'autre, le code génétique mitochondrial peut varier. Ainsi, UGA, qui est « normalement » un codon *stop*, est lu comme un codon tryptophane dans les mitochondries de mammifères, de champignons et de protozoaires. De la même façon, le codon AGG qui code normalement pour l'arginine correspond à un codon *stop* dans les mitochondries de mammifères et à un codon sérine chez la drosophile (Söll and RajBhandary, 1995). Il est important de noter que la mitochondrie végétale se distingue des autres mitochondries par le fait qu'elle utilise le code génétique « universel ».

D'autre part, alors que 32 ARNt, au moins, sont nécessaires dans le code génétique « universel », 22 ARNt suffisent pour la synthèse mitochondriale chez l'homme (Anderson et al., 1981) et 24 ARNt pour *S. cerevisiae* (Bonitz et al., 1980). L'hypothèse de « wobble », énoncée par Crick, propose que les interactions entre la première base de l'anticodon et la dernière base du codon sont plus flexibles que pour les deux autres. Dans les mitochondries, cette règle de « wobble » est poussée à l'extrême de sorte que la reconnaissance peut se faire uniquement au niveau des deux premières bases du codon, c'est la règle dite du « deux sur trois » (Lagerkvist, 1978). Ainsi, certains ARNt mitochondriaux, ayant un U en première position de l'anticodon, peuvent s'apparier avec n'importe quelle base en troisième position du codon.

Chez les plantes, la situation est plus compliquée car les mitochondries possèdent des ARNt de différentes origines : des ARNt « natifs », des ARNt de type « chloroplastiques » et des ARNt cytosoliques importés (cf. paragraphe 7.1.3 (b)). De ce fait, il est difficile de déterminer le nombre d'ARNt nécessaires dans la mitochondrie végétale, mais des études faites chez les mitochondries de pomme de terre et de blé semblent indiquer que le nombre d'ARNt dans la mitochondrie tourne autour de 35 (Marechal-Drouard et al., 1990; Glover et al., 2001).

5. Le génome mitochondrial de plante

A ce jour, huit génomes mitochondriaux de plantes terrestres ont été entièrement séquencés, à savoir, celui de la mousse hépatique *Marchantia polymorpha* (186,6 kb) (Oda et al., 1992), ceux des angiospermes dicotylédones *A. thaliana* (367 kb) (Unsel et al.,

1997), *Beta vulgaris* (368,8 kb) (Kubo et al., 2000), *Brassica napus* (221,8 kb)(Handa, 2003) et *Nicotiana tabacum* (430,6 kb) (Sugiyama et al., 2005) puis enfin ceux des angiosperme monocotylédone *Oryza sativa* (490,5 kb) (Notsu et al., 2002), *Triticuma estivum* (452,5 kb) (Ogihara et al., 2005) et *Zea mays* (569,6 kb) (Clifton et al., 2004).

5.1 Particularités du génome mitochondrial de plante

Les génomes mitochondriaux de plante possèdent des caractéristiques qui les distinguent des autres. Sur le plan structurel, les génomes mitochondriaux de plantes représentent les plus grands génomes mitochondriaux dont la taille varie de 200 kpb jusqu'à 2400 kpb. Ils sont souvent représentés sous la forme d'un cercle nommé « cercle maître », mais en réalité la structure physique est dynamique et plus complexe puisque des structures subgénomiques circulaires et linéaires ainsi que des structures en rosette ou en sigma ont été observées (Backert et al., 1997). Cette dynamique provient des événements de recombinaison homologues entre des séquences répétées plus ou moins longues présentes tout le long du génome (Bonen and Brown, 1993; Mackenzie and McIntosh, 1999). Par exemple, le génome mitochondrial de riz contient six paires de séquences répétées dont la taille varie entre 3,1 et 46,6 kpb (Notsu et al., 2002). Un autre élément de complexité des génomes mitochondriaux de plantes vient de l'intégration de séquences d'ADN exogène (nucléaires et chloroplastiques) au cours de l'évolution (Marienfeld et al., 1999). De façon paradoxale, bien que la structure et la taille du génome varient d'une espèce à l'autre, les séquences codantes sont hautement conservées, ce qui fait que les gènes mitochondriaux de plantes présentent le taux de divergence le plus bas de tous les systèmes génétiques (Bullerwell and Gray, 2004).

5.2 Contenu du génome

Malgré leur grande taille, les génomes mitochondriaux de plante ne codent que pour environ 50 à 60 gènes. Ces gènes correspondent à des composants de la chaîne respiratoire, à des protéines impliquées dans la biogenèse des cytochromes *c*, à un nombre variable de protéines ribosomales, aux trois ARN ribomiques (5S, 18S et 26S) et à un nombre variable d'ARNt (Marienfeld et al., 1999) (Table 1). On y trouve également un grand nombre de phases de lecture ouvertes (par exemple 85 ORF « Open Reading Frames » chez *A. thaliana*) qui correspondent à des séquences codant potentiellement pour des peptides de plus de 100 acides aminés (Giegé and Brennicke, 2001). Le pourcentage d'ADN d'origine nucléaire et

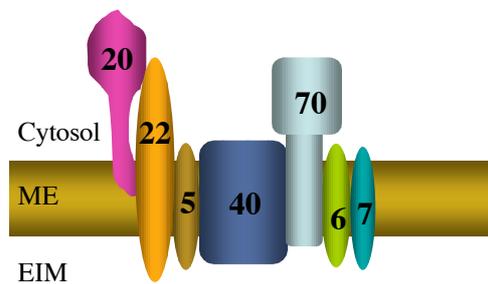
d'origine chloroplastique peut représenter une part importante dans le génome mitochondrial. Les séquences résiduelles de rétro-transposons d'origine nucléaire représentent par exemple 4 % du génome mitochondrial d'*A. thaliana* (Knoop et al., 1996; Unseld et al., 1997). Les insertions d'origine chloroplastique peuvent varier de quelques dizaines de nucléotides à plusieurs kb (jusqu'à 12 kb chez le maïs), (Stern et al., 1982) et peuvent représenter jusqu'à 6 % du génome mitochondrial, comme c'est le cas pour le riz (Nakazono and Hirai, 1993). Ces séquences n'ont pas de fonction apparente mis à part certains gènes chloroplastiques codant pour des ARNt. Ces ARNt de type « chloroplastique » sont devenus essentiels pour la synthèse protéique mitochondriale du fait de l'inactivation ou de la disparition des gènes mitochondriaux correspondants (Maréchal-Drouard et al., 1993). De manière générale, les gènes d'ARNt mitochondriaux et chloroplastiques, d'origine procaryotique sont très proches. On parle de gènes d'ARNt mitochondriaux de type « chloroplastique » lorsque le pourcentage d'homologie avec l'ARNt chloroplastique correspondant est supérieur à 95 %.

6. Expression du génome mitochondrial de plante

6.1 Transcription et mécanismes post-transcriptionnels

La transcription des gènes mitochondriaux de plante est initiée au niveau de promoteurs multiples (Kuhn et al., 2005) et se fait par une ARN polymérase de type phagique (Hedtke et al., 2002). Les mécanismes post-transcriptionnels comprennent la maturation des extrémités 5' et 3' des ARN (Morl and Marchfelder, 2001; Perrin et al., 2004), l'épissage d'introns de groupe II des ARN messagers (ARNm) (Giegé and Brennicke, 2001; Li-Pook-Than and Bonen, 2006), ainsi que l'édition des ARN. L'édition consiste en des modifications de C en U (ou parfois de U en C) des ARNm et ARNt (Gualberto et al., 1989; Giegé and Brennicke, 1999; Fey et al., 2001). Les taux de transcrits résultent de l'équilibre entre l'activité transcriptionnelle et la dégradation des ARN (Placido et al., 2005; Holec et al., 2006).

Chez *S. cerevisiae*



Chez *A. thaliana*

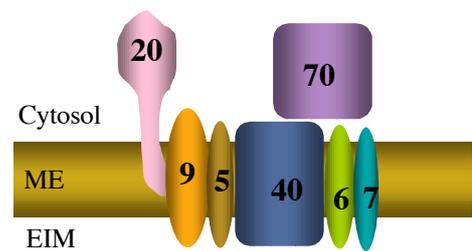


Figure 5 : Le complexe TOM : exemple de différences observées entre des composants de la machinerie d'importation de *S. cerevisiae* et des plantes (d'après Lister et *al.*, 2005).

Le complexe TOM eucaryote est formé d'un canal appelé le GIP («**G**eneral **I**mport **P**ore») par où passent les pré-protéines et des récepteurs qui facilitent la livraison des pré-protéines vers le GIP.

Chez la levure le GIP est composé des protéines TOM40, TOM22 ainsi que des petites protéines TOM5, TOM6 et TOM7. Les récepteurs sont les protéines TOM20 et TOM70 ainsi que la partie cytosolique de la protéine TOM22.

Chez *A. thaliana* le GIP est composé d'homologues de TOM40 et des petites protéines TOM5, TOM6 et TOM7. La protéine TOM9 qui fait partie également du GIP est l'homologue de TOM22 sans la partie N-terminale c'est-à-dire sans la partie cytosolique. Les récepteurs TOM20 et TOM70 ne sont plus présents chez *A. thaliana* mais une protéine de 23 kDa ayant un rôle équivalent au récepteur TOM20 a été identifiée (également appelé TOM20 chez les plantes) (Werhahn et *al.*, 2001) ainsi qu'une protéine de 64 kDa que l'on suspecte avoir un rôle équivalent à TOM70 (Chew et *al.*, 2004)

D'après le site : <http://www.mitoz.bcs.uwa.edu.au/>

6.2 Traduction mitochondriale

La mitochondrie de plante possède sa propre machinerie traductionnelle. Elle comprend un ribosome, des aminoacyl-ARNt synthétases importées (Duchene et al., 2005) et des facteurs de traduction EFTu et EFTs importés (Millar et al., 2005) ainsi que des ARNt mitochondriaux et cytosoliques (voir ci-dessous). Il est à noter que le site d'attachement du ribosome et le contrôle de la traduction sont inconnus dans la mitochondrie de plante. De plus, certains ARNm traduits en protéines n'ont pas de codons d'initiation ATG (Unsel et al., 1997) ou n'ont pas de codon de terminaison (Raczynska et al., 2006).

7. Importation des macromolécules dans les mitochondries de plante : les protéines et les acides nucléiques

7.1 Importation des protéines

On estime que le protéome mitochondrial d'*A. thaliana* est formé de produits de 2000 à 3000 gènes alors que seules 32 protéines sont codées par le génome mitochondrial (Unsel et al., 1997; Millar et al., 2005). Le reste des protéines est codé par le génome nucléaire et importé dans la mitochondrie après traduction. La plupart des études du mécanisme d'importation des protéines mitochondriales a été faite chez la levure *S. cerevisiae* (Rehling et al., 2004). Cependant, bien que le système d'importation soit considéré comme similaire chez les champignons, les animaux et les plantes, des études plus détaillées ont montré que le système d'importation des protéines chez les plantes présente quelques différences (pour une revue (Lister et al., 2005)) (Figure 5).

Le canal d'importation des protéines dans les mitochondries est composé de deux complexes (Figure 6) : le complexe TOM localisé au niveau de la membrane externe (ME) et le complexe TIM localisé au niveau de la membrane interne (MI). Le mécanisme d'importation des protéines va dépendre de la destination finale de celles-ci. Pour une question de simplicité, nous allons séparer les protéines en deux catégories : les protéines mitochondriales précurseur qui possèdent une séquence d'adressage en N-terminal de la protéine et les autres. Dans la première catégorie se trouvent les protéines matricielles ainsi que des protéines de la membrane interne, dans la deuxième catégorie se trouvent les protéines de la membrane externe, de l'espace inter membranaire et de la membrane interne

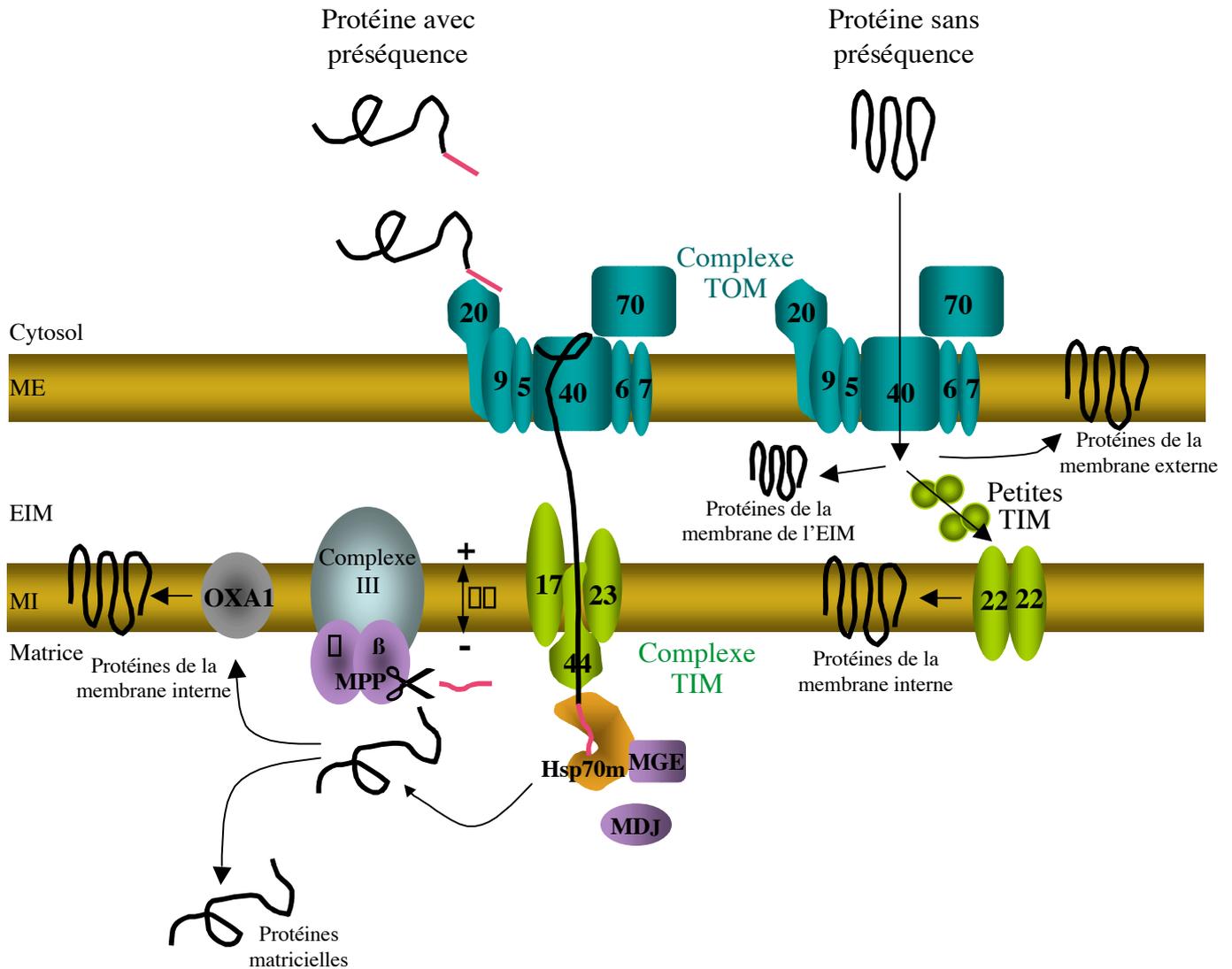


Figure 6 : Modèle d'importation des protéines mitochondriales chez les plantes (d'après (Zhang et Glaser, 2002) et (Lister et *al.*, 2005)).

▯▯ : Potentiel membranaire

— séquence d'adressage

Hsp70m : «Heat shock protein» de 70 kDa mitochondriale

MGE : «Mitochondrial GrpE» protéine homologue à la protéine GrpE de levure

MDJ : «Mitochondrial DnaJ» protéine homologue à la protéine DnaJ de levure

OXA1: «Cytochrome-c-oxidase assembly factor 1»

interne (Braun and Schmitz, 1999; Werhahn et al., 2001; Zhang and Glaser, 2002; Day et al., 2004) et (Lister et al., 2005) (Figure 6).

7.1.1 *Protéines avec une préséquence en N-terminale*

Lors de l'importation de ces précurseurs, la préséquence est tout d'abord reconnue par le récepteur TOM20 puis est ensuite transportée à travers le canal d'importation du complexe TOM de la membrane externe. Au niveau de la membrane interne, la préprotéine est transportée à travers le canal du complexe TIM17/23 constitué par les protéines TIM17 et TIM23 puis est tirée vers la matrice mitochondriale par l'action concertée de la protéine TIM44 et la protéine Hsp70 mitochondriale (Hsp70m). Cette protéine Hsp70m, à l'aide des chaperones MGE et MDJ, va permettre de maintenir la préprotéine de façon non structurée afin que la séquence d'adressage soit clivée par la peptidase MPP (« Mitochondrial Processing Peptidase ») qui fait partie du complexe III de la chaîne respiratoire (Braun and Schmitz, 1999; Zhang and Glaser, 2002).

Les protéines de la membrane interne sont ensuite insérées dans celle-ci par l'intermédiaire de la protéine OXA1 (Hamel et al., 1997; Sakamoto et al., 2000).

7.1.2 *Les protéines sans préséquence en N-terminale*

Dans cette catégorie se trouvent les protéines de la membrane externe, de l'espace inter membranaire et certaines de la membrane interne. Le mécanisme d'importation de ces protéines est moins connu chez les plantes, car certains équivalents protéiques intervenant dans leur importation chez la levure n'ont pas été identifiés chez les plantes.

De façon générale, ces trois types de protéines rentrent par le canal d'importation du complexe TOM. Les protéines de la membrane externe et de la membrane interne sont prises en charge au niveau de l'espace inter membranaire par des petites protéines TIM, TIM9, TIM10, TIM8 et TIM13. Les protéines de la membrane externe sont ensuite incorporées dans la membrane externe. Chez la levure, l'incorporation au niveau de la membrane externe se fait par le complexe SAM (« Sorting and Assembly Machinery ») (Rehling et al., 2004). Cependant, chez les plantes aucun équivalent de ce complexe n'a été trouvé. Les protéines de la membrane interne sont prises en charge au niveau de la membrane interne par le complexe TIM22 pour y être finalement incorporées (Braun and Schmitz, 1999; Day et al., 2004) et (Lister et al., 2005).

| Origine | <i>Arabidopsis thaliana</i> | <i>Solanum tuberosum</i> | <i>Triticum aestivum</i> | <i>Zea mays</i> | <i>Laryx leptoeuropaea</i> | <i>Marchantia polymorpha</i> |
|----------------------|-----------------------------|--------------------------|--------------------------|-----------------|----------------------------|------------------------------|
| Native | 11 | 15 | 11 | 10 | 12 | 29 |
| Chloroplastique | 4 | 5 | 7 | 6 | 6 | 0 |
| Nucléaire (importés) | tous sauf 15 | au moins 11 | 15 | au moins 7 | au moins 11 | ☐B |

Table 2 : La population d'ARNt dans la mitochondrie varie considérablement entre différentes espèces de plantes (d'après (Maréchal-Drouard et *al.*,1990) (Marienfeld et *al.*,1999), (Duchêne et *al.*, 2001) (Glover et *al.*, 2001) et (Sugiyama et *al.*, 2005))

7.1.3 *Importation des acides nucléiques*

a. Importation in vitro d'ADN

Les travaux de Koulintchenko et *col.* ont apporté des fortes évidences en faveur de l'existence d'un processus d'importation d'ADN double brin dans les mitochondries végétales. Ces données suggèrent qu'un complexe protéique comprenant la VDAC et l'ANT, et ressemblant au PTPC de mitochondries animales, se forme au site de contact entre la membrane externe et la membrane interne pour promouvoir le passage actif de l'ADN (Koulintchenko et al., 2003).

b. Importation d'ARNt cytosoliques

La mitochondrie végétale code pour deux types d'ARNt (Table 2). Le premier type correspond aux ARNt dit « natifs » dont les gènes dérivent de ceux du procaryote à l'origine de la mitochondrie. Le deuxième type correspond aux ARNt de type « chloroplastiques » dont les séquences sont quasiment identiques à celles d'ARNt chloroplastiques. L'ensemble de ces ARNt, c'est-à-dire « natifs » ou de type « chloroplastiques », ne sont cependant pas suffisants pour permettre la traduction mitochondriale. Les ARNt manquants sont donc codés par le génome nucléaire et importés du cytosol vers les mitochondries (Schneider and Marechal-Drouard, 2000). Ce mécanisme d'importation d'ARNt cytosoliques dans la mitochondrie végétale sera d'avantage traité dans le chapitre III de l'introduction.

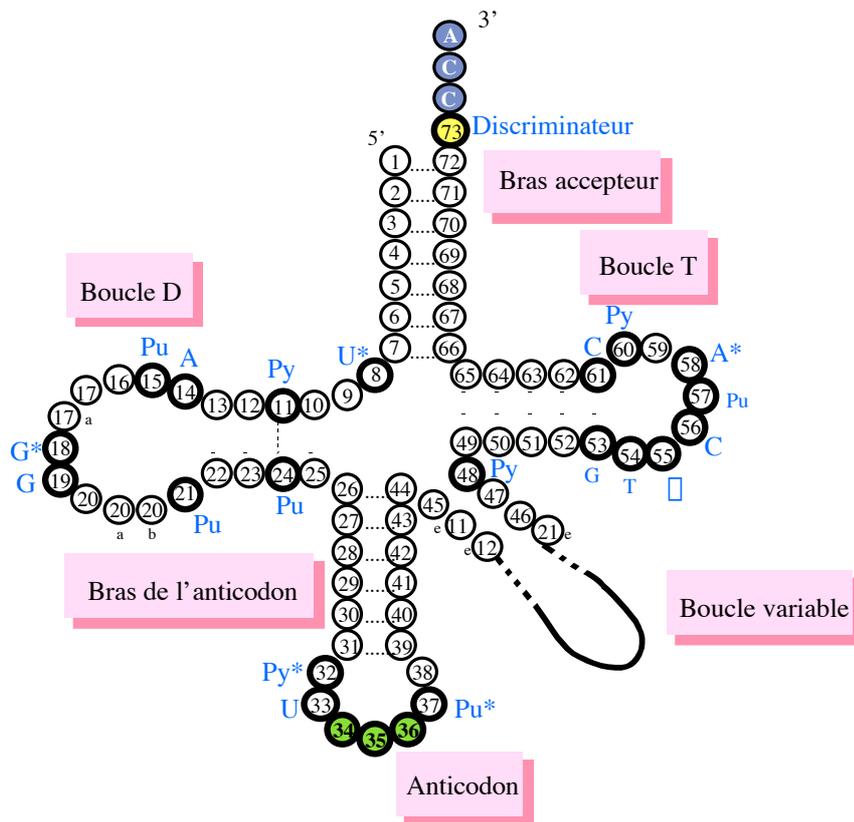


Figure 7 : Représentation en feuille de trèfle de la structure de l'ARNt d'après (Sprinzl et *al.*, 1998). La numérotation des nucléotides de l'ARNt va de 1 à 76 de l'extrémité 5' à l'extrémité 3'. Les positions 34, 35 et 36 de l'ARNt représentent le triplet de l'anticodon. En bleu à côté des nucléotides numérotés dans des cercles plus épais sont désignées les positions invariables de l'ARNt avec le résidu correspondant. La position 73 est la position discriminatrice permettant l'identification de l'ARNt par l'aminoacyl-ARNt synthétases
 Py : nucléotide comportant une pyrimidine
 Pu : nucléotide comportant une purine
 *: nucléotide comportant une base modifiée
 □ : Pseudouridine

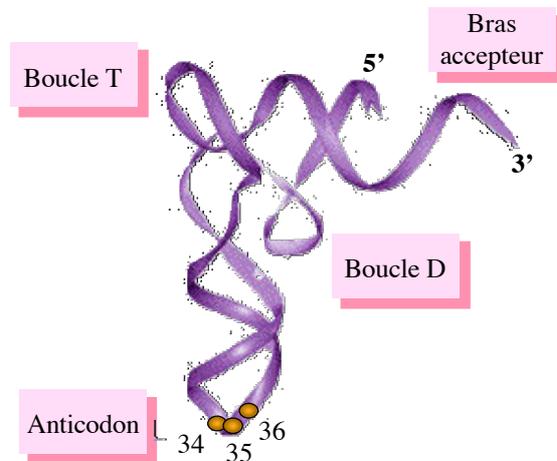


Figure 8 : Représentation en structure "L" de l'ARNt (d'après (Giegé et *al.*, 1998))

II. Du gène à l'ARNt cytosolique fonctionnel

1. L'ARN de transfert

L'information génétique portée par les ARN messagers est traduite au niveau des ribosomes à l'aide de molécules adaptatrices, les ARNt, et ceci grâce à la complémentarité codon-anticodon. Les ARNt portent les acides aminés qui correspondent au triplet qu'ils décodent. Ces acides aminés sont transférés sur l'ARNt par une aminoacyl-ARNt synthétase (aaRS) qui reconnaît spécifiquement chaque groupe d'ARNt isoaccepteurs. Au cours de la traduction, ces ARNt chargés interagissent avec plusieurs protéines différentes, par exemple les facteurs d'initiation, d'élongation ou bien les protéines ribosomales.

Les ARNt sont des petites molécules d'acide ribonucléique, de poids moléculaire de l'ordre de 25 kDa négativement chargées, dont la taille varie entre 74 à 94 nucléotides. Ce sont des molécules relativement bien conservées en ce qui concerne leur taille mais également leurs structures secondaire et tertiaire. Les ARNt présentent une structure secondaire en feuille de trèfle caractéristique (Figure 7), ayant quatre zones d'appariement entre bases complémentaires et trois boucles (à l'exception de certains ARNt mitochondriaux de métazoaires qui n'ont que deux boucles) : la boucle D, appelée ainsi car elle possède une base modifiée qui est la Dihydro-uracile ; la boucle T qui contient la séquence conservée T ψ C pour ribo-thymidine (T), pseudo-uridine (ψ) et cytidine (C) et la boucle de l'anticodon. Il existe une quatrième boucle, la boucle variable dont la taille varie de 4 à 21 nucléotides selon les ARNt.

Cette feuille de trèfle est à son tour repliée en forme de « L » (Figure 8) qui est maintenue par des interactions de types liaisons hydrogène plus compliquées qui mettent en jeu trois bases. Cette structure en « L » de l'ARNt est particulièrement importante pour sa fonction et reflète une séparation maximale entre les deux sites essentiels de la molécule qui sont le site pour l'aminocyclation au niveau du bras accepteur et celui de l'anticodon.

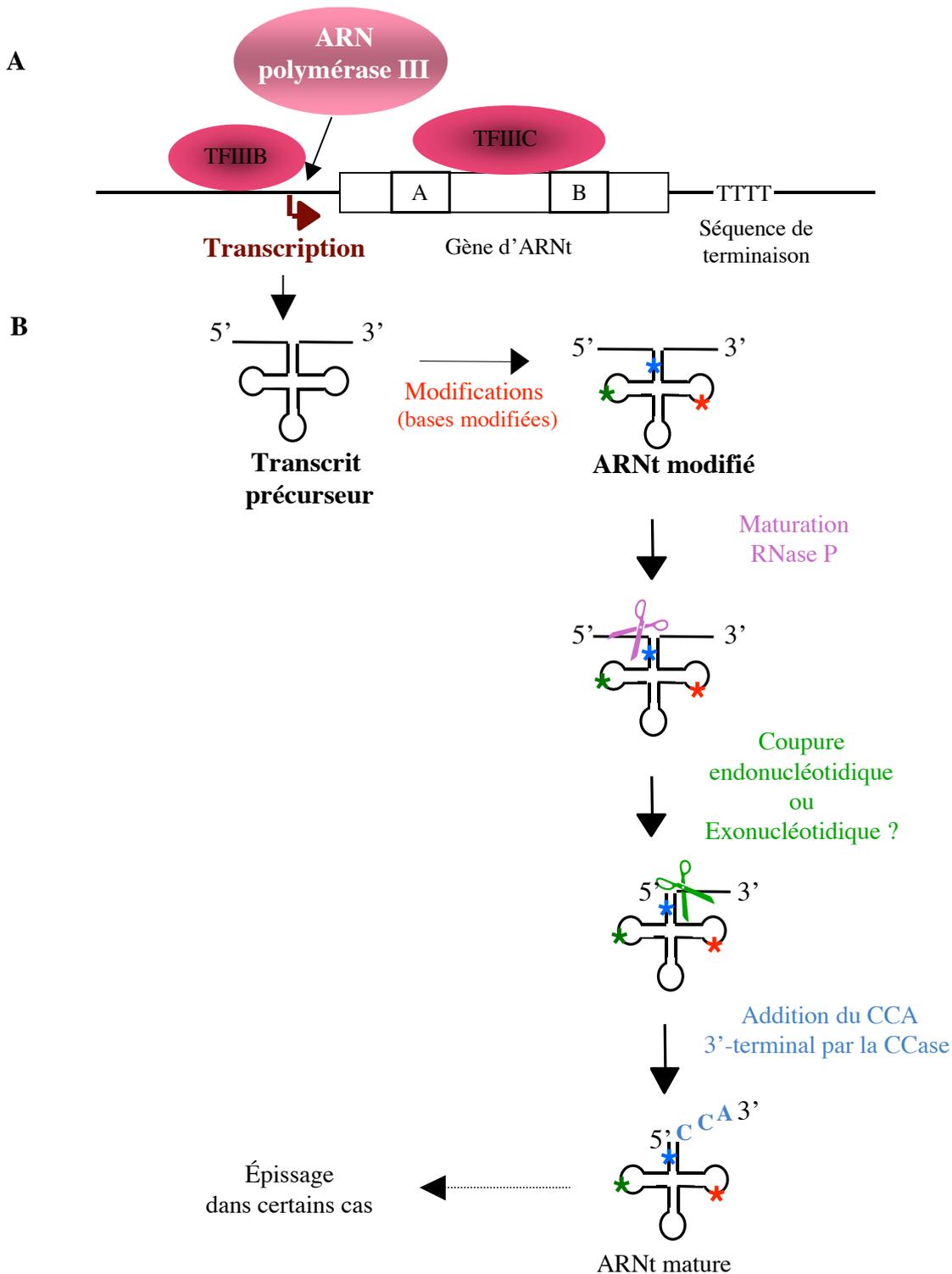


Figure 9 : Modèle de transcription et de maturation des ARNt cytosoliques

A : Transcription des ARNt.

A et B : correspondent aux séquences consensus appelées boîtes A et B.

TFIIB et TFIIC : facteurs de transcription spécifiques pour l'ARN polymérase III. TFIIC est le premier facteur intervenant dans la transcription. Ce facteur va reconnaître les boîtes A et B et ainsi positionné, va permettre la fixation de TFIIB en amont du site d'initiation de la transcription et diriger ainsi l'ARN polymérase III vers le site correct d'initiation de la transcription.

B : Maturation des ARNt cytosoliques

CCase : ARNt terminal-nucléotidyl transférase.

* * * Modifications post-transcriptionnelles avant et/ou après la maturation des extrémités 5' et 3'

2. Expression et maturation des ARNt cytosoliques

2.1 Expression des gènes d'ARNt nucléaires

Dans le noyau des cellules eucaryotes, les gènes codant pour les ARNt sont en général nombreux (630 gènes pour *A. thaliana*, 273 gènes pour *S. cerevisiae*, 448 gènes pour l'homme) (pour un site <http://lowelab.ucsc.edu/GtRNAdb>). Chez les plantes, comme chez les autres eucaryotes, les gènes des ARNt sont présents dans le génome sous forme de familles multigéniques. Celles-ci peuvent être dispersées au hasard dans le génome, ou regroupées sous forme de « cluster ».

Ils sont transcrits par l'ARN polymérase III sous forme de précurseur pour être ensuite maturés (Figure 9). Le contrôle de l'expression de ces gènes se fait en fonction de deux régions internes appelées boîtes A et B (ou 5'ICR et 3'ICR pour « Internal Control Region »). Celles-ci correspondent respectivement aux régions hautement conservées de la boucle D et de la boucle T de l'ARNt (Galli et al., 1981; Hofstetter et al., 1981). Ces séquences ne sont pas directement reconnues par l'ARN polymérase III mais par l'intermédiaire de facteurs de transcription tels que TFIIB et TFIIC (Bartholomew et al., 1990; Kassavetis et al., 1990).

En plus de ces deux régions, les séquences 5' et 3' flanquantes du gène d'ARNt contiennent également des éléments importants pour son expression (Ulmasov and Folk, 1995; Choisine et al., 1997; Yukawa et al., 2000). L'analyse comparative des 50 pb en amont de la séquence codante des gènes d'ARNt de plantes a révélé une zone riche en A et T qui se traduit par une faible stabilité notamment dans la zone -35 à -30 (région contenant généralement des séquences comparables à des boîtes TATA) et une présence significative de triplets CAA surtout en position -7 à -3 (Choisine et al., 1998; Yukawa et al., 2000).

La terminaison de la transcription se fait par la l'ARN polymérase III qui reconnaît elle-même une séquence poly T en 3' (au minimum quatre nucléotides T) (Söll and RajBhandary, 1995).

2.2 Maturation des ARNt nucléaires

Tandis que le clivage endonucléolytique de l'extrémité 5' par la RNase P est bien compris (Evans et al., 2006), le processus de maturation de l'extrémité 3' est encore mal connu (figure 9). Il semble que, soit une coupure endonucléolytique, soit une coupure

| ARNt | <i>E. coli</i> | <i>S. cerevisiae</i> | Eucaryotes supérieurs | <i>Arabidopsis thaliana</i> |
|-------------------|----------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|------------------------------------------|-----------------------------|
| Ala | A73, G2:C71, G3°U70, G4:C69, G20 | G3°U70 | G3°U70 | G3°U70 |
| Arg | A ou G73, C35, U ou G36, A20 | C35, U ou G36 | ? | ? |
| Asn | G73, G34, U35, U36 | ? | ? | ? |
| Asp | G73, G2:C71, G34, U35, C36, C38, G10 | G73, G34, U35, C36, C38, G10°U25 | ? | ? |
| Cys | U73, G2:C71, C3:G70, G34, C35, A36, G15°G48, A13°A22 | U73 | ? | ? |
| Gln | G73, U1:A72, G2:C71, C3:G70, Y34, U35, G36, A37, U38, G10 | ? | ? | ? |
| Glu | G1:C72, U2:A71, s ⁴ U34, U35, A37, U11:A24, U13:G22-A46, Δ47 | ? | ? | ? |
| Gly | U73, G1:C72, C2:G71, G3:C70, C35, C36 | A73, G1:C72, C2:G71, G3:C70, C35, C36 | A73, G2:C71 | ? |
| His | C73, G-1, anticodon | A73, G-1, G34, U35 | ? | ? |
| Ile | A73, C4:G69, L ou G34, A35, U36, t ⁶ A37, A38, U12:A23, C29:G41 | I34, A35, U36 | ? | ? |
| Leu | A73, U8:A14 | A73, A35, G37 | A73, C3:G70, A4:69, G5:C68, C20 | ? |
| Lys | A73, U ou mnm ⁵ s ² U34, U35, U36 | ? | ? | ? |
| Met (fMet) | A73, (G2:C71, C3:G70), U4:A69, A5:U68, C34, A35, U36, C32, U33, A37 | A73, C34, A35, U36, 4 nt AC boucle anticodon | ? | ? |
| Phe | A73, G34, A35, A36, G27:C43, G28:C42 U20, G44, U45, U59, U60 | A73, G34, A35, A36, i ⁶ A37 G20 | A73, G34, A35, A36 C30°C40, A31:U39, G20 | G34, A35, A36 G3:C70 |
| Pro | A73, G72, G35, C36, G15°C48 | ? | G35, G36 | ? |
| Ser | G73, C72, G2:C71, A3:U70, R4:Y69, C11:G24, C11:G24, boucle variable | boucle variable | G73, boucle variable | ? |
| Thr | G1:C72, C2:G71, G34, G35, U36 | G1:C72, G35, U36 | ? | ? |
| Trp | G73, A1:U72, G2:C71, G3:C70, C34, C35, A36 | C34, C35 | ? | A73 C34, C35, A36 |
| Tyr | A73, U35 | A73, C1:G72, G34, Ψ35 | ? | ? |
| Val | A73, G3:C70, U4:A69 A35, C36 | A73, A35 | ? | anticodon |

Table 3: Tableau récapitulatif des éléments d'identité impliqués dans l'aminocyclation des ARNt (d'après Giegé et al., 1998)

Dans le cas des nucléotides appariés : (:) paires Watson-Crick, (°) paires non Watson-Crick, (-) paires tertiaires.

R : purine, Y : Pyrimidine.

Les résidus sont numérotés selon le modèle de (Sprinzl et al., 1998)

exonucléolytique intervient en 3' selon les organismes eucaryotes étudiés. Chez les plantes, il a été montré que la RNase Z était nécessaire pour la maturation des ARNt nucléaires (Kruszka et al., 2003). Après l'obtention d'une extrémité 3' correcte, le triplet CCA est ajouté par l'ARNt terminal-nucléotidyl transférase (CCase) (Morl and Marchfelder, 2001). Au cours de ces différentes étapes de maturation, l'ARNt subit également de multiples modifications des nucléotides (Nishikura and De Robertis, 1981).

Un certain nombre d'ARNt possèdent des introns, par exemple 9 familles de gènes d'ARNt chez *S. cerevisiae*, 8 chez l'homme et 3 chez *A. thaliana*. Ces introns sont variables en longueur et séquence, mais sont toujours localisés dans la boucle de l'anticodon. L'épissage d'introns d'ARNt a été essentiellement étudié chez la levure et semble mettre en jeu trois enzymes : une endonucléase, une ligase et une 2'-phosphotransférase (Trotta et al., 1997; Abelson et al., 1998).

Jusqu'à maintenant, on pensait que les ARNt étaient essentiellement maturés dans le noyau (à l'exception de certaines modifications qui se font dans le cytosol). Cependant, depuis quelques années ce dogme a été remis en cause. En effet, des études faites sur la levure indiquent que l'épissage des ARNt est réalisé dans le cytosol au niveau de la surface mitochondriale (Yoshihisa et al., 2003). Les travaux de (Shaheen and Hopper, 2005) et (Takano et al., 2005) ont par la suite montré que ces ARNt épissés retournaient alors dans le noyau. Ce retour permettrait de contrôler les ARNt avant leur utilisation (Yoshihisa, 2006).

3. Éléments d'identité pour l'aminocyclation des ARNt

La lecture correcte du code génétique au moment de la traduction nécessite une spécificité d'interaction entre l'aminocycl-ARNt synthétase et l'ARNt. Des signaux moléculaires dans l'ARNt permettent cette reconnaissance spécifique entre l'ARNt et son aminocycl-ARNt synthétase (pour une revue (Giegé et al., 1998)) (Table 3). Ces éléments d'identité d'aminocyclation ont été principalement étudiés chez les bactéries (pour les 20 acides aminés chez *E. coli* et pour 4 acides aminés chez *T. thermophilus*) et chez la levure *S. cerevisiae* (pour 14 acides aminés). En ce qui concerne les eucaryotes supérieurs, peu de données ont été recensées. Généralement, ce sont des approches de mutagenèse des séquences d'ARNt testées par aminocyclation soit *in vivo*, soit *in vitro* qui ont permis de définir les éléments de l'interaction avec les aminocycl-ARNt synthétases.

On distingue deux types d'éléments d'identité, majeurs et mineurs, selon les effets plus ou moins importants que les mutations produisent sur l'activité d'aminacylation. Pour la plupart des ARNt, deux éléments d'identité majeurs ont été identifiés. Ils sont situés aux deux extrémités distales de l'ARNt c'est-à-dire la boucle de l'anticodon (notamment la position 35) et les acides aminés du bras accepteur ainsi que le nucléotide discriminant N73 (Figure 8). Des éléments d'identité mineurs en position interne de l'ARNt peuvent s'avérer importants, mais de façon générale leur rôle est plutôt dépendant de l'organisme. La plupart des éléments d'identité sont au contact direct avec les aminoacyl-ARNt synthétases et cela pourrait expliquer qu'aucun élément d'identité n'ait été trouvé au niveau des paires de bases 6-12 du bras accepteur ainsi que sur la boucle T. De plus, il existe également des éléments qui agissent comme « anti-déterminants » vis-à-vis de la reconnaissance par les aminoacyl-ARNt synthétases non spécifiques. Le premier anti-déterminant décrit, fût chez l'ARNt^{Ile} d'*E. coli*. Cet ARNt, l'ARNt^{Ile}(LAU), possède en position 34 de l'anticodon une cytidine qui est modifiée en 2-lysyl-cytidine (également appelée lysidine (L)). Des expériences *in vitro* ont montré que lorsque la cytidine en position 34 n'était plus modifiée, l'ARNt n'était plus reconnu par l'isoleucyl-ARNt synthétase mais l'était alors par la méthionyl-ARNt synthétase (Muramatsu et al., 1988). C'est ainsi que la lysidine en position 34 de l'anticodon a été caractérisée comme un anti-déterminant vis-à-vis de la méthionyl-ARNt synthétase. Certains nucléotides modifiés, bien que rares, peuvent être des éléments d'identité pour les ARNt (par exemple Ile, Glu et Lys chez *E. coli*, Ile chez la levure (Giegé et al., 1998) et Lys chez l'homme (Sissler et al., 2004)). Ainsi, la rare participation des nucléotides modifiés dans l'aminacylation des ARNt permet l'utilisation de transcrits non modifiés dans un grand nombre d'études sur les éléments d'identité.

Chez les plantes, seuls les éléments d'identité pour l'aminacylation des ARNt^{Ala} (Carneiro et al., 1994; Dietrich et al., 1996a), ARNt^{Phe} (Carneiro et al., 1994), ARNt^{Trp} (Ulmasov et al., 1998) et ARNt^{Val} (Delage et al., 2003a) (*A. thaliana*) cytosoliques ont été étudiés. Les résultats de ces travaux sont résumés dans la Table 3.

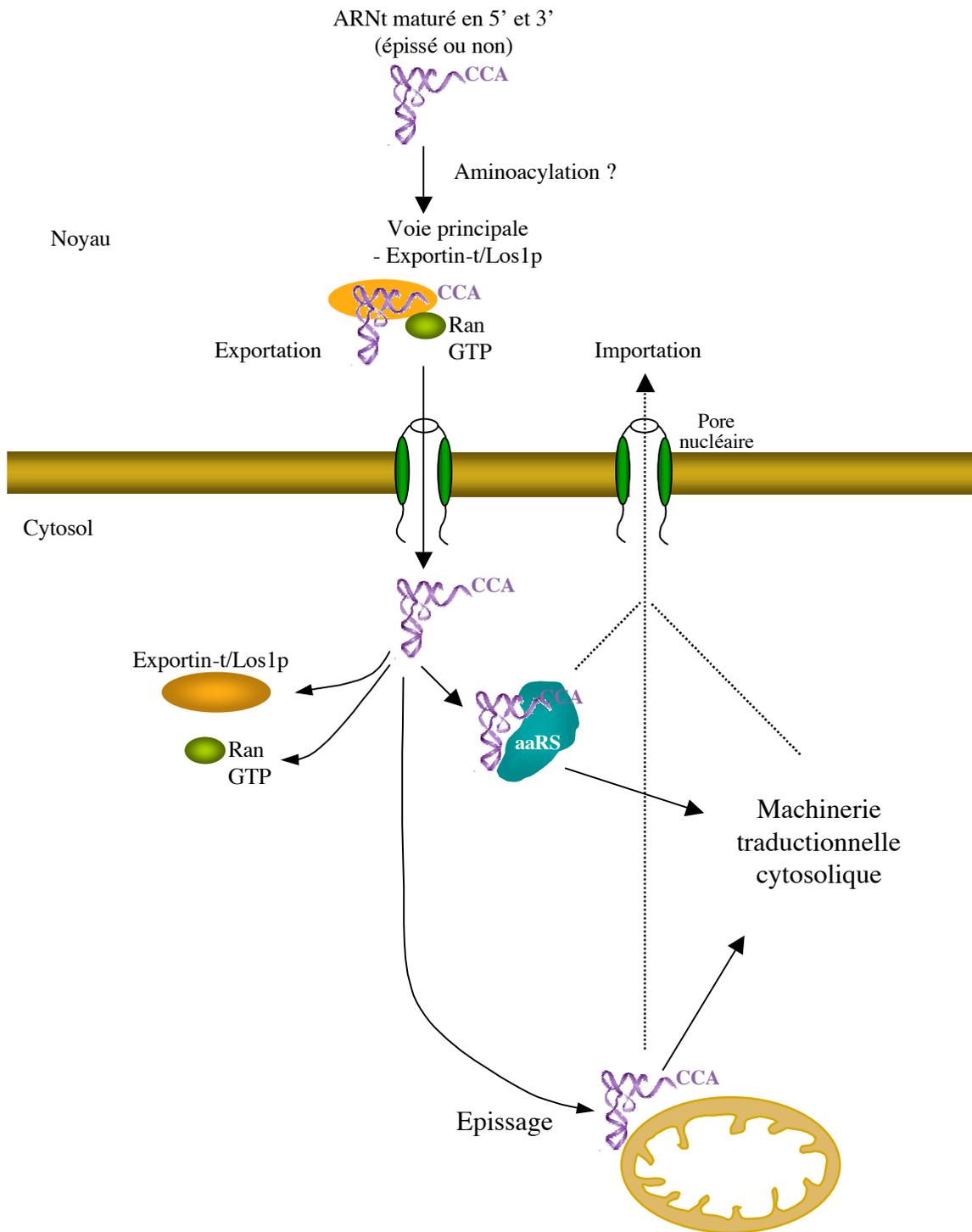


Figure 10: Modèle du système d'exportation et d'importation des ARNt du noyau vers le cytosol chez les eucaryotes supérieurs et la levure (d'après Hopper et *al.*, 2003).

aaRS: aminoacyl-ARNt synthétase

aa: acide aminé

4. Exportation des ARNt du noyau vers le cytosol

Il a été démontré que seuls les ARNt ayant des extrémités 5' et 3' correctement maturées peuvent être exportés dans le cytosol (Sarkar et al., 1999; Grosshans et al., 2000a). Des études chez le xénope et chez la levure ont montré que l'aminocyclation des ARNt était importante pour leur exportation. L'aminocyclation des ARNt dans le noyau serait en quelque sorte un test « qualité » mais néanmoins, des ARNt non aminocyclables sont retrouvés dans le cytoplasme avec une vitesse d'exportation réduite (Lund and Dahlberg, 1998; Sarkar et al., 1999; Grosshans et al., 2000b).

L'exportation de ces ARNt se fait via des voies RanGTP-dépendantes, dont la principale voie caractérisée concerne la protéine exportine-t chez les eucaryotes supérieures et son homologue Los1p chez les levures (Hopper and Phizicky, 2003) (Figure 10). Ces protéines couplées à la protéine RanGTP vont transporter l'ARNt jusqu'au cytosol en se liant directement à l'ARNt. Dans le cytosol, les ARNt non épissés sont transportés jusqu'à la surface mitochondriale pour être épissés (Shaheen and Hopper, 2005; Takano et al., 2005) alors que les ARNt « fonctionnels » sont pris en charge par les aminoacyl-ARNt synthétases pour être utilisés dans la synthèse protéique (Negrutskii and Deutscher, 1991).

Des travaux chez la levure ont également montré que les ARNt étaient ré-importés dans le noyau. D'après les auteurs, ce flux rétrograde d'ARNt permettrait de contrôler la qualité des ARNt mais aussi de réguler la population d'ARNt dans le cytosol (Dahlberg and Lund, 2005; Shaheen and Hopper, 2005; Takano et al., 2005).

| Organisme | Nombre d'ARNt importés | Preuve(s) de l'importation mitochondriale des ARNt | Source bibliographique |
|--------------------------------------------|------------------------|----------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| Protistes | | | |
| Euglénozoaires (Trypanosomatidés) : | | | |
| <i>Leishmania tarentolae</i> | tous | (1), (2), (3) et (4) | (Lye et al., 1993) |
| <i>Leishmania donovani</i> | tous | (1), (2), (3) et (4) | (Chen et al., 1993) |
| <i>Trypanosoma brucei</i> | tous | (1), (2), (3) et (4) | (Hancock et al., 1990; Schneider et al., 1994) |
| Histionidés : | | | |
| <i>Jacoba libera</i> | 1 | (1) | OGMP, OGD |
| <i>Reclinomonas americana</i> | 1 | (1) | OGMP, OGD |
| Rhizopodes : | | | |
| <i>Acanthamoeba castellanii</i> | 7 | (1) | OGMP, OGD |
| Dictyostéliidés : | | | |
| <i>Dictyostelium discoideum</i> | 4 | (1) | OGMP, OGD |
| Ciliés : | | | |
| <i>Paramecium aurelia</i> | 19 | (1) | |
| <i>Tetrahymena Pyriformis</i> | 26 | (2) et (3) | (Chiu et al., 1993; Suyama et al., 1967) |
| Apicomplexes : | | | |
| <i>Plasmodium falciparum</i> | tous | (1) | OGMP, OGD |
| <i>Theileria parva</i> | tous | (1) | OGMP, OGD |
| Labyrinthulomycètes : | | | |
| <i>Thraustochytrium aureum</i> | 2 | (1) | OGMP, OGD |
| Stramenopilés | | | |
| <i>Phytophthora infectans</i> | 1 | (1) | OGMP, OGD |
| Chrysophytes : | | | |
| <i>Ochromonas danica</i> | 2 | (1) | OGMP, OGD |
| <i>Chrysodidymus synuroideus</i> | 2 | (1) | OGMP, OGD |
| Biscosoécidés : | | | |
| <i>Cafeteria roenbergensis</i> | 2 | (1) | OGMP, OGD |
| Algues | | | |
| Rhodophytes : | | | |
| <i>Chondrus crispus</i> | 2 | (1) | OGMP, OGD |
| <i>Porphyra purpurea</i> | 2 | (1) | OGMP, OGD |
| Chlorophytes | | | |
| <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> | tous sauf 3 | (1) | OGMP, OGD |
| <i>Pedinomonas minor</i> | tous sauf 7 | (1) | OGMP, OGD |
| Plantes | | | |
| Bryophytes : | | | |
| <i>Marchantia polymorpha</i> | 3 | (1) et (2) | (Akashi et al., 1998) |
| Gymnospermes | | | |
| <i>Larix leptoeuropaea</i> | au moins 11 | (2) | (Kumar et al., 1996) |
| Angiospermes: | | | |
| <i>Beta vulgaris</i> | tous sauf 6 | (1) | OGMP, OGD |
| <i>Solanum tuberosum</i> | au moins 6 | (2) et (3) | (Maréchal-Drouard et al., 1990) |
| <i>Arabidopsis thaliana</i> | tous sauf 15 | (1) | OGMP, OGD |
| <i>Phaseolus vulgaris</i> | au moins 8 | (1) et (2) | (Maréchal-Drouard et al., 1988) |
| <i>Triticum aestivum</i> | 15 | (2) | (Glover et al., 2001) |
| <i>Zea mays</i> | au moins 7 | (2) | (Kumar et al., 1996) |
| Champignons | | | |
| Chytridiomycètes : | | | |
| <i>Spizellomyces punctatus</i> | 14 | (1) | (Laforest et al., 1997) |
| <i>Harpochytrium sp.</i> | 14 | (1) | OGMP, OGD |
| Ascomycètes : | | | |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 3 | (1), (2), (3) et (4) | (Martin et al., 1979; Rinehart et al., 2005) |
| Animaux | | | |
| Mollusques | | | |
| <i>Crassostrea gigas</i> | tous sauf 4 | (1) | OGMP, OGD |
| Cnidaires : | | | |
| <i>Metridium senile</i> | tous sauf 2 | (1) | OGMP, OGD |
| Mammifères (marsupiaux) : | | | |
| <i>Macropus robustus</i> | 1 | (1) et (4) | (Döner et al., 2001) |
| <i>Macropus agilis</i> | 1 | (1) et (4) | „ |
| <i>Macropus giganteus</i> | 1 | (1) et (4) | „ |
| <i>Macropus rufus</i> | 1 | (1) et (4) | „ |
| <i>Macropus eugenii</i> | 1 | (1) et (4) | „ |
| <i>Didelphis virginiana</i> | 1 | (1) et (4) | „ |
| <i>Monodelphis domestica</i> | 1 | (1) et (4) | „ |
| <i>Isodon macrourus</i> | 1 | (1) et (4) | „ |
| <i>Smithopsis crassicaudata</i> | 1 | (1) et (4) | „ |
| <i>Phascolarctos cinereus</i> | 1 | (1) et (4) | „ |
| <i>Potororus tridactylus</i> | 1 | (1) et (4) | „ |

Table 4 : ARNt codés par les génomes mitochondriaux des organismes vivants, adapté de (Entelis et al., 2001)

(1): données de séquençage systématique des génomes mitochondriaux (OGMP: «**O**rganelle Genome Megasequencing Program et OGD: «**O**rganelle Genome Database») disponibles sur internet à l'adresse: <http://megasun.bch.umontreal.ca/>. (2): Hybridation en «**N**orthern blot» des ARNt mitochondriaux avec les ADN génomiques ou mitochondriaux (sondes spécifiques). (3): données des expériences de transgénèse (4): système d'importation *in vitro* des ARNt dans les mitochondries isolées

III. Importation des ARNt dans les mitochondries

1. Importation des ARNt

1.1 Préambule

En 1967, l'importation des ARNt cytosoliques dans les mitochondries a été suggérée chez *Tetrahymena pyriformis* (Suyama, 1967). Ce n'est qu'une quinzaine d'années après, d'abord par des études *in vivo* et ensuite par la mise en place de systèmes *in vitro* que l'importation d'ARNt a été démontrée d'abord chez la levure, puis chez les plantes et les protozoaires. Aujourd'hui, le phénomène d'importation d'ARNt cytosoliques dans la mitochondrie est prédit chez un grand nombre d'organismes évolutivement différents. Dans la plupart des cas, ces prédictions sont basées sur le manque d'un jeu complet de gènes codant pour les ARNt lors des séquençages des génomes mitochondriaux. Cette prévision ne fait aucun doute pour les organismes ne possédant pratiquement plus de gènes codant pour les ARNt. Cependant, pour les espèces qui possèdent un jeu presque complet, la situation est plus compliquée. En effet, les variations dans les mécanismes de reconnaissance des codons ainsi que les dérives du code génétique peuvent constituer des voies alternatives pour combler ce déficit (Schneider and Marechal-Drouard, 2000; Entelis et al., 2001a).

1.2 Les organismes concernés par le phénomène d'importation d'ARNt

La Table 4 regroupe les informations recensées à ce jour concernant l'importation des ARNt dans la mitochondrie de différentes classes d'organismes vivants.

1.2.1 Les protozoaires

Le séquençage des génomes mitochondriaux des protozoaires a permis de les diviser en trois catégories : les protozoaires qui ont perdu très peu de gènes d'ARNt (e.g. *Dictyostelium discoideum*, *Jacoba libera*, *Reclinomonas americana*), les protozoaires qui ont perdu une grande partie de leurs gènes (e.g. *Tetrahymena pyriformis*, *Paramecium*

aurelia) et finalement, les protozoaires qui ont perdu la totalité de leurs gènes (e.g. *Leishmania tarantolae*, *Leishmania donovani*, *Trypanosoma brucei*). Dans cette dernière catégorie, le « pool » d'ARNt utilisé dans la mitochondrie est composé uniquement d'ARNt cytosoliques.

1.2.2 Les champignons

L'ADN mitochondrial du chytridiomycète *Spizellomyces punctatus* ne possède que 8 gènes codant pour des ARNt. Malgré le phénomène d'édition mis en évidence chez ce champignon (Laforest et al., 1997), les 8 ARNt ne peuvent toutefois pas assurer le bon fonctionnement de la machinerie traductionnelle ce qui implique l'existence du phénomène d'importation des ARNt cytosoliques chez cet organisme. A l'inverse, la levure *S. cerevisiae* possède un jeu complet d'ARNt permettant de lire l'ensemble du code génétique mitochondrial utilisé chez celle-ci. Néanmoins, il a été montré dès 1979 que l'ARNt^{Lys}(CUU) codé par le génome nucléaire est importé dans la mitochondrie (Martin et al., 1979). Récemment, des études ont montré l'importation de deux autres ARNt cytosoliques, deux ARNt^{Gln}, dans la mitochondrie de *S. cerevisiae* (Rinehart et al., 2005).

1.2.3 Les animaux

Chez les animaux, le séquençage des génomes mitochondriaux de cnidaires et de mollusques ont permis de déceler des gènes d'ARNt manquants. En effet, chez *Metridium senile* seulement deux gènes d'ARNt sont encore présents, l'ARNt^{f-Met} et l'ARNt^{Trp} (Beagley et al., 1998) et chez *Crassostrea gigas* quatre gènes ont été perdus. Chez les vertébrés, un seul exemple d'importation d'ARNt a été recensé. Chez les marsupiaux, l'ARNt^{Lys} codé par le génome mitochondrial était fortement suspecté d'être un pseudogène (Janke et al., 1997). Par la suite, des études ont confirmé que l'ARNt^{Lys} mitochondrial n'était pas aminoacylé et qu'il était remplacé par l'ARNt^{Lys} cytosolique importé (Dorner et al., 2001).

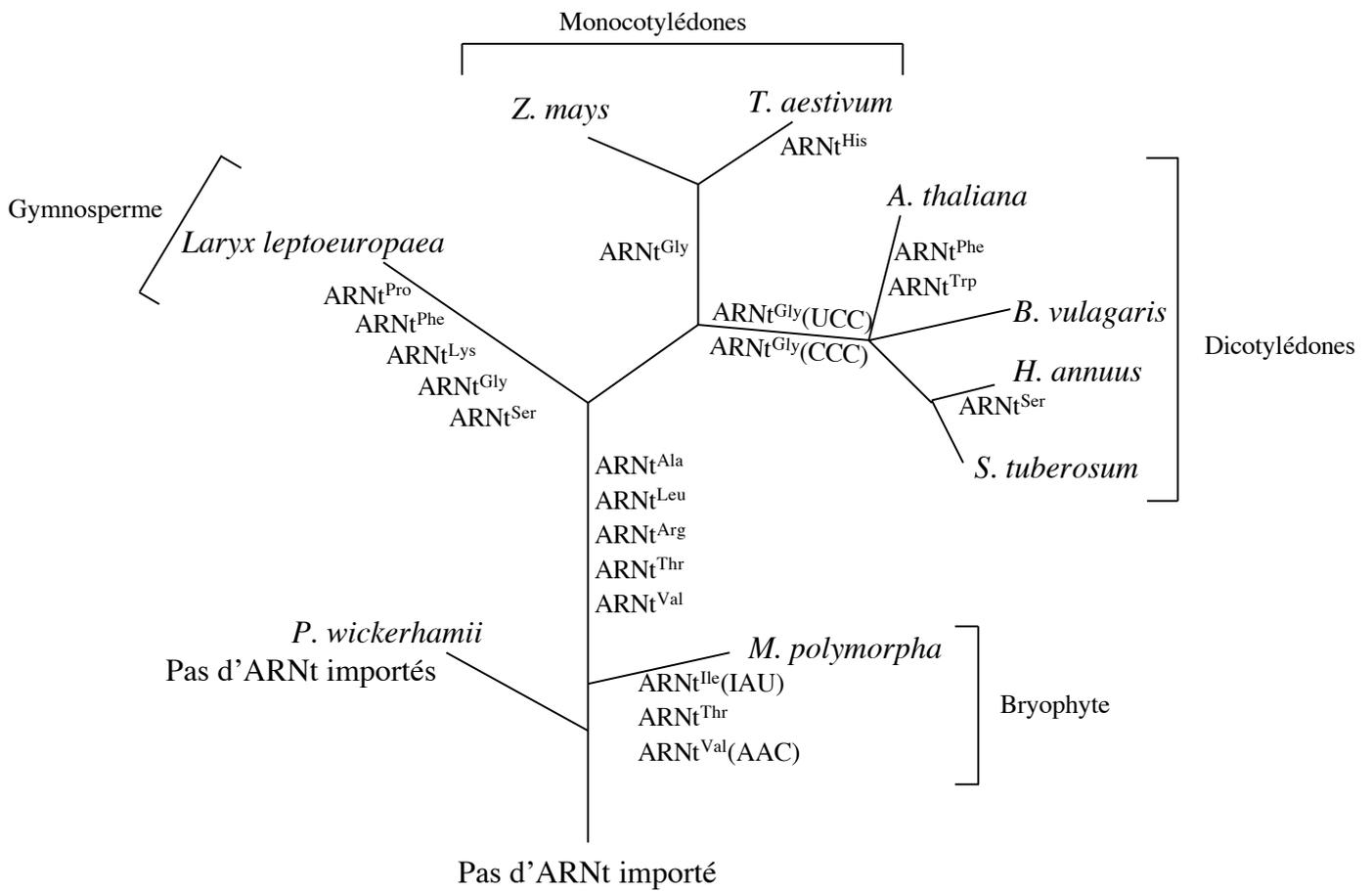


Figure 11 : Importation des ARNt dans les mitochondries végétales

L'arbre montre les espèces végétales pour lesquelles une étude des ARNt importés dans les mitochondries a été faite. La longueur des bras est arbitraire.

1.2.4 Le règne végétal

a. Les « algues »

Chez les algues, algues rouges (rhodophytes) et algues vertes (chlorophytes), l'importation des ARNt est prédit sur la base du séquençage des génomes. Certaines algues importent peu ou pas d'ARNt (aucun chez l'algue verte *Prototheca wickerhamii*, deux chez les algues rouges *Chondrus crispus* et *Porphyra purpurea*). D'autres, comme *Chlamydomonas reinhardtii*, importent une grande partie de leurs ARNt puisque seulement trois gènes d'ARNt sont codés par l'ADN mitochondrial. De ce fait, une analyse détaillée menée au laboratoire montre que chez cette algue verte environ une trentaine d'ARNt cytosoliques sont retrouvés dans la mitochondrie (Vinogradova E., Remacle C., Drouard L., communication personnelle).

b. Les plantes

Actuellement, seule une dizaine d'espèces végétales ont fait l'objet d'une étude portant sur l'importation des ARNt dans la mitochondrie. Il est cependant vraisemblable que l'ensemble des plantes importe des ARNt cytosoliques dans la mitochondrie. Alors que le bryophyte *Marchantia polymorpha* n'importe que trois ARNt, les plantes supérieures importent jusqu'à deux tiers de leur ARNt (Table 4). Cependant, l'identité des ARNt importés varie d'une espèce à l'autre.

Des études comparatives ont permis de faire quelques observations (Figure 11) :

-D'une part, il a été observé que les ARNt^{Ala}, ARNt^{Arg}, ARNt^{Leu}, ARNt^{Thr}, ARNt^{Val} et ARNt^{Ile}(IAU) sont importés chez toutes les plantes supérieures étudiées à ce jour.

-D'autre part, il existe cinq familles d'ARNt : les ARNt^{Asp}, ARNt^{Gln}, ARNt^{Glu}, ARNt^{Met}^f, ARNt^{Tyr} et l'isoaccepteur ARNt^{Ile}(LAU) codés par le génome mitochondrial qui ont été observés pour l'ensemble de ces plantes étudiées. Ceci peut être expliqué par le fait que certains de ces ARNt ont des particularités datant de leurs origines procaryotiques et les rendant ainsi difficiles à être remplacés par leurs équivalents eucaryotiques. En effet, les mitochondries, comme chez les protéobactéries, ne possèdent pas la glutamyl-ARNt synthétase. Le Gln-ARNt^{Gln} va donc être obtenu par une réaction de transamidation du Glu-ARNt^{Gln}. Ceci nécessite par conséquent une reconnaissance spécifique des ARNt^{Gln} et ARNt^{Glu} par l'amido transférase qui effectue cette réaction de transamidation et une adaptation des composants de la machinerie traductionnelle mitochondriale à ce système. Ainsi, ce système qui est différent à celui observé dans le cytosol rend probablement difficile

le remplacement des ARNt^{Gln} et ARNt^{Glu} par les équivalent cytosoliques. De façon similaire, l'ARNt^{Ile}(LAU) subi une modification en position 34 de l'anticodon (C en dérivé de Lysidine) qui est spécifique aux procaryotes. Or, un équivalent cytosolique de cet ARNt n'est encore pas connu. Finalement, le problème du remplacement de l'ARNt^{Met-f} semble le plus évident du fait que dans les mitochondries et les procaryotes, à différence des eucaryotes, le méthionyl-ARNt^{Met-f} est formylé pour l'initiation de la traduction. Ainsi, le remplacement de cet ARNt^{Met-f} par l'ARNt^{Met-i} cytosolique semble difficile.

-Finalement, il y a importation spécifique d'une ou plusieurs familles d'ARNt, variable d'une espèce à l'autre. Par exemple, chez les dicotylédones, le tournesol (*H. annuus*) importe les ARNt^{Ser} (Kumar et al., 1996) alors qu'*A. thaliana* importe les ARNt^{Phe} et ARNt^{Trp} (Chen et al., 1997; Duchêne and Maréchal-Drouard, 2001; Duchêne et al., 2001). Chez les monocotylédones, on peut citer le cas du blé qui importe l'ARNt^{His} (Glover et al., 2001) alors que le maïs ne l'importe pas.

Dans la majorité des cas, il semble que l'importation des ARNt se fait par famille c'est-à-dire que l'ensemble des ARNt nécessaires pour lire les codons d'un même acide aminé sont retrouvés dans l'organelle. Cependant, il existe deux exceptions à cela. Premièrement, le cas des ARNt^{Ile} où seul l'ARNt^{Ile}(IAU) est importé dans toutes les espèces végétales étudiées à ce jour à partir de l'embranchement des bryophytes. Deuxièmement, le cas des ARNt^{Gly} où les deux isoaccepteurs, l'ARNt^{Gly}(UCC) et l'ARNt^{Gly}(CCC), sont importés chez les plantes dicotylédones alors que l'ARNt^{Gly}(GCC) est cytosol spécifique (Brubacher-Kauffmann et al., 1999).

Chez l'ensemble des plantes étudiées, il n'y a généralement pas de redondance entre les ARNt codés par le génome mitochondrial et les ARNt cytosoliques. Il a été observé que seuls les ARNt cytosoliques correspondant à des ARNt qui ne sont pas exprimés dans la mitochondrie sont importés. Il existe un seul exemple de coexistence d'un ARNt mitochondrial et d'un ARNt d'origine nucléaire pouvant a priori utiliser le même codon. Il s'agit de l'ARNt^{Val}(AAC) de *Marchantia polymorpha*. En effet, bien que l'ARNt^{Val}(UAC) codé par le génome mitochondrial permet, a priori, la lecture de tous les codons, l'ARNt^{Val}(AAC) cytosolique qui ne semble pas nécessaire pour la synthèse protéique mitochondriale est importé (Akashi et al., 1998).

1.3 Autres ARN importés

Aucun autre type d'ARN n'a été décrit à ce jour comme étant importé dans les mitochondries de plante. En revanche chez les mammifères, trois autres types d'ARN sont importés dans la mitochondrie. Il s'agit de l'ARN ribosomique 5S (Yoshionari et al., 1994; Magalhaes et al., 1998) et des composantes ARN de l'endoribonucléase MRP (« Mitochondrial RNA Processing ») (Chang and Clayton, 1989; Li et al., 1994) et de la ribonucléase P mitochondriale (RNase P) (Doersen et al., 1985; Kiss et al., 1992). La preuve directe d'importation de l'ARN 5S a été apportée *in vitro* dans des mitochondries humaines (Entelis et al., 2001b).

Finalement, une étude menée sur les cellules infectées par le VIH1 (« Virus de l'immunodéficience Humaine ») ont permis de localiser des niveaux élevés d'ARN viral dans les mitochondries de cellules infectées mais depuis aucune étude n'est venue étayer ces données (Somasundaran et al., 1994).

1.4 Importation d'ARNt dans les chloroplastes

De façon générale, les génomes chloroplastiques de plantes supérieures codent pour une trentaine d'espèces d'ARNt différents qui permettent le décodage de tous les codons (Hiratsuka et al., 1989; Maier et al., 1995; Lee et al., 2006). Des fractionnements bidimensionnels d'ARNt provenant de chloroplastes hautement purifiés montrent qu'aucun ARNt d'origine nucléaire n'est importé dans ces organelles (Pfitzinger et al., 1987). Néanmoins des exemples d'ADN chloroplastique ayant perdu plusieurs gènes d'ARNt ont été recensés dans la littérature chez les angiospermes parasites non photosynthétiques tels qu'*Epifagus virginiana* qui ne possède plus que 17 gènes d'ARNt (Morden et al., 1991) et *Orobanche minor* qui a perdu 10 gènes d'ARNt (Lohan and Wolfe, 1998). Le nombre d'ARNt chloroplastiques pour assurer une synthèse protéique étant insuffisant, il semble donc que ces organismes doivent importer des ARNt cytosoliques puisqu'il y a, a priori, une synthèse protéique fonctionnelle.

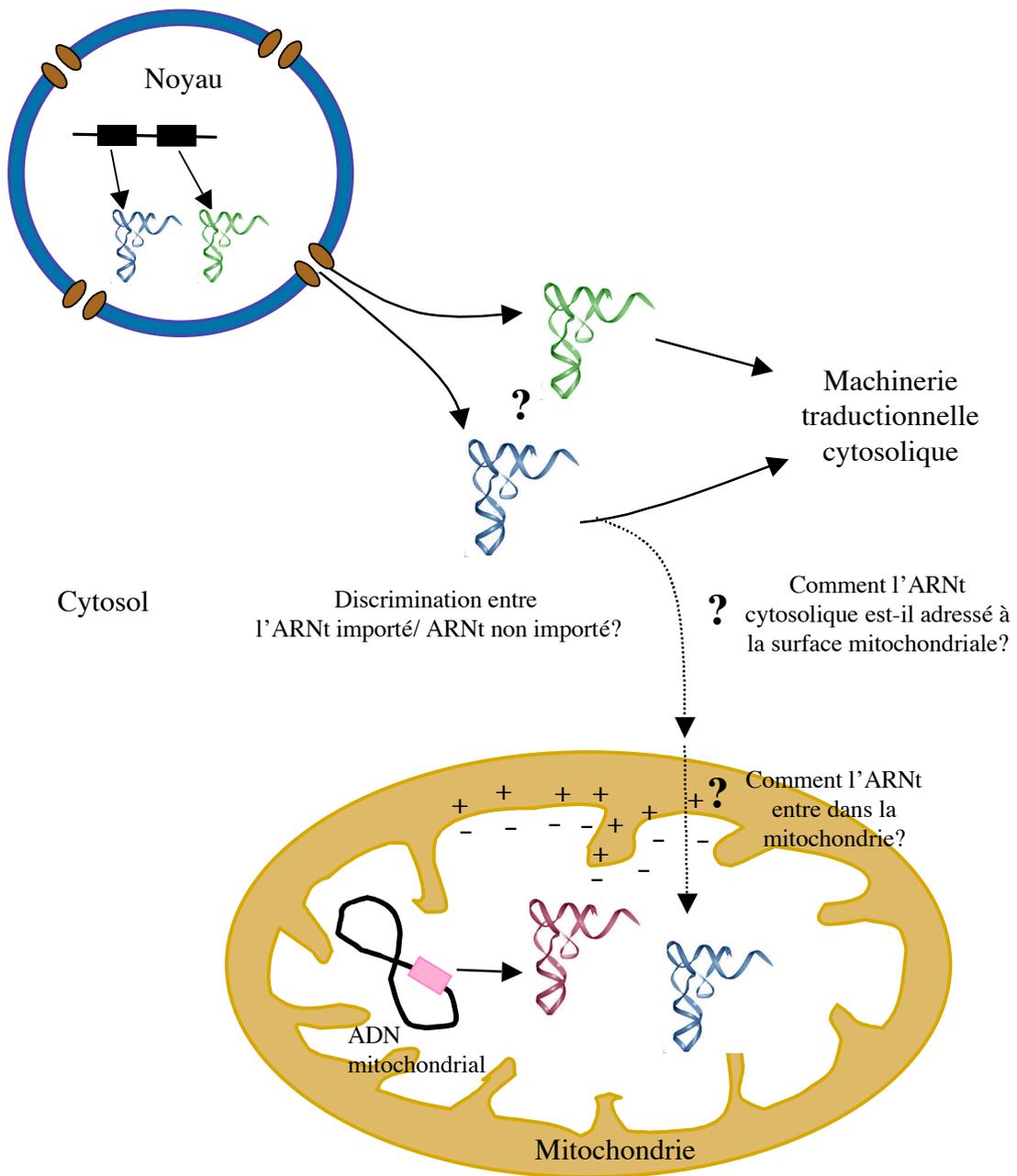


Figure 12: Problématiques de l'importation des ARNt

2. Les différents mécanismes d'importation des ARNt

De façon générale, lors de l'étude du processus d'importation des ARNt, trois questions essentielles se présentent à nous (Figure 12):

- Comment l'ARNt cytosolique est-il adressé à la surface mitochondriale ? D'après l'hypothèse du « channeling » (Negrutskii and Deutscher, 1991; Negrutskii and El'skaia, 2001), les ARNt ne seraient pas libres dans le cytosol et seraient ainsi acheminés jusqu'à la mitochondrie associées à d'autres molécules. Celles-ci pourraient jouer un rôle important dans l'importation, voire dans la spécificité.
- Pourquoi cet ARNt est-il importé et pas un autre ? Certains ARNt sont importés dans la mitochondrie alors que d'autres sont cytosol spécifiques. Ceci suppose que les ARNt sont discriminés et qu'il doit exister des « signaux » permettant de distinguer les ARNt importés des ARNt non importés.
- Comment l'ARNt traverse-t-il les membranes mitochondriales ? Pour rentrer dans la mitochondrie, l'ARNt doit contourner deux problèmes. Tout d'abord l'ARNt est d'une taille relativement grande (25 kDa), or la seule machinerie connue d'importation de macromolécules dans la mitochondrie est celle des protéines. D'autre part, l'ARNt est également une molécule négativement chargée. Pour rentrer dans la matrice, il doit donc aller à l'encontre du gradient électrochimique de la membrane interne mitochondriale.

La plupart des travaux visant à élucider les mécanismes d'importation ont été réalisés essentiellement à partir de trois types d'organismes qui sont la levure *S. cerevisiae*, certains protozoaires et les plantes supérieures. Différentes approches ont été utilisées pour cela :

- L'étude *in vivo* a été utilisée pour identifier les déterminants d'importation des ARNt cytosoliques dans la mitochondrie.
- Plusieurs études biochimiques ont été utilisées. Par exemple, des expériences de northwestern ont permis d'identifier les protéines mitochondriales interagissant avec les ARNt importés.
- Le système *in vitro* qui consiste à recréer l'importation des ARNt avec des mitochondries isolées (en présence ou non de facteurs) a permis l'étude du mécanisme d'importation et l'identification des facteurs protéiques impliqués dans ce processus.

L'ensemble de ces études ont permis d'établir différents modèles. Ci-dessous, nous allons passer en revue les principales données obtenues dans les trois systèmes modèles.

2.1 Chez la levure *S. cerevisiae* (cas de l'ARNt^{Lys}(CUU))

Des travaux récents de (Rinehart et al., 2005) ont décrit l'importation de deux ARNt^{Gln} isoaccepteurs, mais peu de données existent sur le mécanisme de transport mis en œuvre. Pour la description du mécanisme d'importation des ARNt chez *S. cerevisiae*, nous allons détailler essentiellement le mécanisme de transport de l'ARNt^{Lys}(CUU).

Chez la levure *S. cerevisiae*, il existe deux ARNt^{Lys} cytosoliques. L'un des deux, ARNt^{Lys}(CUU) (nommé tRK1), est importé dans la mitochondrie (2 à 5 % des ARNt cytosoliques) alors que l'autre ARNt^{Lys}, l'ARNt^{Lys}(SUU) (S : uracile modifié en mnm⁵s²U et nommé tRK2), est exclusivement cytosolique (Martin et al., 1979; Entelis et al., 1996).

2.1.1 Rôle fonctionnel de l'ARNt^{Lys}(CUU)

Le génome mitochondrial de *S. cerevisiae* code pour un ARNt^{Lys}(U*UU) (U* : uracile modifié en cmnm⁵U et nommé tRK3), qui grâce à la première position de l'anticodon contenant une uridine hypermodifiée, est capable de décoder les deux codons lysine, (AAA) et (AAG) (Martin et al., 1990). Malgré cela, la mitochondrie importe du cytosol un ARNt^{Lys} supplémentaire, l'ARNt^{Lys}(CUU), qui est capable de décoder le codon lysine (AAG), d'où une redondance. Ceci pose la question du rôle de cet ARNt^{Lys}(CUU) appelé tRK1, dans la mitochondrie. Deux études complémentaires ont permis de déterminer que tRK1 était fonctionnel dans la traduction mitochondriale :

-tRK1 muté au niveau de l'anticodon (CUU en CAU) n'est plus aminoacylé en lysine mais en méthionine. Cet ARNt muté, aminoacylé avec la méthionine marquée au [³⁵S], est importé dans les mitochondries de levure *in vitro*. L'incorporation de radioactivité dans les polypeptides néosynthétisés ont montré que tRK1(CAU) participait bien dans la traduction mitochondriale (Kolesnikova et al., 2000).

-tRK1 muté au niveau de l'anticodon (CUU en CUA) et au niveau du bras accepteur (C3:G70 en G3:U70) reconnaît le codon stop UAG et est aminoacylé en alanine. Une souche de levure où un codon stop prématuré UAG a été inséré dans le gène codant pour la sous-unité 2 de la cytochrome oxydase (cox 2), présente un phénotype de déficience respiratoire. L'expression *in vivo* de tRK1(G3:U70)(CAU) dans cette levure transfectée restaure la

fonction de respiration et la croissance de la levure et montre donc que tRK1(G3 :U70)(CAU) est non seulement importé mais intervient également dans la synthèse protéique mitochondriale (Kolesnikova et al., 2000).

Cependant, le fait que tRK1 puisse être utilisé dans la synthèse protéique mitochondriale ne signifie pas pour autant que c'est sa fonction réelle, ou du moins, sa seule fonction. D'autant plus que la lysyl-ARNt synthétase mitochondriale est incapable d'aminocycler tRK1 (Tarassov et al., 1995b). D'autres hypothèses quant au rôle de tRK1 ont donc été émises. Une première hypothèse qui se base sur la complémentarité de séquence entre tRK1 et plusieurs jonctions intron-exons de pré-messagers mitochondriaux, suggère la participation de tRK1 dans l'épissage des introns (Soidla, 1983). Une deuxième hypothèse émise dans les travaux de (Martin et al., 1979), suggère le rôle de tRK1 dans la transcription inverse ou dans la réplication de l'ADN dans la mitochondrie.

2.1.2 *Éléments requis pour l'importation*

Le système *in vitro* a montré que les conditions d'importation de tRK1 dans les mitochondries de *S. cerevisiae* sont semblables à celles qui sont nécessaires à l'importation des pré-protéines, à savoir l'hydrolyse de l'ATP et le potentiel membranaire (Tarassov and Entelis, 1992). Par ailleurs, l'importation de tRK1 nécessite l'aminocyclation de tRK1 par la lysyl-ARNt synthétase cytosolique (Entelis et al., 1996) et s'est révélé être dépendant de facteurs cytosoliques solubles comme la pré-lysyl-ARNt synthétase mitochondriale (Tarassov et al., 1995a) et l'énolase, enzyme de la glycolyse (Entelis et al., 2006). Cette importation nécessite également une machinerie d'importation des protéines mitochondriales intacte (Tarassov et al., 1995b; Entelis et al., 2002).

2.1.3 *Déterminants d'importation portés par l'ARNt^{Lys}(CUU)*

L'ARNt^{Lys}, tRK1, est importé alors que l'ARNt^{Lys}, tRK2, ne l'est pas. Ceci implique une très grande sélectivité d'importation. L'ARNt, tRK1 diffère de l'ARNt tRK2 en 21 positions et possède une base modifiée en position 34 (U*). Toutes les positions ont été étudiées par des constructions chimériques d'ARNt à la fois en importation *in vitro* et *in vivo*. Ces études ont permis de déterminer un lien direct entre la perte de reconnaissance pour la pré-lysyl-ARNt synthétase mitochondriale et l'absence d'importation. Cette interaction est très spécifique et dépendante de la structure tridimensionnelle de l'ARNt. Trois positions sont

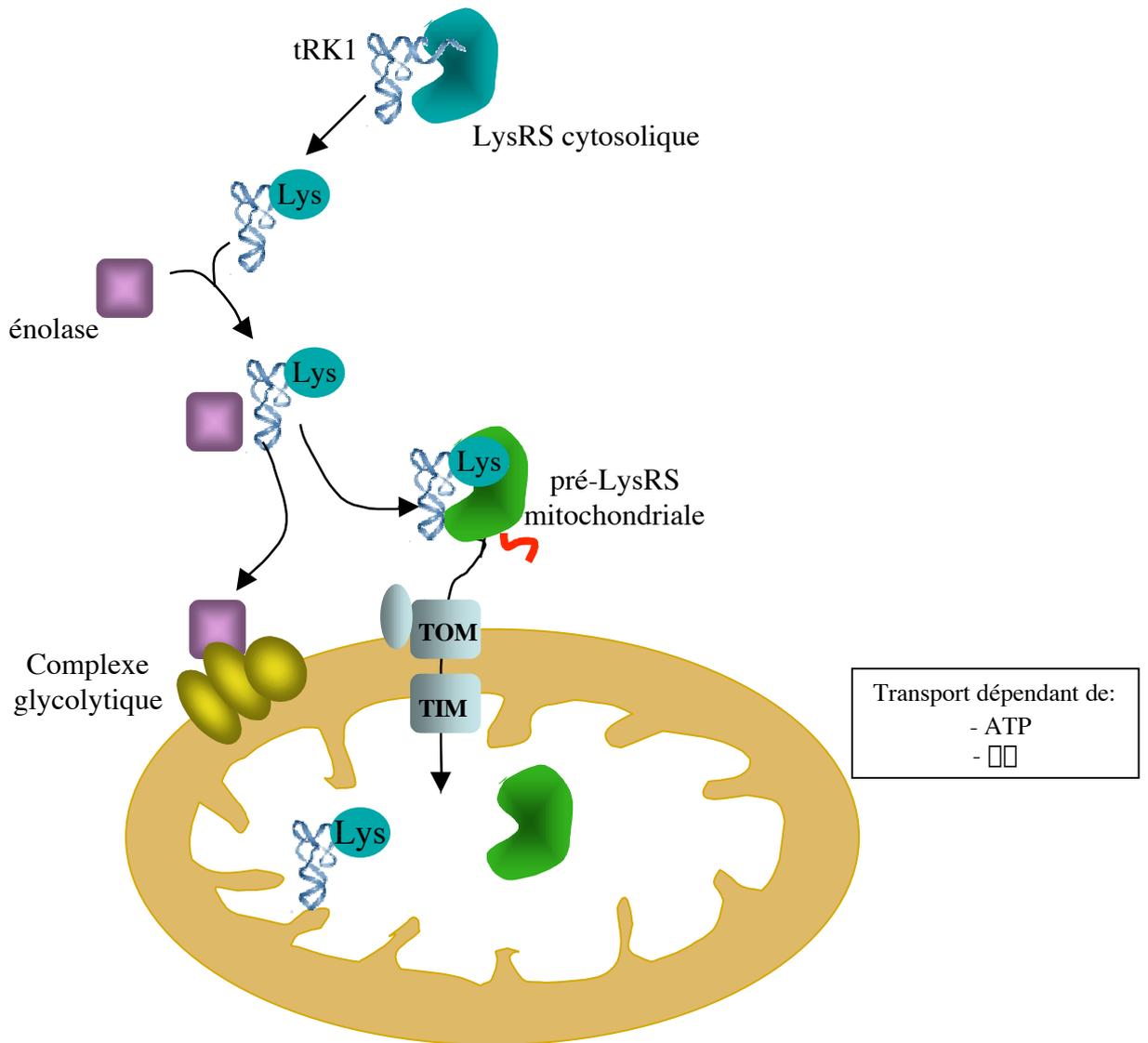


Figure 13 : Modèle du système d'importation de l'ARNt^{Lys} chez *S. cerevisiae* (d'après Entelis et *al.*, 2006).

LysRS: Lysyl-ARNt synthétase; Lys: Lysine; tRK1: ARNt^{Lys}(CUU)

TOM: complexe mitochondrial d'importation des protéines dans la membrane externe
 TIM: complexe mitochondrial d'importation des protéines dans la membrane interne.

$\Delta\psi$: potentiel membranaire

— séquence d'adressage

importantes pour l'importation : la position C34 au niveau de l'anticodon, la première paire de base (G1:C72) ainsi que la base discriminante G73 du bras accepteur (Entelis et al., 1998; Kazakova et al., 1999). Ces études ont également déterminé que la base modifiée en position 34 (U*) de tRK2 agit comme anti-déterminant pour l'importation (Entelis et al., 1998).

D'autre part, bien que des études aient montré que l'importation de tRK1 nécessitait l'aminocyclation par lysyl-ARNt synthétase, il a été observé que des mutants ayant gardé une affinité pour la pré-lysyl-ARNt synthétase, étaient importés sous forme aminocyclé ou non. L'aminocyclation de tRK1 par la lysyl-ARNt synthétase semble jouer, en fait, un rôle dans le changement de conformation de la structure de tRK1 permettant ainsi une meilleure interaction entre l'ARNt et la pré-lysyl-ARNt synthétase pour l'importation.

2.1.4 Modèle d'importation de l'ARNt^{Lys}(CUU)

L'ensemble des données décrites ci-dessus ont permis d'établir un modèle d'adressage de l'ARNt^{Lys} cytosolique dans les mitochondries (Figure 13).

Dans un premier temps, tRK1 doit être aminocyclé par la lysyl-ARNt synthétase cytosolique. C'est alors au niveau du cytosol que l'énolase, sous sa forme libre, fixerait tRK1 pour l'acheminer jusqu'à la surface mitochondriale (Entelis et al., 2006). tRK1 serait alors pris en charge par la pré-lysyl-ARNt synthétase mitochondriale. Ici l'énolase joue un double rôle, celui de transporteur pour l'adressage mitochondrial mais également celui de chaperone. En effet, cette interaction entre tRK1 et l'énolase provoquerait un changement conformationnel chez l'ARNt, facilitant et stabilisant l'interaction de tRK1 avec la pré-lysyl-ARNt synthétase qui est synthétisée à la périphérie de la mitochondrie (Entelis et al., 2006). Ainsi, au niveau de la surface mitochondriale, l'énolase incorporerait un complexe protéoglycolytique alors que le complexe pré-lysyl-ARNt synthétase / tRK1 serait ensuite adressé vers la mitochondrie. Des expériences ont montré que la protéine TOM20, au niveau de la membrane externe et la protéine TIM44 au niveau de la membrane interne étaient importantes pour l'importation (Tarassov et al., 1995b). Toutefois, la question de savoir comment l'ARNt est importé par le complexe TOM et TIM se pose. En effet, les protéines importées sont a priori dénaturées lors du passage à travers les complexes TOM et TIM. Cette perte temporaire de la structure tridimensionnelle de la lysyl-ARNt synthétase implique par conséquent la perte des interactions protéine/ARNt. Par ailleurs, des expériences *in vitro* ont montré que l'ARNt^{Lys} était importé dans la mitochondrie sous une forme structurée (Entelis et al., 1998).

| Organisme | Type d'expérience | ARN | Éléments d'identité | Récepteurs | ATP | □□ | Facteurs cytosoliques |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|-----|------------------------------------|-----------------------|
| <i>L. donovani</i> <i>L. tropica</i> (Mahapatra et al., 1994) (Bhattacharyya et al., 2002) | - <i>in vivo</i> - <i>in vitro</i> - biochimiques - SELEX | - ARN précurseur - ARN mature - minihélices - aptamères | -boucle D -boucle Anticodon -boucle variable | -TAB (membrane int.) -RIC (membrane ext.) | oui | oui passage de la membrane int. | non |
| <i>L. tarentaloe</i> (Rubio et al., 2000) | - <i>in vivo</i> - <i>in vitro</i> | - ARN précurseur - ARN mature - petits ARN | -boucle D -anticodon -boucle variable -structure tertiaire -bases modifiés | oui ? | oui | non | non |
| <i>T. Brucei</i> (Yremovsky- Kammerer et al., 1999) | - <i>in vivo</i> - <i>in vitro</i> | - ARNt en tandem - ARN précurseur avec extrémité 5' | -ARN précurseur -séquence consensus en 5' des gènes | oui ? | oui | oui | non |
| <i>T. Brucei</i> (Nabholz et al., 1999) | - <i>in vivo</i> - <i>in vitro</i> | - fragments d'ARN | -Boucle T | oui ? | oui | non | non |

Table 5: Tableau récapitulatif des études faites sur les protozoaires.

2.1.5 Cas des ARNt^{Gln}

Les travaux Rinehart et *col.*, ont récemment décrit l'importation *in vitro* de deux ARNt, l'ARNt^{Gln}(CUG) et l'ARNt^{Gln}(UUG) dans la mitochondrie de levure *S. cerevisiae* (Rinehart et al., 2005). L'importation de ces deux isoaccepteurs se fait sous une forme non aminoacylée et en absence de tout facteur cytosolique. De ce fait, il semble que le mécanisme d'importation de ces deux ARNt^{Gln} diffère de celui décrit pour l'ARNt^{Lys}.

2.2 Chez les protozoaires

Chez les protozoaires, la majeure partie des travaux a été effectuée chez *Leishmania* et *Trypanosoma*. Les trypanosomatidés, famille dont ces deux organismes font partie, représentent le cas extrême du phénomène d'importation puisque l'ensemble des ARNt mitochondriaux sont importés du cytosol. Ainsi, l'ensemble des ARNt sont présents dans le cytosol et dans la mitochondrie, à l'exception de l'ARNt^{Met-i} chez *Trypanosoma brucei* qui est cytosol spécifique (Kapushoc et al., 2002; Tan et al., 2002).

Chez les protozoaires quatre systèmes *in vitro* ont été mis en place : le premier système a été réalisé chez *L. donovani* et *L. tropica* (Mahapatra et al., 1994; Bhattacharyya et al., 2002), le deuxième chez *L. tarentaloe* (Rubio et al., 2000) et finalement les deux derniers chez *T. brucei* (Nabholz et al., 1999; Yermovsky-Kammerer and Hajduk, 1999) (Table 5).

2.2.1 Éléments requis pour l'importation

La Table 5 regroupe les différentes données obtenues par les quatre systèmes.

Ces quatre systèmes indiquent que l'importation des ARNt chez les trypanosomes est un processus ATP dépendant et ne nécessite pas de facteurs cytosoliques. Chez *Leishmania*, l'amination des ARNt n'affecte pas leur importation *in vitro* (Bhattacharyya and Adhya, 2004a) et des études *in vivo* chez *T. brucei* ont montré qu'un ARNt pouvait être importé dans la mitochondrie sans être aminoacylé (Schneider et al., 1994). Ceci suggère donc que les aminoacyl-ARNt synthétases, à la différence du modèle de la levure, ne sont pas impliquées dans l'importation des ARNt. D'autre part, des expériences de compétition d'importation des protéines en présence d'un excès d'ARNt chez *T. brucei* (Nabholz et al., 1999) et la présence de facteurs membranaires cytosoliques spécifiques chez *Leishmania* (Bhattacharyya and

Adhya, 2004a) indiquent que le canal d'importation des protéines n'est pas impliqué dans le transport des ARNt.

Par contre, en ce qui concerne le besoin du potentiel membranaire et les déterminants d'importation des ARNt, les avis sont beaucoup plus divergents (pour des revues (Schneider and Marechal-Drouard, 2000; Entelis et al., 2001a; Bhattacharyya and Adhya, 2004a)). Pour expliquer ces différences, deux éléments doivent être pris en compte. Tout d'abord, *Leishmania* et *Trypanosoma*, bien qu'appartenant à la même famille, sont connus pour être des organisme évolutivement éloignés. D'autre part, les méthodes employées pour purifier les mitochondries et pour effectuer les expériences *in vitro* (par exemple les substrats utilisés pour l'importation (Table 5)) diffèrent d'un groupe à l'autre ce qui pourrait expliquer aussi les contradictions.

Le passage des ARNt à travers les membranes mitochondriales a principalement été étudié par le groupe d'Adhya chez *L. donovani* et *L. tropica*. Dans ce système, le canal d'importation est bipartite, c'est-à-dire que le canal au niveau de la membrane externe serait indépendant du canal de la membrane interne (Mukherjee et al., 1999). Au niveau de la membrane externe une protéine de 15 kDa nommée TAB (« Tubulin Antisens Binding ») fixant les ARNt a été identifiée comme étant impliquée dans l'import des ARNt (Adhya et al., 1997). Plus récemment, au niveau de la membrane interne un grand complexe de 640 kD appelé RIC (« RNA Import Complex ») a également été identifié comme étant impliqué dans le transport des ARNt à travers la membrane interne (Bhattacharyya et al., 2003). Nous y reviendrons lors de la présentation du modèle (paragraphe 2.2.4).

2.2.2 Signaux d'importation portés par les ARNt

a. Chez *Trypanosoma brucei*

Chez *T. brucei*, les données sont contradictoires. Des études montrent que les ARNt sont importés sous forme de précurseur et qu'une séquence consensus (YGG(C/A)RRC) en 5' des gènes nucléaires codent pour des ARNt mitochondriaux permettrait la localisation mitochondrial des précurseurs (LeBlanc et al., 1999; Yermovsky-Kammerer and Hajduk, 1999; Sherrer et al., 2003). Par contre, d'autres études montrent que les ARNt sont importés sous leur forme mature (Tan et al., 2002) et que l'hélice du bras T est nécessaire et suffisante pour l'importation de l'ARNt^{Met-e} (Crausaz Esseiva et al., 2004).

b. Chez *Leishmania*

Des études chez *Leishmania* montrent que la boucle D possède un signal important pour l'importation des ARNt (Chen et al., 1994; Mahapatra et al., 1994; Sbicego et al., 1998; Suyama et al., 1998). Il a d'ailleurs été montré qu'un complexe stable peut se former entre la boucle D et le récepteur de 15 kD localisé au niveau de la membrane externe (Adhya et al., 1997). Cependant, le remplacement de la boucle D de l'ARNt^{Ile} (importé) par celle de l'ARNt^{Gln}(CUG) (non importé) n'abolit pas son importation *in vivo* ce qui indique que d'autres signaux au sein de l'ARNt sont importants pour l'importation (Lima et al. 1996). De plus, des études *in vivo* suggèrent que les signaux d'importation pour le canal de la membrane externe et le canal de la membrane interne sont différents (Bhattacharyya et al., 2000).

C'est avec l'utilisation de la méthode SELEX chez *L. tropica* que des nouveaux signaux d'importation ont été identifiés. En effet, la méthode SELEX a permis de choisir une variété d'aptamères à haute affinité d'importation. La comparaison de ces aptamères avec les séquences des ARNt importés dans la mitochondrie et des expériences d'import *in vivo* et *in vitro* de ces aptamères ont permis de déterminer deux classes d'ARNt importés. Le type I contient le motif YGGYAGAGY ou YGGYAAGY au niveau de la région du bras D ou de l'anticodon. Le type II contient le motif UGGGU ou UGGGGU au niveau de la boucle variable et du domaine T. Les aptamères de type I traversent efficacement la membrane interne alors que les aptamères de type II la traversent avec une faible efficacité. De plus, ceux de type I stimulent le transfert des types II et inversement ceux de type II inhibent le transport des ARNt de type I. Il semble donc qu'en modulant ainsi les affinités des ARNt au niveau de la membrane interne, par des interactions coopératives et antagonistes, la mitochondrie régule le « pool » d'ARNt importés (Bhattacharyya et al., 2002).

Finalement, d'autres travaux montrent que les modifications des bases peuvent aussi être à l'origine de la sélectivité d'importation. Une uridine modifiée mcm5U, présente dans une minorité d'ARNt^{Gln}, ARNt^{Glu} ou ARNt^{Lys} servirait de signal d'adressage mitochondrial, alors que ceux ayant subi une thiolation (mcm5sU) serait un anti-déterminant d'importation (Kaneko et al., 2003).

2.2.3 Cas de *Tetrahymena thermophila*

Chez ce protozoaire, la spécificité d'importation a été étudiée dans le cas des ARNt^{Gln} isoaccepteurs. En effet, chez *T. thermophila* aucun gène mitochondrial ne code pour un ARNt^{Gln}. Des études *in vivo* ont montré qu'il existait trois ARNt^{Gln} codés par le génome

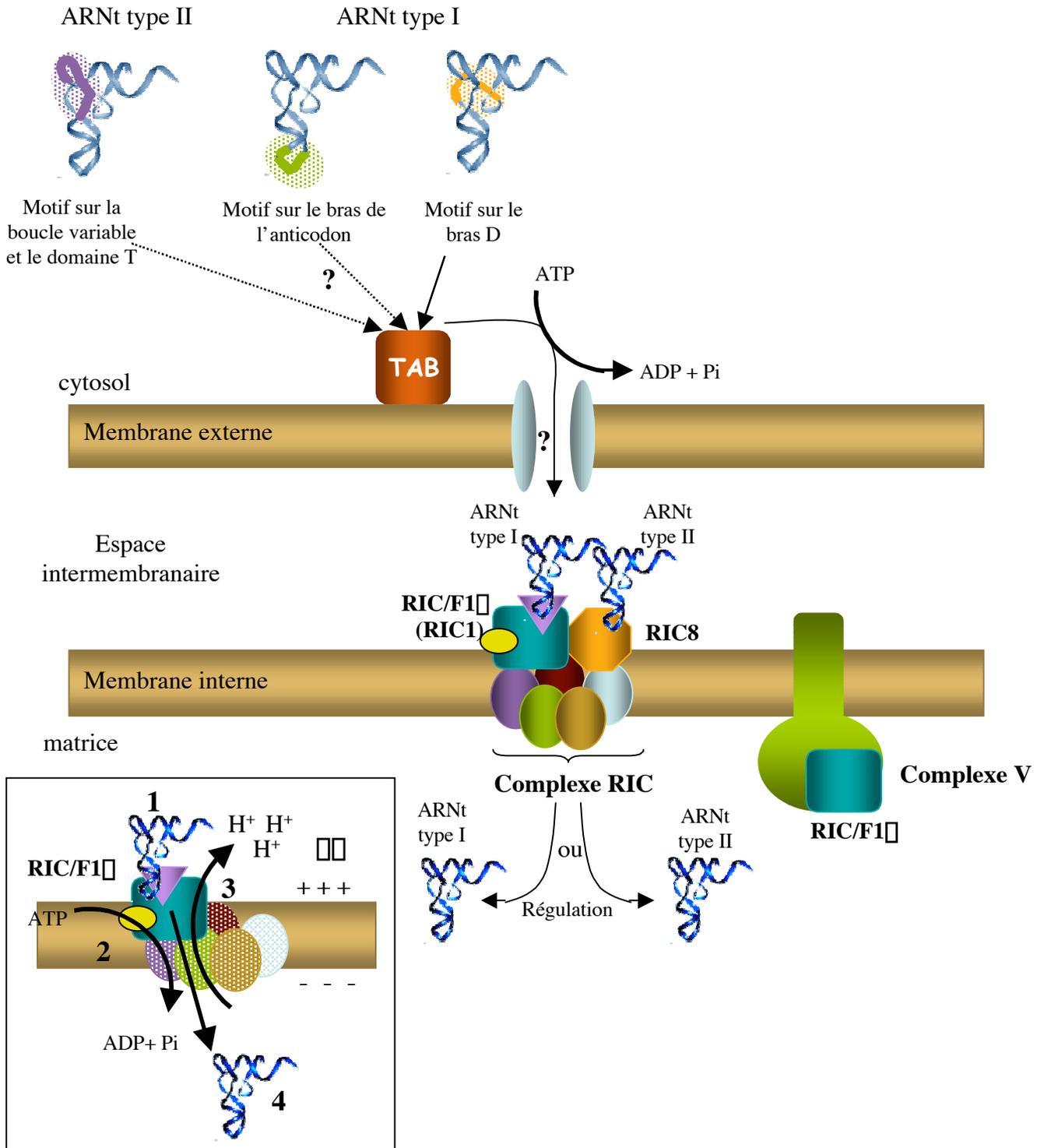


Figure 14 : Modèle du système d'importation des ARNt chez *Leishmania* (inspiré de (Bhattacharyya et al., 2000), (Bhattacharyya et al., 2006).

TAB: récepteur de la membrane externe; RIC: complexe d'importation des ARNt dans la membrane interne (RNA Import Complex); RIC/F1: Sous-unité du complexe RIC, homologue de la sous-unité du complexe V. Chez *Leishmania* cette sous-unité peut être associée au complexe RIC ou au complexe V. Le triangle mauve indique le site de fixation des ARNt exposé dans RIC mais pas dans le complexe V. L'ovale jaune indique le site de fixation de l'ATP

L'encadré indique les différentes étapes pour le passage des ARNt. 1) Fixation de l'ARNt sur le récepteur. 2) Hydrolyse de l'ATP. 3) Formation d'un gradient de proton. 4) Passage de l'ARNt.

nucléaire dont deux exclusivement cytosoliques, l'ARNt^{Gln}(CUA) et l'ARNt^{Gln}(UUA). Le troisième ARNt^{Gln}, l'ARNt^{Gln}(UUG) est trouvé à la fois dans le cytosol et dans la mitochondrie. Ces trois ARNt^{Gln} ont des séquences différentes au niveau du bras accepteur, du bras D et du bras de l'anticodon. L'expression *in vivo* de différentes constructions chimériques des trois ARNt^{Gln} ont montré que l'anticodon était important pour l'importation mitochondriale. Ainsi, le changement de l'anticodon (UUA) en (UUG) de l'ARNt^{Gln}(UUA) a permis son importation (Rusconi and Cech, 1996a, b).

2.2.4 Modèle d'importation (cas de *Leishmania*)

Le modèle ici présenté ici recouvre uniquement les résultats obtenus chez *L. donovani* et *L. tropica* (Figure 14).

Tout d'abord, les ARNt destinés à être importés sont reconnus et fixés sur la membrane externe par le récepteur membranaire TAB. Après le passage ATP dépendant à travers la membrane externe, les ARNt sont pris en charge par le complexe RIC. Les composants RIC1 et RIC8 ont été identifiés comme étant les récepteurs du complexe RIC des ARNt de type I et de type II respectivement. Une régulation allostérique se met alors en place pour permettre le passage soit de l'ARNt de type I soit de l'ARNt de type II sans qu'il y ait compétition entre l'un et l'autre et permettant ainsi de réguler les différents ARNt importés dans la matrice mitochondriale (Bhattacharyya et al., 2003). Le passage des ARNt à travers la membrane interne paraît être un passage à plusieurs étapes ayant besoin d'énergie et générant un potentiel membranaire local. En effet, la fixation de l'ARNt sur le récepteur provoquerait le transport de l'ATP dans la matrice via une translocase et le complexe ARNt-récepteur induirait l'hydrolyse de l'ATP par une ATPase au sein de RIC. Cette hydrolyse serait accompagnée d'un pompage de proton depuis la matrice jusqu'à l'espace inter-membranaire provoquant ainsi un gradient de protons permettant l'ouverture du canal et le passage de l'ARNt. Les protons pourraient agir à ce niveau pour neutraliser la charge négative de l'ARNt ou bien ils induiraient un passage électrophorétique de l'ARNt (Bhattacharyya and Adhya, 2004b). Parmi les composants de RIC, seuls RIC1 et RIC8 ont été identifiés. RIC8 a été identifié comme l'homologue de la sous-unité 6b de l'ubiquinol cytochrome c réductase du complexe III de la chaîne respiratoire mitochondriale (Chatterjee et al., 2006) et RIC1 comme l'homologue de la sous-unité α de l'ATP synthase (Goswami et al., 2006).

RIC1 qui a été nommé par la suite RIC1/F1 α , est capable d'être actif au niveau du complexe RIC mais également au niveau du complexe V. Néanmoins, sa disposition dans l'un

| Facteurs requis pour l'importation | |
|---------------------------------------------|-------------------------------|
| facteurs cytosoliques | non |
| aminoacylation | non |
| mitochondries (équivalent en protéines) | 2 mg/mL de milieu réactionnel |
| ATP | 5 mM |
| ADP | 40 μ M |
| pH | 7,2-7,5 |
| transcrit ARN ^t ^{Ala} | 2 nM |
| temps d'internalisation | 20 min |
| potentiel membranaire | oui |
| récepteur membranaire (membrane externe) | oui |

Table 6 : Bilan des facteurs requis pour l'importation *in vitro* (d'après Delage et *al.*, 2003)

et l'autre complexe semble être différente puisque le site de fixation pour les ARNt est exposé dans le complexe RIC alors qu'il ne l'est pas dans le complexe V (Goswami et al., 2006). Cette protéine a un site de fixation de l'ATP, et des études plus récentes indiquent que cette même protéine a une activité ATPase. Étant donné qu'aucun site d'activité ATPase n'a été trouvé sur RIC1/F1 α , les auteurs proposent que l'interaction entre la partie C-terminale de la protéine avec le domaine D des ARNt type I provoquerait un changement conformationnel mettant à jour le site catalytique. De ce fait, la protéine RIC1/F1 α deviendrait le principal convoyeur d'énergie permettant le transport des ARNt dans la matrice mitochondriale (Goswami and Adhya, 2006).

2.3 Chez les plantes

L'ensemble des plantes importe des ARNt dans leurs mitochondries. Cependant, le nombre et l'identité des ARNt importés varient d'une espèce à l'autre. Ainsi ce nombre est de trois chez *Marchantia polymorpha*, d'un tiers à la moitié chez les angiospermes et les gymnospermes et de la quasi-totalité chez *Chlamydomonas reinhardtii* (Schneider and Marechal-Drouard, 2000).

Au moment où j'ai débuté ma thèse, les principales données concernant le mécanisme d'importation des ARNt provenaient d'expériences *in vivo* et du système d'importation *in vitro* nouvellement mis en place (Delage et al., 2003b). L'ensemble des données obtenues sont décrites ci-dessous.

2.3.1 Éléments requis pour l'importation

Le système *in vitro* a montré que l'importation d'ARNt nécessite la présence d'ATP, un potentiel membranaire intact et peut se faire en absence de tout facteur cytosolique (Table 6). Contrairement au système *in vitro* de *S. cerevisiae*, l'ARNt peut être importé dans la mitochondrie sans être sous forme aminoacylé. D'autre part, l'absence d'importation d'ARNt lors d'expériences d'importation avec des mitochondries isolées ayant subi un traitement doux à la trypsine suggère la présence de facteurs membranaires impliqués dans l'importation des ARNt au niveau de la surface mitochondriale (Delage et al., 2003b).

| ARNt | mutation | aminoacylation | importation |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------|-------------|
| ARNt ^{Leu} (CAA) (Small et <i>al.</i> , 1992) | -Insertion de UCGA dans l'anticodon | oui | oui |
| ARNt ^{Ala} (UGC) (Dietrich et <i>al.</i> , 1996) (Carneiro et <i>al.</i> , 1994) | -Insertion de UCGA dans l'anticodon | oui | oui |
| | -U70 \Rightarrow C70 | non | non |
| ARNt ^{Val} (AAC) (Delage et <i>al.</i> , 2003) (Laforest et <i>al.</i> , 2004) | -bras de l'anticodon | oui | oui |
| | -anticodon AAC \Rightarrow CAU | non en Val oui en Met | non |
| | -bras D | oui | non |
| | -bras T | oui | non |

Table 7: Importation d'ARNt mutés dans les mitochondries végétales

2.3.2 Rôle des aminoacyl-ARNt synthétases

Les études faites *in vivo* suggèrent fortement l'implication des aminoacyl-ARNt synthétases. En effet, plusieurs expériences ont permis de corrélérer aminoacylation et importation. Par exemple, tant une mutation en position 70 de l'ARNt^{Ala} qu'un changement de l'anticodon de l'ARNt^{Val}, qui abolissent la reconnaissance des ARNt par leur aminoacyl-ARNt synthétases respectives, inhibent aussi leur importation dans les mitochondries (Dietrich et al., 1996a; Delage et al., 2003a) (Table 7).

Toutefois, dans le système *in vitro*, les ARNt n'ont pas besoin d'être aminoacylés pour être importé et aucun facteur cytosolique est nécessaire pour l'importation des ARNt. De plus, *in vivo*, plusieurs éléments ont également suggéré que si l'implication de ces enzymes était nécessaire, elles ne semblaient pas suffisantes pour l'importation des ARNt dans la mitochondrie. Une première expérience montrait que l'expression dans des pommes de terre transgéniques de l'asparagyl-ARNt synthétase cytosolique de levure couplée à une préséquence mitochondriale de plante ne permettait pas à l'ARNt^{Asp} cytosolique d'être importé alors que l'arminoacyl-ARNt synthétase mature était trouvée dans les mitochondries (Dietrich et al., 1996b). Il a également été montré que la co-expression de la forme précurseur de l'alanyl-ARNt synthétases mitochondriale d'*A. thaliana* et de l'ARNt^{Ala} cytosolique de cette plante ne permettait pas non plus l'importation de l'ARNt^{Ala} dans la mitochondrie de *S. cerevisiae* transgénique (Mireau et al., 2000). Finalement, l'importation sélective des ARNt^{Gly}(UCC) et (CCC) cytosoliques par rapport à l'ARNt^{Gly}(GCC) cytosol spécifique, dans les mitochondries de plantes dicotylédones a grandement contribué à renforcer cette idée (Brubacher-Kauffmann et al., 1999). Ces trois ARNt^{Gly} étant reconnus par la même glycyl-ARNt-synthétase, d'autres déterminants doivent intervenir pour expliquer cette importation différentielle.

2.3.3 Déterminants d'importation

Pour mieux définir la corrélation entre aminoacylation et importation, et essayer de mettre en évidence des déterminants d'importation portés par les ARNt, une approche transgénique a été utilisée sur l'ARNt^{Val}(AAC) (importé) et l'ARNt^{Met-e}(CAU) (non importé). La construction d'ARNt chimériques a permis de mettre en évidence deux régions importantes pour l'importation de l'ARNt^{Val}: la boucle D (Delage et al., 2003a) et la boucle T (Laforest et al., 2005). Ces deux domaines bien qu'ils ne soient pas des régions d'identité

| Systèmes <i>in vitro</i> | <i>S. cerevisiae</i> | protozoaires | plantes |
|--------------------------------------------|----------------------|---------------------------------------|-------------------------------------------|
| Besoin en ATP | oui | oui | oui |
| Besoin en potentiel membranaire | oui | ? divergences selon les auteurs | oui |
| Facteurs cytosoliques | oui | non | non |
| Implication du canal TOM/TIM | oui | non | pas testé |
| Implication des aminoacyl-ARNt synthétases | oui | non | non <i>in vitro</i> oui <i>in vivo</i> |
| Récepteurs sur la membrane externe | oui | oui | oui |

Table 8: Bilan des différents systèmes d'importation *in vitro* des trois organismes modèles

reconnues par la valyl-ARNt synthétase, constituent des déterminants d'importation majeurs dans les mitochondries de tabac (Table 7). Ces premières expériences indiquent donc que, chez les plantes, en plus du rôle probable des aminoacyl-ARNt synthétases dans ce processus, les ARNt cytosoliques possèdent d'autres déterminants essentiels pour leur localisation mitochondriale.

2.4 Bilan

Trois modèles ont été utilisés pour l'étude de l'importation des ARNt dans les mitochondries : *S. cerevisiae*, les protozoaires et les plantes. Ces modèles présentent à la fois des différences et des éléments communs (Table 8).

Chez *S. cerevisiae*

Pour l'importation de l'ARNt^{Lys} trois facteurs cytosoliques ont été mis en évidence. : la lysyl-ARNt synthétase cytosolique qui va aminoacyler l'ARNt^{Lys} avant son importation, l'énolase qui va acheminer l'ARNt^{Lys} jusqu'à la surface mitochondriale et la prélysyl-ARNt synthétase mitochondriale qui va permettre le co-transport de l'ARNt. Cette importation se fait via le canal d'importation des protéines. L'importation de l'ARNt est dépendante de l'ATP et a besoin du potentiel membranaire.

Chez *Leishmania*

L'importation *in vitro* des ARNt se fait en absence de tout facteur cytosolique et ne se fait pas par le canal d'importation des protéines. Des études *in vivo* chez *Trypanosoma brucei* ont montré que l'amination des ARNt n'est pas nécessaire pour l'importation. Chez *Leishmania*, au niveau de la membrane externe, un récepteur de 15 kDa appelé TAB est impliqué dans la fixation des ARNt et au niveau de la membrane interne, un complexe appelé RIC composé de sous-unités homologues aux sous-unités des complexes respiratoires, permet l'importation des ARNt. L'importation des ARNt est dépendante de l'ATP et en ce qui concerne le besoin du potentiel membranaire les avis sont divergents.

Chez les plantes

Des études *in vivo* ont montré qu'il existait une corrélation entre aminoacylation et importation mettant ainsi en évidence l'implication des aminoacyl-ARNt synthétases. Par

contre *in vitro*, aucun facteur cytosolique est nécessaire pour l'importation des ARNt et ceux-ci ne doivent pas être aminoacylés pour être importés. La sensibilité de l'importation des ARNt aux traitements aux protéases des mitochondries, a montré qu'il existait un ou des récepteurs, au niveau de la membrane externe, impliqués dans l'importation des ARNt. Toutefois, ceux-ci restent à être identifiés. Cette importation est dépendante de l'ATP et a besoin du potentiel membranaire.

Travaux de thèse

Mon travail de thèse s'est organisé autour de deux grands axes d'étude du mécanisme d'importation des ARN de transfert dans les mitochondries de plante. Tout d'abord, je me suis intéressée aux déterminants d'importation des ARNt (Chapitre I). Ensuite, je me suis intéressée aux facteurs membranaires mitochondriaux impliqués dans l'importation des ARNt (Chapitre II et III).

Chapitre I : Etude de la spécificité d'importation des ARNt cytosoliques dans la mitochondrie de plante : le modèle des ARNt^{Gly} isoaccepteurs.

Chez les plantes, le processus de transport d'ARNt est hautement sélectif puisque seuls certains ARNt cytosoliques se retrouvent dans la mitochondrie. Des études ont montré qu'il existe une corrélation stricte entre aminoacylation et importation renforçant l'idée d'une implication des aminoacyl-ARNt synthétases dans ce transport. Toutefois, il s'est avéré que des mutations au niveau du domaine T et D de l'ARNt^{Val}, bien que n'affectant pas son aminoacylation, inhibent son importation. Ceci a donc conforté des résultats précédents qui indiquaient que les aminoacyl-ARNt synthétases bien que nécessaires, ne sont pas suffisantes. Aussi dans le cadre de ma thèse, nous avons choisi d'étudier les déterminants d'importation d'un autre couple d'ARNt : les ARNt^{Gly} isoaccepteurs (UCC) et (GCC). En effet, d'une part les ARNt^{Gly} isoaccepteurs présentent une importation différentielle chez les plantes dicotylédones, d'autre part ces ARNt sont a priori reconnus par les mêmes glycylation synthétases. Ces deux points en font un modèle d'étude intéressant.

Chapitre II : Identification de protéines membranaires mitochondriales impliquées dans l'importation des ARNt chez les plantes

Chez les plantes, les données concernant les protéines impliquées dans la machinerie d'importation des ARNt dans la mitochondrie étaient très limitées au début de cette étude. Une approche biochimique initiée avant mon arrivée a permis de déterminer qu'une

protéine « Voltage Dependent Anion Channel » (ou VDAC) ayant une taille de 34 kD et localisée au niveau de la membrane externe mitochondriale de pomme de terre pouvait interagir avec les ARNt. La question principale étant l'implication ou non de cette VDAC34 dans le transport des ARNt, nous avons donc fait des études biochimiques et utilisé le système d'importation *in vitro*, pour le démontrer. Ainsi, les travaux effectués au cours de ma thèse se sont principalement focalisés sur le transport des ARNt au niveau de la membrane externe. Cependant certaines expériences nous ont aussi fourni des informations quant à l'implication ou non de certaines protéines de la membrane interne dans ce processus.

Chapitre III : Etude de l'interaction entre la protéine membranaire VDAC34 et les ARN de transfert

Jusqu'à ce jour, aucun motif de fixation aux ARN n'a été trouvé sur la protéine VDAC. Aussi, nous avons voulu caractériser l'interaction entre cette protéine et les ARN de transfert. Pour cela, nous avons tiré parti du fait qu'il existe deux isoformes majeurs de VDAC au niveau de la membrane externe mitochondriale de pomme de terre : VDAC34 et VDAC36. Or, il a été montré au laboratoire que seule la VDAC 34 pouvait interagir avec les ARNt. Ainsi, afin de délimiter la ou les régions importantes pour l'interaction, différentes protéines mutantes ont été réalisées. Ces protéines ont été surexprimées chez *E. coli* puis purifiées pour être finalement testées *in vitro* pour leur interaction avec les ARNt par des expériences de northwestern.

MATERIEL ET METHODES

I. MATERIEL

1. Matériel végétal

Solanum tuberosum : Des tubercules de pomme de terre (variété Bintje) non traités contre la germination et provenant d'une production locale ont servi à isoler les mitochondries. Ils peuvent être conservés à l'obscurité pendant quelques semaines dans une chambre thermostatée à 25°C. Ce matériel a été utilisé pour la plupart des études biochimiques mitochondriales.

Phaseolus vulgaris : Les hypocotyles de haricot sont à la base des préparations enzymatiques ayant servi à tester les transcrits d'ARNt en aminoacylation.

Nicotiana tabacum : Les transformations par l'intermédiaire d'*Agrobacterium* ont été réalisées avec les cellules BY2 de tabac.

2. Souches bactériennes

2.1 Souches *Escherichia coli*

M15 (Qiagen) : NaI, Str^S, Rif^S, Thi⁻, Lac⁻, Ara⁺, Gal⁺, Mtl⁻, F⁻, RecA⁺, Uvr⁺, Lon⁺

TG2 : *supE hsdΔ5 thi Δ(lac-proAB) Δ(srl-recA)306::Tn10 (tet^r) F' {traD36 proAB⁺ lac I^rZΔM15}*

TOPO10F' (Invitrogen) : F' {(lacI^rTn10(Tet^R)} *mcrA d(mrr-hshRMS-mcrBC) p80lacZdM15 dlacX74recA1araD139 d(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG*

2.2 Souche *Agrobacterium tumefaciens*

LBA4404 : Cette souche est résistante à la rifampicine et à la streptomycine. Elle possède le plasmide Ti désarmé *pAL4404* qui porte les gènes de virulence *vir* dont les produits permettent l'intégration en *trans* de l'ADN-T dans le génome de la plante hôte.

3. Plasmides

pUC18, pUC19

Le vecteur pUC18 (Stratagène) de 2,7 kb comporte une origine de réplication reconnue dans *E. coli*. Ce vecteur porte le gène codant pour la β -lactamase qui confère aux bactéries transformées la résistance à l'ampicilline permettant de sélectionner les transformants. La cassette de clonage est insérée en phase dans le gène codant pour la partie N-terminale de la β -galactosidase placé sous le contrôle du promoteur *lac* inducible par l'isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG). En absence d'insert, la complémentation de l'activité de la β -galactosidase permet, après induction par l'IPTG, l'hydrolyse de l'X-Gal (analogue du substrat naturel de l'enzyme) présent dans le milieu de culture. Cette hydrolyse conduit à la coloration en bleu des bactéries transformées par un vecteur sans insert. Par contre, la présence d'un insert dans la cassette de clonage produit un changement de phase qui génère une protéine de fusion aberrante supprimant la complémentation et conduisant à l'obtention de colonies blanches. C'est le principe de l' α -complémentation.

pKS(+), pSK(-)

Ces vecteurs, de type pBluescript, dérivent de pUC19 (Stratagène). pKS et pSK diffèrent par l'orientation de leur cassette de clonage. Ils possèdent une origine de réplication de phage filamenteux et le signe - ou + indique l'orientation du brin d'ADN qui est produit si la culture de bactéries est infectée par un phage dit "helper". La cassette de clonage est flanquée par des séquences promotrices des ARN polymérases des phages T3 et T7, permettant la transcription des inserts d'ADN.

pCR®II-TOPO

Le vecteur pCR®II-TOPO (Invitrogen) de 3,9 kb possède des extrémités 3' dT sortantes ainsi que 2 sites de restrictions *EcoRI* flanquant le site d'insertion, ceci afin d'exciser facilement le fragment inséré. De même, 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 le gène codant pour la β -lactamase qui confère aux bactéries transformées la résistance à l'ampicilline ainsi qu'un gène de la β -galactosidase permettant la sélection des bactéries ayant un insert selon le principe de l' α -complémentation.

pBINplus

Ce plasmide de 12,3 kb dérive du plasmide *pBiN19* et est utilisé pour obtenir des cellules transgéniques. Il est dit binaire car son origine de répllication RK2 permet la production de plasmides dans *E. coli* et *A. tumefaciens*. Il possède également l'origine de répllication Col E1 lui permettant de multiplier environ par 4 le nombre de copies chez *E. coli* par rapport au réplicon RK2. Il contient les gènes NPT III et NPT II qui confèrent la résistance à la kanamycine. Le gène NPT III permet la sélection des bactéries transformées (*E. coli* et *A. tumefaciens*). Le gène NPT II permet la sélection des cellules végétales transformées. Ce vecteur contient le gène de la β -galactosidase permettant la sélection des bactéries ayant un insert selon le principe de l' α -complémentation.

pQE60

Ce vecteur pQE60 (Qiagen) a une taille de 3,4 kb. Il possède le promoteur T5 reconnu par la polymérase d'*E. coli*, et qui se trouve sous le contrôle de deux promoteurs *lacO* réprimés par la protéine lacI^q. Le site de fixation des ribosomes (RBSII) se trouve en amont de la cassette de clonage. En aval de cette dernière se trouve une séquence codant pour une queue poly-histidine, suivie de deux terminateurs transcriptionnels. Il contient également le gène codant pour la β -lactamase (*bla*) qui confère aux bactéries transformées la résistance à l'ampicilline. L'expression des protéines recombinantes est rapidement induite par l'IPTG qui en se liant avec le répresseur lacI^q permet l'initiation de la transcription. Ces transcrits sont ensuite traduits. Les protéines recombinantes ainsi produites possèdent une queue poly-histidine qui permettra par la suite leur purification.

4. Constructions

Quatre plasmides recombinants construits au laboratoire ont servi à mon travail :

- le premier dérive du vecteur pBluescript dans lequel est inséré le gène chimérique correspondant à la fusion de la séquence d'adressage de la glutamyl-ARNt synthétase (AGI n° At5g64050) avec la GFP (« Green Fluorescent Protein »). La construction réalisée permet l'obtention par transcription/traduction *in vitro*, de la protéine correspondante.
- le deuxième dérive du vecteur pUC18 dans lequel est inséré le gène codant pour l'ARNt^{Ala}(UGC) cytosolique d'*Arabidopsis thaliana*. La construction réalisée permet l'obtention, par transcription *in vitro*, de molécules d'ARNt de taille mature.

-les deux derniers dérivent du vecteur pQE60 et contiennent les ADNc codant pour les VDAC34 ou VDAC36 mitochondriales de pomme de terre (n° d'accèsion X80386 et X80387 respectivement).

5. Anticorps polyclonaux

Anti-NAD9

Ces anticorps sont dirigés contre la sous-unité 9 de la NADH deshydrogénase mitochondriale de plante (Lamattina et al., 1993). Cette protéine appartient au complexe I de la chaîne respiratoire et se situe au niveau de la membrane interne mitochondriale. Ces anticorps ont été fournis par Lorenzo Lamattina (IBMP, Strasbourg).

Anti-POM 34 /36

Ces anticorps sont dirigés contre les deux VDAC de mitochondrie de pomme de terre (Heins et al., 1994). Ils ont été fournis par Udo Klaus Schmitz et Hans-Peter Braun (Allemagne).

Anti-Cyt c1

Ces anticorps sont dirigés contre le cytochrome *c1*. Cette protéine fait partie du complexe III de la chaîne respiratoire mitochondriale et se situe sur la membrane interne. Ces anticorps ont été fournis par G. Schatz (Suisse).

Anti-ANT

Ces anticorps reconnaissent le transporteur ADP / ATP mitochondrial. Ils ont été produits à partir de la protéine de *Neuspora crassa*, mais ils reconnaissent également l'homologue de plante. Ces anticorps ont été fournis par I. Tarassov (Strasbourg, IPCB).

Anti-TOM20

Ces anticorps sont dirigés contre le récepteur TOM20 du complexe d'importation des protéines de la membrane externe des mitochondries de pomme de terre (Heins and Schmitz, 1996). Ils ont été fournis par Hans-Peter Braun (Allemagne).

Anti-TOM40

Ces anticorps sont dirigés contre la protéine TOM40 du complexe d'importation des protéines de la membrane externe des mitochondries (Perryman et al., 1995). Ils ont été produits à partir de la protéine de *Vicia faba*. Ils ont été fournis par Harmey (Irlande).

Anti-Leu RS

Ces anticorps sont dirigés contre la leucyl-ARNt synthétase cytosolique de haricot (Souciet et al., 1982). Ils ont été fournis par A. Dietrich (Strasbourg, IBMP).

6. Oligonucléotides

Les oligonucléotides (Eurogentec), décrits en annexe, ont une température de fusion estimée par la formule suivante : $T_m(^{\circ}\text{C}) = 2 \times (\text{A}+\text{T}) + 4 \times (\text{C}+\text{G})$

7. Outils informatiques

Comparaison de séquences, alignement de séquences et analyse de restriction ont été réalisés à l'aide du logiciel MacVector (version 7.2.3).

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

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

Base de données d'*A. thaliana*, TAIR : <http://www.arabidopsis.org/>

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

TIGR : <http://www.tigr.org/>

TAARSAT : <http://www.inra.fr/Internet/Produits/TAARSAT>

Séquences d'ARNt et de gènes d'ARNt :

<http://www.uni-bayreuth.de/departments/biochemie/trna/>

<http://lowelab.ucsc.edu/GtRNAdb/>

Données de séquençage de génomes mitochondriaux :

http://megasun.bch.umontreal.ca/ogmp/projects/other/mt_list.html

Données des protéines mitochondriales :

<http://www.mitoz.bcs.uwa.edu.au/>

Données de microarrays d'*A. thaliana* :

<https://www.geneinvestigator.ethz.ch/at/>

Programmes de prédiction de structure :

<http://pbil.ibpc.fr/htm/index.php>

II. METHODES

1. Techniques spécifiques à l'ADN

1.1 Amplification 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 nucléotidiques spécifiques des extrémités du fragment à amplifier. Le milieu réactionnel de 50 μ L contient :

- 1 à 100 ng d'ADN matrice
- 50 pmoles de chaque oligonucléotide amorce
- 200 μ M de chaque dNTP
- 2,5 mM de $MgCl_2$
- 5 μ L de **Tampon PCR 10x** (Invitrogen)
- 2,5 U de *Taq* ADN polymérase

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

La réaction est menée, durant 25 à 30 cycles, dans un appareil automatisé (Gene Cycle, Biorad) comme suit :

- Une étape de dénaturation de l'ADN : 30 sec à 92°C (3 min lors du premier cycle)
- Une étape d'hybridation des amorces : 30 sec à une température de $T_m - 10^\circ C$ à $T_m - 5^\circ C$ (T_m : température de fusion de l'amorce par rapport à la séquence de la matrice)
- Une étape de synthèse de l'ADN : 30 s à 1 min (selon la taille du fragment à amplifier) à 72°C.

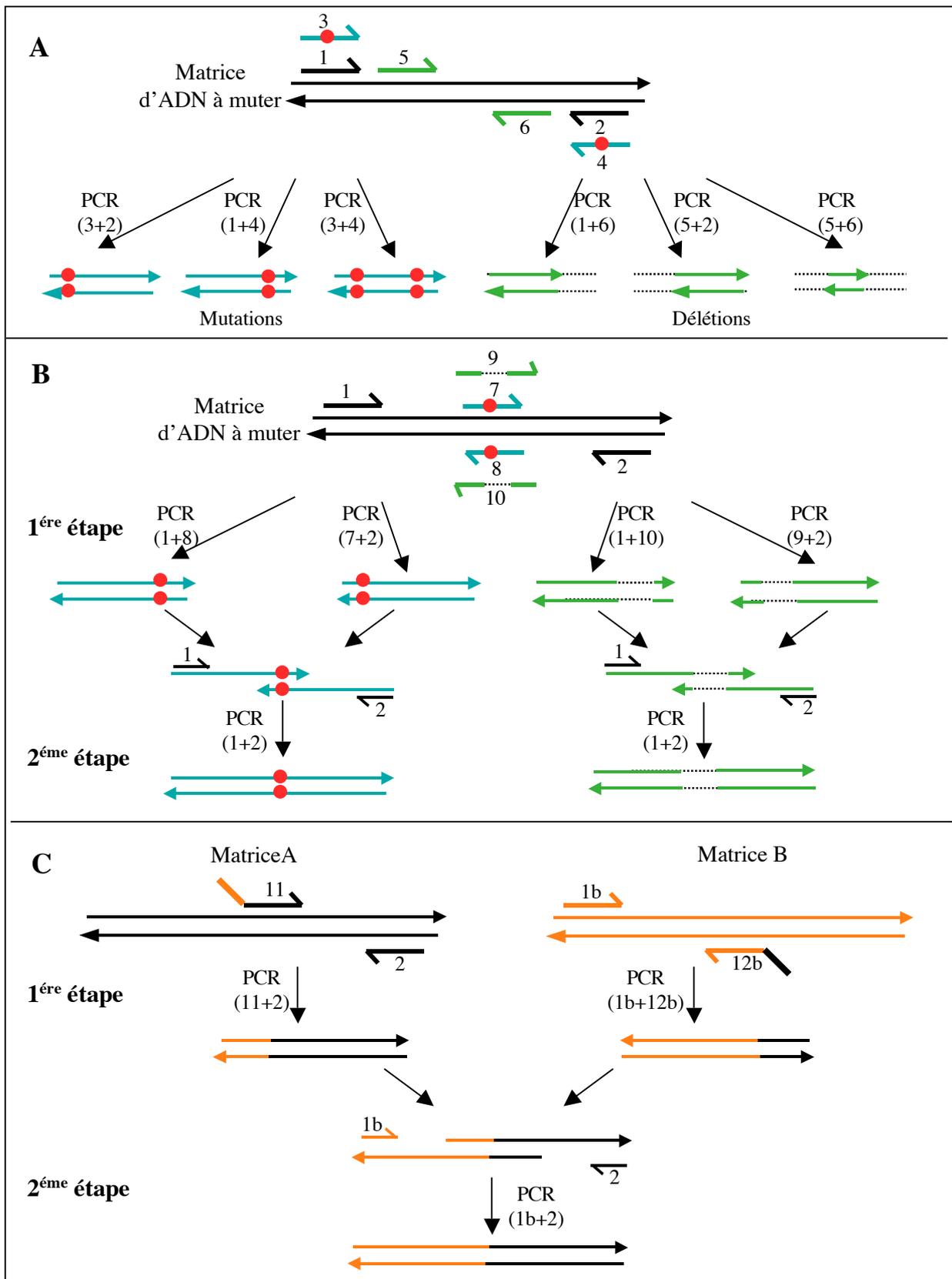


Figure 15 : Mutagenèse par PCR
A: Mutations ou délétions aux extrémités des gènes
B: Mutation ou délétions à l'intérieur des gènes
C: Construction de gènes chimères
 ● : mutation 1...12: amorces
 : délétion

1.2 Mutagenèse par PCR

Plusieurs techniques ont été utilisées en fonction des mutations ou des séquences introduites dans le gène d'intérêt.

1.2.1 Mutations ou délétions aux extrémités des gènes (Figure 15A)

Ce type de mutation se fait en une seule étape de PCR avec des amorces portant la mutation (amorces 3 et 4) ou se situant à l'intérieur de la séquence codante pour les délétions (amorces 5 et 6).

1.2.2 Mutations ou délétions à l'intérieur des gènes (Figure 15B)

Ces mutations sont faites par la technique d'extension des fragments chevauchant par PCR (« Overlap Extension PCR ») à l'aide de 4 amorces. Les amorces 7 (ou 9) et 8 (ou 10) sont complémentaires et comportent les positions à muter (ou à déléter). Cette méthode nécessite deux étapes. Dans un premier temps, sont réalisées en parallèle deux PCR avec les oligonucléotides 1 et 8 (ou 10) d'une part, et 2 et 7 (ou 9) d'autre part. Les produits PCR sont purifiés et un dixième de chacun d'eux est utilisé pour la seconde étape avec les amorces 1 et 2.

1.2.3 Gènes chimériques (Figure 15C)

Ces gènes chimères sont construits sur le même principe, mais dans ce cas, les deux PCR de la première étape sont faites sur deux matrices différentes. Les amorces 11 et 12b contiennent une extension en 5' qui est complémentaire à l'autre matrice. Les deux PCR en parallèle sont réalisées d'une part avec les oligonucléotides 2 et 11 sur la matrice A et d'autre part avec les oligonucléotides 1b et 12b sur la matrice B. Les produits PCR sont purifiés et un dixième de chaque est utilisé pour la seconde étape avec les amorces 2 et 1b.

1.3 Électrophorèse sur gel d'agarose

Les molécules d'ADN peuvent être séparées en fonction de leur taille par migration électrophorétique sur gel agarose. L'ADN est chargé (1/3 de volume de **tampon de**

charge) sur un gel d'agarose (entre 0.8% et 1% (p/v)) dans du **tampon TAE 0,5x**. La migration de l'ADN s'effectue sous une tension de 100 V. Les fragments d'ADN sont ensuite visualisés par fluorescence sous UV grâce au bromure d'éthidium incorporé dans le gel.

Tampon TAE 0,5x : Tris-Acétate 20 mM pH 8,0, EDTA 0,5 mM

Tampon de charge : Glycérol 50% (v/v), SDS 1% (p/v), EDTA 1 mM, xylène cyanol 0.1% (p/v), bleu de bromophénol 0.1% (p/v)

1.4 Purification des fragments d'ADN issus de gels d'agarose

Après fractionnement sur gel d'agarose, le fragment d'ADN d'intérêt est découpé sous UV. L'ADN est ensuite récupéré par simple filtration 5 min à 5000 g sur colonne Ultrafree-DNA (Millipore).

1.5 Techniques de clonage

1.5.1 Clonage de fragments coupés par des enzymes de restriction

a. Digestion par des enzymes de restriction

Les digestions d'ADN par des enzymes de restriction sont réalisées selon les conditions préconisées par les fournisseurs.

Après digestion de l'ADN plasmidique par l'enzyme de restriction, l'ADN est précipité en présence de 2,5 volumes d'éthanol et de 0,04 volumes de NaCl 5M quelques heures à -20°C . Après centrifugation 15 min à 14000 g, le culot est resuspendue dans un volume d'eau adéquat.

b. Ligation

La réaction de ligation est incubée 1h à température ambiante ou une nuit à 14°C . Le milieu réactionnel de 20 μL contient :

- 10 à 20 ng de vecteur
- le fragment d'ADN, dans un rapport molaire insert/vecteur compris entre 2 et 3
- 4 μl de **tampon de ligation 5x** (Invitrogen)
- 1 U de T4 ADN ligase (Invitrogen)

Tampon de ligation 5x : Tris-HCl pH 7,6 250 mM, MgCl₂ 50 mM, ATP 5 mM, DTT 5 mM, PEG 8000 25% (p/v).

c. Transformation et sélection

Après précipitation, la réaction de ligation est resuspendue dans 10 μ L d'H₂O. Un μ L de cette solution est ajouté à 60 μ L de bactéries compétentes (culture en phase exponentielle). Les bactéries sont transformées par électroporation (Electroporateur Bio-Rad 2,5 kV, 25 μ F, 200 W) puis reprises dans 500 μ L de **milieu LB**. Après une incubation de 30 min à 37°C permettant la régénération de la paroi bactérienne et l'expression du/des gène(s) de résistance codé(s) par le vecteur, les bactéries sont étalées sur des boîtes de Pétri contenant du **milieu LB-Agar**, le ou les antibiotique(s) de sélection en concentration adéquate et s'il s'agit du système de criblage bleu/blanc, 30 μ L d'IPTG à 50 mg/mL et 30 μ L de X-Gal à 50 mg/mL. Après une nuit à 37°C, les colonies contenant un plasmide recombinant sont blanches.

Milieu LB : Extrait de levure 5 g/L, bactotryptone 10 g/L, NaCl 10 g/L, pH 7,0.

Milieu LB-Agar : Milieu LB additionné de 1,5 % d'agar (p/v).

1.5.2 Clonage direct d'un produit PCR

Le kit TOPO II-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.

a. Principe

La Taq ADN polymérase utilisée, commercialisée par Invitrogen, possède une activité terminal transférase qui ajoute à l'extrémité 3' des produits PCR un résidu désoxyadénosine (dA). Le vecteur (appelé vecteur T) linéarisé et fourni avec le kit possède un résidu désoxythymidine (dT) 3' sortant. De plus, ce kit exploite l'activité ligase de la topo-isomérase I. La ligation du vecteur avec le produit de PCR en présence de la topo-isomérase I fournie avec le kit est très efficace et se passe en moins de 5 minutes à température ambiante. Le vecteur pCR®II-TOPO est fourni ouvert et ses extrémités libres

sont activées avec la topo-isomérase 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 directement utilisé pour transformer des bactéries compétentes fournies avec le kit.

b. 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[®]II-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 OneShot[®]TOP 10F' *E. coli*, et laissée 30 min sur la glace. Un choc thermique est effectué en plaçant successivement le tube 30 sec à 42°C puis 2 min dans la glace, ce qui permet la transformation des bactéries. Du **milieu LB** (250 μL) est ajouté et le tube est incubé 30 min à 37°C. La suspension bactérienne (100 μL) est étalée sur des boîtes de Pétri contenant du **milieu LB-agar**, 100 $\mu\text{g/ml}$ d'ampicilline, de l'IPTG (30 μL à 50 mg/mL) et du X-gal (30 μL à 50 mg/mL). Après une nuit d'incubation, les bactéries transformées sont identifiées par le principe du criblage blanc/bleu.

1.6 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. Pour cela, un milieu réactionnel de 20 μL proportionnel à un milieu de PCR de base est préparé avec les amorces permettant d'identifier l'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 (cf. partie II paragraphe *1.1.*). La première étape de dénaturation de 3 min à 94°C suffit à lyser les bactéries et à libérer l'ADN.

1.7 Préparation de l'ADN plasmidique

1.7.1 Minipréparation d'ADN plasmidique

Le kit de minipréparation Nucleospin[®] Plasmid (Macherey-Nagel) a été utilisé. Il utilise le principe de la lyse alcaline (Birnboim and Doly, 1979) suivie d'une purification sur colonne. Les termes mini et midi désignent le volume de départ de la culture

bactérienne. Pour une minipréparation, il s'agit de 2 ml de milieu de culture. Le protocole expérimental fourni avec le kit a été suivi à la lettre.

1.7.2 Midipréparation d'ADN plasmidique

Le kit Jetstar (Genomed) a été utilisé pour la préparation de l'ADN plasmidique à partir de cultures bactériennes de 50 mL. Toutes les étapes de purification sont réalisées dans les conditions préconisées par le fabricant.

1.8 Séquençage de l'ADN

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

1.9 Marquage d'oligonucléotides

Les oligonucléotides synthétisés chimiquement sont marqués radioactivement à leur extrémité 5' par incubation 30 min à 37°C dans le milieu réactionnel suivant :

- 200 nM d'oligonucléotide
- 2,5 μL [γ - ^{32}P]ATP 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ (activité spécifique 3000 Ci/mmol)
- 1 μL **Tampon PNK 10x** (Fermentas)
- 10 U de T4 polynucléotide kinase (Fermentas)
- H₂O q.s.p. 10 μL

Tampon PNK 10x : Tris-HCl pH 7,6 500 mM, MgCl₂ 100 mM, DTT 50 mM, spermidine 1 mM, EDTA 1 mM

Le volume est ajusté à 50 μL d'eau et la radioactivité non incorporée est éliminée par chromatographie d'exclusion sur une colonne de Séphadex G50 (seringue de 1 mL). La colonne est séchée par centrifugation 30 sec à 200 g. La solution est déposée et éluée dans les mêmes conditions.

2. Techniques spécifiques à l'ARN

2.1 Extraction d'ARN

2.1.1 ARN de cellules ou de cals de tabac

Pour extraire les ARN de cellules ou de cals, 200 μL de **tampon d'extraction** sont ajoutés à environ 80 mg de matériel à broyer et un demi-volume de billes de verre (diamètre de 0,6 mm Sigma) prétraitées à l'acide chlorhydrique. L'ensemble est agité fortement 2 min sur un vibreur (Biospec) puis supplémenté en phénol saturé en eau (un volume). Après 10 min de vortex, le tout est centrifugé 10 min à 15000 g et le surnageant est mis à précipiter en présence de 2,5 volumes d'éthanol et de 0,1 volume d'acétate de sodium pH 4,5 1M.

2.1.2 ARN mitochondriaux

Les mitochondries culotées (100 μg équivalent protéines) sont reprises avec 100 μL de **tampon d'extraction** et un volume de phénol saturé en eau est rapidement ajouté. Après 15 min d'agitation forte sur vortex puis centrifugation 10 min à 12 000 g, la phase aqueuse est prélevée (100 μL) et mise à précipiter à -20°C pendant au moins une heure avec 2,5 volumes d'éthanol en présence de 0,1 volume d'acétate de sodium pH 4,8 1M. Après centrifugation 20 min à 12000 g, le culot est séché à l'air libre et repris dans 6 μL d'eau.

Tampon d'extraction : Tris-HCl pH 7,5 10 mM, MgCl_2 10 mM, SDS 1% (p/v)

2.2 Electrophorèse dénaturante sur gel de polyacrylamide

La migration sur gel de polyacrylamide est utilisée pour la séparation des molécules d'ARN. Le gel (8 x 12 x 0,03 cm) est préparé à partir d'une solution d'acrylamide/N,N' méthylène bisacrylamide (19/1) de 15% et 7 M urée (dénaturant) dans du **tampon TBE 1x**. La polymérisation du gel est catalysée par l'addition d'APS (0,1% (p/v)) et de TEMED (0.035% (v/v)). Avant dépôt, les acides nucléiques sont additionnés d'un volume de

tampon de charge. La migration s'effectue sous 25 mA dans le **tampon TBE 1x**. Le bleu de bromophénol et le xylène cyanol constituent des témoins de migration (l'équivalence en nucléotides (nt) dépend de la concentration du gel : 15 et 60 nt sur un gel 15%). Les acides nucléiques sont ensuite visualisés par autoradiographie s'ils sont marqués ou sous UV après coloration au bromure d'éthidium.

Tampon TBE 1x : Tris 90 mM, EDTA pH 8,3 2,5 mM, acide borique 90 mM

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

2.3 « Northern blot »

2.3.1 Transfert des ARN

Après séparation sur un gel dénaturant de polyacrylamide, les ARN sont transférés sur une membrane de nylon de type Hybond N+ (Amersham). Le gel est placé sur la membrane et l'ensemble est disposé en "sandwich" entre deux feuilles de papier Whatmann 3MM et deux scotch brites. L'électrotransfert est effectué dans du **tampon TAE 0,25x** pendant 45 min sous une intensité de 500 mA. La membrane est brièvement séchée et les ARN sont fixés par irradiation en lumière UV (366 nm) pendant 3 à 5 min.

Tampon TAE 0,25x : Tris-Acétate 10 mM pH 8,0, EDTA 0,25 mM

2.3.2 Hybridation de la sonde

L'oligonucléotide marqué radioactivement (environ 10^6 cpm) est ajouté à la solution d'hybridation (**SSC 6x**, SDS 0,5% (p/v)) dans un rouleau d'hybridation contenant la membrane disposée contre la paroi. L'hybridation s'effectue dans une étuve à une température de 5 à 10°C inférieure à la température de fusion (T_m) de la sonde pendant une nuit. Le filtre est ensuite lavé deux fois 10 min dans du **tampon SSC 2x** puis une fois 30 min dans du **tampon SSC 2x**, SDS 0,1% (p/v) à la T_m . La membrane est brièvement séchée puis exposée contre une plaque de PhosphorImager (Fuji) ou mise en autoradiographie.

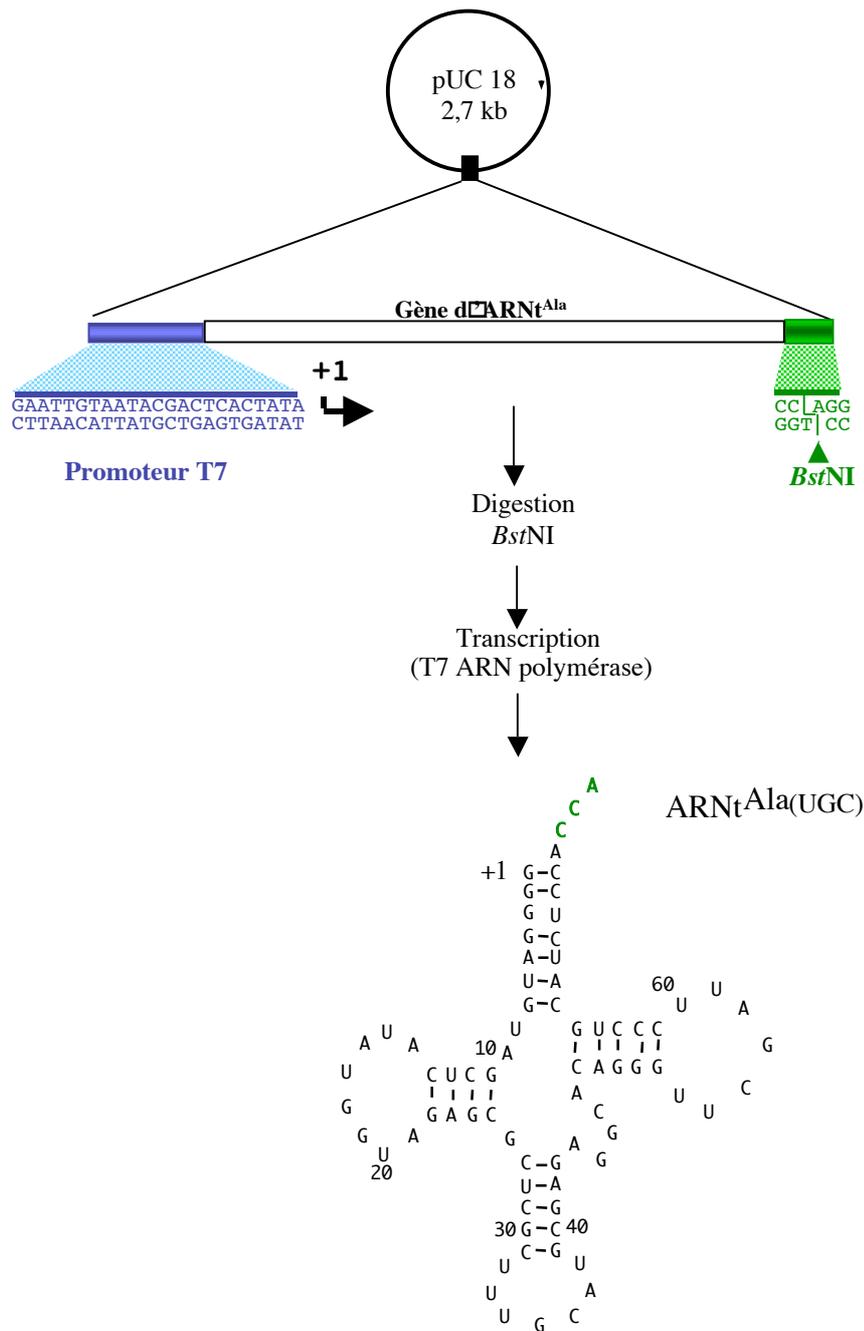


Figure 16 : Transcription *in vitro* de l'ARNt^{Ala} par la T7 polymérase.

Le promoteur T7 en phase avec la séquence permet la transcription du gène d'ARNt à partir du premier nucléotide (+1). Le site *Bst*NI permet d'obtenir l'extrémité CCA après transcription de l'ADN matricé digéré par cette enzyme.

Tampon SSC 2x : Citrate-trisodique 30 mM pH 7,0 ; NaCl 0,3 M.

2.4 *Transcription in vitro*

2.4.1 *Transcription non radioactive (Figure 16)*

Après linéarisation du plasmide contenant le gène de l'ARNt^{Ala} par *Bst*NI (ce site permet la production de transcrits correspondant à des ARNt de taille mature qui possèdent une extrémité CCA), la transcription est réalisée à l'aide de la T7 ARN polymérase pendant 2 à 3 heures à 37°C dans un volume réactionnel de 100 μ L contenant :

- 5 à 10 μ g d'ADN plasmidique digéré par *Bst*NI
- 20 μ L de **tampon de transcription 5x** (Kit Ribomax de Promega)
- 30 μ L d'un mélange de 25 mM de chaque NTP (ATP, CTP, GTP, UTP)
- 10 μ L du **mix enzymatique** (Kit Ribomax de Promega)

Après la réaction de transcription, la radioactivité non incorporée est éliminée par filtration sur une colonne de Séphadex G50.

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

Mix enzymatique : T7 RNA polymérase, pyrophosphatase et inhibiteur de RNase

2.4.2 *Transcription radioactive*

Pour l'obtention d'un ARNt radioactif, la transcription du gène de l'ARNt se fait en présence de l' $[\alpha^{32}\text{P}]\text{UTP}$. La réaction de transcription est réalisée comme précédemment dans un volume réactionnel de 20 μ L contenant :

- 4 μ L d' $[\alpha^{32}\text{P}]\text{UTP}$ à 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{L}$ (activité spécifique : 3000 Ci/mmol)
- 4 μ g d'ADN plasmidique digéré par *Bst*NI
- 4 μ L de **tampon de transcription 5x** (Kit Ribomax de Promega)
- 2 μ L d'un mélange de 25 mM de ATP, CTP, GTP
- 0,5 μ L de 0,5 mM d'UTP
- 1 μ L **Mix enzymatique** (Kit Ribomax de Promega)

Après la réaction de transcription, la radioactivité non incorporée est éliminée par filtration sur une colonne de Séphadex G50. Les ARNt néosynthétisés peuvent ensuite être purifiés sur un gel de polyacrylamide dénaturant.

2.5 Détermination de l'activité aminoacceptrice des ARNt

2.5.1 Préparation des extraits enzymatiques

a. Extrait enzymatique total d'hypocotyles de haricot

L'extrait enzymatique contenant les aminoacyl-ARNt synthétases est obtenu (selon le protocole décrit par (Marechal-Drouard et al., 1995) à partir d'hypocotyles de haricot mis à germer dans de la vermiculite humide pendant une semaine à 25°C et à l'obscurité. Dix grammes d'hypocotyles sont broyés dans un mortier avec de l'azote liquide en présence de 2 mL d'un **tampon enzyme 5x**, contenant 20 μg de leupeptine, 20 μg d' α 2-macroglobuline, 5 mM de β -mercaptoéthanol, 0,5 mM de phénylméthylsulfonyl fluorure et 80 μL de cocktail anti-protéases Complete™ (Boehringer-Mannheim). Le broyat est centrifugé 20 min à 48000 g et le surnageant (environ 10 ml) est amené à 0,15 M NaCl et 50 mM Tris-HCl pH 7,5. Ce liquide est déposé sur une colonne de DEAE-cellulose (5 ml) pré-équilibrée dans **du tampon enzyme 1x** contenant 0,15 M NaCl et 5 mM β -mercaptoéthanol. Cette étape permet à la fois l'élimination des ribosomes et des ARNt. Les premières fractions (environ 4mL) correspondant à l'exclu ne sont pas conservées tandis que les fractions suivantes (environ 4 mL) contenant les protéines sont déposées sur 4 colonnes de Sephadex G75 (1 mL par colonne). Les colonnes sont préalablement équilibrées avec du **tampon enzyme 1x** contenant 5 mM β -mercaptoéthanol et séchées juste avant emploi par centrifugation de 10 min à 200 g. Après centrifugation dans les mêmes conditions, les 4 éluats sont supplémentés en leupeptine (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), α 2-macroglobuline 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, β -mercaptoéthanol 5 mM, phénylméthylsulfonyl fluorure 0,5 mM et 160 μL de cocktail anti-protéases Complete™ afin de protéger l'extrait protéique de la dégradation. 10% de propanediol sont ajoutés pour la congélation de l'extrait à -80°C sous forme d'aliquotes de 500 μL .

Tampon enzyme 5x : Tris-HCl pH 7,5 250 mM, MgCl_2 50 mM, glycérol 50% (v/v), EDTA 5 mM

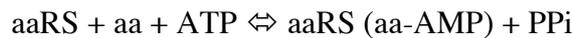
b. Extrait enzymatique « mitochondrial » d'hypocotyles de haricot

L'extrait enzymatique est obtenu à partir de mitochondries de haricot préalablement préparées. On ajoute un volume de **tampon enzyme 2x** pour un volume de mitochondries. L'extrait est ensuite congelé et décongelé dans de l'azote liquide, puis soniqué 30 s pour casser les membranes mitochondriales qui se trouvent dans le culot après centrifugation (30 min à 20000 g). Les étapes suivantes se font comme pour la préparation de l'extrait enzymatique de cellules entières.

2.5.2 Cinétiques d'aminocyclation in vitro

L'aminocyclation est une réaction enzymatique faisant intervenir un ARNt, l'aminonoacyl-ARNt synthétase (aaRS) correspondante ainsi qu'un acide aminé (aa) spécifique. Ce mécanisme comporte deux étapes distinctes :

-Etape d'activation :



-Transfert de l'acide aminé sur l'ARNt :



L'activité aminoacceptrice de l'ARNt est déterminée à partir d'une incubation à 37°C dans un volume réactionnel de 75 μL comprenant :

-12,75 μL de **milieu M17**

-1,125 μL MgCl_2 1 M

-3 μg d'ARNt transcrit

-3.5 μCi de glycine triciée ($[^3\text{H}]\text{Gly}$) (activité spécifique : 820 Ci/mol)

-5 μg d'extrait enzymatique

Pendant l'incubation, des aliquotes de 22 μL sont prélevées aux temps 2, 5 et 20 min et déposées sur disques de papier Whatmann 3MM (1 cm^2). Les aminoacyl-ARNt sont précipités sur le papier par deux bains de 15 min dans le TCA à 5% (v/v) à 4°C. Le TCA est éliminé par deux lavages de 15 min dans l'éthanol à 4°C. Les disques sont séchés et la radioactivité est mesurée en présence de 3 mL de liquide de scintillation (Ready Solvant

NA, Beckman) dans un compteur à scintillation. Cette radioactivité correspond aux ARNt glycylys.

Milieu M17: Tris-HCl pH 7,5 1 M, ATP 100 mM, Glutathion 100mM, BSA 10 mg/mL

3. Quantification de l'ADN et de l'ARN

Pour doser une solution d'acides nucléiques, tout en s'assurant de l'absence de contamination protéique, on utilise une méthode spectrophotométrique. On mesure l'absorbance de la solution à 260 nm et à 280 nm (A_{260} et A_{280}) pour un trajet optique de 1 cm. Le rapport A_{260}/A_{280} nous renseigne sur la pureté de la solution (un bon rapport est compris entre 1.7 et 2.0). Pour l'évaluation de la concentration en acides nucléiques, les correspondances suivantes ont été utilisées :

- 1 A_{260} équivaut à 50 $\mu\text{g/mL}$ d'ADN double brin
- 1 A_{260} équivaut à 33 $\mu\text{g/mL}$ d'un oligonucléotide (20 nt)
- 1 A_{260} équivaut à 40 $\mu\text{g/mL}$ d'ARN ou d'ADN simple brin.

La quantité d'un fragment d'ADN ou d'ARN peut également être quantifiée sur gel grâce au système ChemiDoc EQ (BioRad). Ce système permet de capturer l'image des gels en temps réel. L'image ainsi obtenue est traitée à l'aide du logiciel Quantity-One® qui à l'aide d'une gamme étalon préalablement établie, permet une quantification précise des échantillons.

4. Techniques relatives aux protéines

4.1 Quantification des protéines

La quantification des protéines est faite par 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 sa fixation sur les acides aminés (595 nm) (Bradford, 1976). Un mL de réactif de Bradford (BioRad) et 100 μL d'extrait protéique à quantifier sont mélangés et l'absorbance est mesurée à 595 nm. Cette mesure de DO permet de déterminer la quantité de protéines présentes en se référant à une gamme étalon de BSA établie avec des quantités connues. Il est à noter que les échantillons contenant des détergents tels que

le SDS ou le Triton X-100 en quantité importante ne peuvent être quantifiés par cette méthode car ces derniers interfèrent avec le réactif de Bradford. La quantité de mitochondries utilisées lors des différentes expériences a été évaluée par cette technique et il s'agira en fait de mg d'équivalents en protéines mitochondriales lorsque dans le texte nous parlerons de mg de mitochondries.

Réactif de Bradford : Bleu de Coomassie G-250 0.01% (p/v), éthanol 4.7% (v/v), acide phosphorique 8.5% (v/v)

4.2 Techniques de concentration de protéines

4.2.1 Précipitation à l'acétone

Cette précipitation de protéines est réalisée avec une solution d'acétone (80 % final) pendant une heure sur la glace. Après centrifugation 15 min à 15000 g à 4°C, le culot est séché à l'air. Les protéines sont ensuite reprises dans du tampon **PBS 1x**.

PBS 1x : Na₂HPO₄ 80 mM, NaH₂PO₄ pH 7,5 20 mM, NaCl 100mM.

4.2.2 Cellule de concentration (« centrifugal filter devices » Amicon corporation)

Le principe de ces cellules est une ultrafiltration sélective. Ces concentrateurs ont une taille limite de maille (différentes tailles selon le modèle de cellule) et les molécules de taille supérieure à cette taille limite sont retenues par la membrane hydrophile, tandis que l'eau et les petites molécules (sels par exemple) traversent cette membrane. Ces cellules peuvent être utilisées pour concentrer une solution protéique ou pour changer le tampon d'une solution. Dans la pratique, l'échantillon est simplement chargé dans la cellule et centrifugé à 2000 g à 4°C jusqu'à la concentration désirée.

4.3 Electrophorèse sur gel de polyacrylamide

4.3.1 Electrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)

La séparation des protéines est réalisée par migration électrophorétique en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (Laemmli, 1970). Les mailles de la matrice sont définies par le rapport polyacrylamide/N,N' méthylène bisacrylamide (37.5/1 dans le cas de gel de protéines). Le gel (8 cm x 12 cm x 0,1 cm) comporte deux parties : un **gel de concentration** (hauteur 3 cm) et un **gel de séparation**.

La polymérisation de l'acrylamide est catalysée par l'ajout d'APS 0,1% (p/v) et de TEMED 0.05% (v/v).

Gel de concentration : Acrylamide 5%, Tris-HCl pH 6,8 100 mM, SDS 0,1% (p/v)

Gel de séparation : Acrylamide 12 à 15% selon la taille des protéines à fractionner, Tris-HCl pH 8,8 100 mM, SDS 0.1% (p/v)

Les protéines additionnées 0,2 volumes de **tampon de charge** sont chargées sur le gel et la migration s'effectue dans du **tampon de migration** pendant environ 1 h sous ampérage constant de 25 mA. La migration est contrôlée par la visualisation du front de migration, qui doit avoir atteint le bas du gel.

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

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

4.3.2 Electrophorèse en conditions natives : Bleu Natif (BN-PAGE)

Cette technique d'électrophorèse bidimensionnelle permet de séparer des complexes selon leur taille en condition natives lors de la première dimension puis les sous-unités de ces complexes sont séparées lors de la seconde dimension par un SDS-PAGE classique. Le BN-PAGE est réalisé en suivant un protocole décrit par (Jansch et al., 1998) pour étudier les complexes protéiques mitochondriaux. La mobilité électrophorétique est conférée aux protéines par le Serva G bleu qui est chargé négativement.

a. Solubilisation des complexes membranaires mitochondriaux

Pour leur analyse, les complexes protéiques doivent être débarrassés de leurs lipides pour pouvoir être séparés par électrophorèse. Les mitochondries ou les membranes externes mitochondriales sont solubilisées en utilisant un détergent doux, le n-dodécylmaltoside (2 g de protéines par g de protéines mitochondriales) dans du **tampon ACA**, 30 min à 4°C. Les complexes protéiques solubilisés sont séparés par centrifugation 30 min à 100000 g à 4°C (rotor TLA-100, Beckman).

Tampon ACA : Acide aminocaproïque 750 mM, Bis-Tris 50 mM, EDTA 0.5 mM

b. Première dimension

L'électrophorèse en première dimension en condition native se fait dans un gel avec un gradient d'acrylamide de 7 à 16%. Le **gel de concentration** est fait de 4% d'acrylamide. Les complexes solubilisés sont mélangés avec du **bleu de charge** (15 µL de bleu de charge pour 350 µL de complexes). La migration se déroule pendant 45 min à 60 V puis pendant 7 heures à 250 V en utilisant le **tampon cathode** et le **tampon anode**.

Gel de séparation : Acrylamide 7-16%, Bis-Tris pH 7,0 50 mM, acide aminocaproïque 0,5 mM, APS 0,06% (p/v), TEMED 0,06% (v/v)

Bleu de charge : Serva G bleu 5% dans la solution ACA

Tampon cathode : Bis-Tris pH 7,0 15 mM, Tricine 50 mM, Serva G bleu 0,02%

Tampon anode : Bis-Tris pH 7,0 50 mM

c. Deuxième dimension

Une piste de gel obtenue lors de la migration en conditions natives est découpée puis incubée 30 min dans une **solution de dénaturation**. Le fragment de gel est inclus dans le gel de concentration d'un gel SDS-PAGE classique et l'électrophorèse se déroule comme décrit ci-dessus.

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

4.4 Détection des protéines après fractionnement électrophorétique

Après migration, le gel est fixé et coloré au bleu de Coomassie pendant une heure dans une **solution de coloration** sous agitation lente constante, puis décoloré par plusieurs bains dans une **solution de décoloration**.

Solution de coloration : acide acétique 10% (v/v); éthanol 25% (v/v); bleu de Coomassie R250 0.125% (p/v)

Solution de décoloration : acide acétique 10% (v/v), éthanol 20% (v/v)

4.5 Immunorévélation de type « western blot »

Cette technique consiste à révéler une protéine particulière à l'aide d'anticorps spécifiquement dirigés contre cette protéine. Elle nécessite la fixation des protéines sur une membrane.

4.5.1 Transfert des protéines sur membrane

Après séparation sur un gel de polyacrylamide, les protéines sont transférées sur une membrane Immobilon-P 0.45 μm (Millipore) que l'on active par le méthanol 100%. L'ensemble est disposé en « sandwich » entre 4 feuilles de papier Whatman imbibées avec du **tampon de transfert** et placé dans une cuve à électrotransfert semi-sec (Amersham). Gel et membrane sont placés de sorte que les protéines se fixent sur la membrane en migrant de la cathode vers l'anode. Ce transfert est effectué à 0,8 mA par cm^2 de membrane pendant 45 min.

Tampon de transfert : Tris 48 mM, glycine 39 mM

4.5.2 Coloration des protéines après électrotransfert sur membrane

Les protéines transférées sont visualisées par coloration avec une **solution de coloration** à base de bleu de Coomassie puis décolorées au méthanol 50%. Le colorant est éliminé totalement par lavage prolongé au méthanol 100%.

Solution de coloration : bleu de Coomassie R250 0,25% (p/v), méthanol 50% (v/v), acide acétique 7% (v/v)

4.5.3 Fixation des anticorps

La membrane est équilibrée et les sites aspécifiques de fixation sont saturés par incubation, pendant 1 heure sous agitation constante, dans du **tampon bloquant**. L'anticorps primaire spécifique de lapin est ajouté à la solution, puis l'ensemble est incubé toujours sous agitation constante, une nuit à 4°C ou 1 à 2 h à température ambiante. La membrane est ensuite lavée 3 fois 10 min dans du **tampon bloquant**, puis les anticorps secondaires (anticorps de chèvre dirigés contre les immunoglobulines de lapin et couplés à la peroxydase (Kirkegaard & Perry Laboratories)) sont ajoutés à du **tampon bloquant**. L'ensemble est agité une heure à température ambiante, puis lavé une fois 5 min dans le **tampon bloquant** et 3 fois 10 min avec le **tampon de lavage** avant révélation.

Tampon bloquant : Tris-HCl pH 7,4 20 mM, NaCl 150 mM, Triton X-100 0.1% (v/v), lait écrémé en poudre 5% (p/v)

Tampon de lavage : Tris-HCl pH 7,4 20 mM, NaCl 150 mM, Triton X-100 0.1% (v/v)

4.5.4 Révélation de la fixation des anticorps

Les anticorps secondaires utilisés sont couplés à la peroxydase. On utilise une révélation par kit ECL (pour « Enhanced Chemical Luminescence ») qui consiste en une réaction de chimioluminescence catalysée par la peroxydase et produisant une émission de photons au lieu de fixation des anticorps secondaires. Dans la pratique, les conditions préconisées par le fournisseur (Amersham) sont suivies et l'émission lumineuse est révélée par autoradiographie.

4.6 Techniques permettant d'identifier l'interaction protéine/ARN

4.6.1 Technique de « northwestern »

Le protocole utilisé est celui décrit chez *Leishmania donovani* par [Ghosh, 1994 #119]. Les protéines fixées sur membrane Immobilon-P 0.45 µm (Millipore) sont

renaturées une nuit à 4°C dans le **tampon de renaturation**. Ce tampon contient du NP40, un détergent non ionique, qui permet une meilleure élimination du SDS. La membrane est lavée quatre fois 15 min dans ce même tampon à 4°C sous agitation douce avant d'être saturée pendant 5 min à température ambiante dans le **tampon de blocage**. Le filtre est alors placé en présence de 200 à 500 fmoles du transcrit marqué à l' $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ UTP dans 5 ml de **tampon d'hybridation** et incubé une nuit à 4°C. Après quatre lavages de 5 min à 4°C avec le **tampon de lavage**, la membrane est brièvement séchée puis exposée contre une plaque de PhosphorImager ou mise en autoradiographie.

Tampon de renaturation : Tris-HCl pH 7,5 0,1 M, NP 40 0,1% (v/v)

Tampon de blocage : Tris-HCl pH 7,5 10 mM, Acétate de magnésium 5 mM, DTT 2 mM, BSA 5% (p/v), Triton X-100 0,01% (v/v)

Tampon d'hybridation : Tris-HCl pH 7,5 10 mM, Acétate de magnésium 5 mM, DTT 2 mM, Triton X-100 0,01% (v/v)

Tampon de lavage : Tris-HCl pH 7,5 10 mM, Acétate de magnésium 5 mM, DTT 2 mM

4.6.2 *Technique du gel retard*

Le protocole utilisé est celui décrit chez Promega « gel shift assay system » (<http://www.promega.com/tbs/tb110/tb110.html>). Cette technique est basée sur le changement de la mobilité électrophorétique de l'ARN après avoir fixé une protéine ou une autre molécule. La molécule d'ARN radiomarquée est incubée en présence de la protéine d'intérêt. Si la protéine fixe l'ARN, la migration de celui-ci dans le gel non dénaturant sera retardée.

a. Préparation de l'échantillon

La réaction est faite dans un volume réactionnel de 9 μL comprenant :

-0 à 21 pmol en fonction de la protéine

-2 μL de **tampon gel retard 5x**

La milieu est incubée 10 min à température ambiante. Un μl d'ARNt radiomarqué (environ 10 fmoles correspondant à 20000 cpm) est ensuite ajouté puis l'ensemble est incubé sous une légère agitation à 25°C. Avant migration, le milieu est additionné d'un μL de **tampon de charge**.

Tampon gel retard 5x : Glycerol 20 %, MgCl₂ 5mM, EDTA 2,5 mM, DTT 2,5 mM, NaCl 250 mM, Tris-HCl pH 7,5 50 mM

Tampon de charge : Tris-HCl pH 7,5 250 mM, glycerol 40 % (v/v)

b. Préparation du gel

Le gel est préparé à partir d'une solution d'acrylamide/N,N' méthylène bisacrylamide (19/1) de 4% dans du **tampon TBE 0,5x** (cf. partie II paragraphe 2.2). La polymérisation du gel est catalysée par l'addition d'APS 0.04% (p/v) et de TEMED 0.04% (v/v). Avant de charger les échantillons, le gel est mis sous une tension de 350 V pendant 10 min. La migration s'effectue ensuite pendant 20 min à 350 V dans le **tampon TBE 0,5x**. Le gel est séché puis exposé contre une plaque de PhosphorImager (Fuji) ou mis en autoradiographie.

4.7 Surexpression de protéines dans E.coli

L'ADNc codant pour une protéine d'intérêt est introduit dans le vecteur d'expression pQE60. Le vecteur recombinant ainsi obtenu est ensuite utilisé pour transformer une souche d'expression (M15 ou TG2). Le clone obtenu est mis en préculture dans 3 mL (pour une petite préparation) ou 50 mL (pour une grande préparation) de milieu LB additionné d'antibiotiques (ampicilline (100 µg/mL) et kanamycine (25 µg/mL) pour les bactéries M15 et seulement ampicilline (100 µg/mL) pour les bactéries TG2. La préculture est mise sous agitation une nuit à 37°C.

Le lendemain, 300 µL (pour une petite préparation) et 50 mL (pour une grande préparation) de la préculture sont utilisés pour ensemercer 3 mL et 500 mL respectivement de milieu LB contenant les antibiotiques adéquats. L'expression des protéines est induite par l'ajout d'IPTG (1 mM final) dans le milieu. Après 3 heures de culture à 37°C la culture est centrifugée 15 min à 5000 g et le culot est conservé à -80°C.

4.8 Techniques de purification de protéines

Les purifications de protéines à partir d'une petite préparation ou d'une grande préparation sont faites avec deux méthodes différentes qui utilisent le même principe. En effet, les protéines surexprimées avec le vecteur d'expression de type pQE possèdent une queue polyhistidine. Cette queue poly-histidine permet, grâce à son affinité pour le nickel, de fixer la protéine sur une matrice enrobée de nickel. Les protéines ainsi purifiées sont

ensuite récupérées en rajoutant de fortes concentrations d'un analogue de l'histidine, l'imidazole. La purification peut se faire soit en conditions natives soit en conditions dénaturantes en présence de guanidine 4 M ou d'urée 8 M.

4.8.1 Petites préparations (3mL)

Pour les petites préparations, nous avons utilisé le kit MagneHis™ de Promega. Dans ce kit, la matrice correspond à des billes magnétiques enrobées de nickel qui pourront être retenues par un aimant. Ce type de purification a toujours été fait en conditions dénaturantes.

Après l'obtention du culot (voir ci-dessus), les bactéries sont lysées par 3 cycles de congélation dans l'azote liquide et décongélation à température ambiante. La remise en suspension du culot se fait par l'addition de 200 μ L de **solution de lavage**. Après 10 min d'agitation douce, 60 μ L d'une solution de billes enrobées de nickel sont ajoutés. Le mélange est ensuite placé contre une barre magnétique adaptée aux microtubes (Promega). Celle-ci va retenir contre la paroi, les billes où sont accrochées les protéines souhaitées. Le surnageant est enlevé et les billes sont lavées 3 fois avec 300 μ L de tampon de lavage. L'élution des protéines se fait par l'ajout de 50 μ L de **solution d'élution**. Après 2 min d'incubation à température ambiante, le mélange est de nouveau placé contre la barre magnétique. Le surnageant contenant les protéines décrochées des billes est récupéré.

Solution de lavage : HEPES 100 mM, imidazole 10 mM, urée 8 M ou guanidine 4 M

Solution d'élution : HEPES 100 mM, imidazole 500 mM, urée 8 M ou guanidine 4 M

4.8.2 Grandes préparations (500 mL)

Pour les grandes préparations, la purification des protéines est faite avec la matrice Ni-NTA-agarose de Qiagen selon les indications du fournisseur en conditions natives ou en condition dénaturantes. En conditions dénaturantes, tous les tampons ont été additionnés d'urée 8 M final.

Le culot bactérien provenant d'une culture de 500 mL est remis en suspension dans 10 mL du **tampon A**. On rajoute ensuite du Lysozyme (1 mg par mL de suspension). Après 30 min d'agitation douce à 4°C, les bactéries sont lysées par « French Press » et la solution obtenue est centrifugée à 15000 g. Après centrifugation, si la protéine surexprimée

est soluble, elle va se trouver dans le surnageant et si la protéine surexprimée est non soluble, elle va se trouver dans le culot. A ce stade, selon la nature de la protéine à purifier la suite du protocole se fait en conditions natives ou dénaturantes.

a. Conditions natives

Le surnageant est incubé dans 1 mL de matrice Ni-NTA-agarose préalablement équilibrée dans le **tampon B** pendant 1 heure à température ambiante sous agitation douce. La matrice est retenue dans une colonne puis lavée avec 20 volumes de **tampon B**. Quatre éluions (1 volume de matrice) sont faites avec du **tampon C** additionné d'imidazole 250 mM final. L'éluion peut également être faite par un gradient progressif d'imidazole (de 50 mM à 250 mM).

b. Conditions dénaturantes

Le culot est resuspendu dans 15 mL du **tampon B***. L'ensemble est incubé à température ambiante pendant 45 minutes et centrifugé à 15000 g. Le surnageant est incubé dans 1 mL de matrice Ni-NTA-agarose préalablement équilibrée dans le **tampon B*** pendant 1 heure à température ambiante et sous agitation douce. La matrice est retenue dans une colonne puis lavée avec 20 volumes de **tampon B***. Quatre éluions (1 volume de matrice) sont faites avec du **tampon C*** additionné d'imidazole 250 mM final. L'éluion peut également être faite par un gradient progressif d'imidazole (de 50 mM à 250 mM).

Tampon A : Maléate pH 8,2 50 mM, MgCl₂ 5 mM

Tampon B : Maléate pH 8,2 50 mM, MgCl₂ 5 mM, NaCl 500 mM, Imidazole 25 mM

Tampon C : HEPES 20 mM

Tampons B* et C* : correspondant aux **tampons B** et **C** additionnés d'urée 8 M final

5. Transformation des cellules végétales par *Agrobacterium tumefaciens*

Une culture d'*Agrobacterium tumefaciens* (LBA4404) transformée par la construction que l'on souhaite insérer dans l'ADN des cellules végétales est centrifugée 5 min à 5000 g. Le culot est repris dans du milieu LB de façon à obtenir une absorbance de 0,7 à 595 nm. Cent µL de culture d'agrobactéries sont mélangés à 4 ml d'une suspension

de cellules BY2 de 3 jours. L'incubation dure 2 jours à 28°C à l'obscurité dans une boîte de Pétri puis les cellules de tabac sont lavées avec du **milieu de culture BY2** et centrifugées 10 min à 5000 g. Après un second lavage dans les mêmes conditions, le culot cellulaire est repris dans 5 mL de **milieu de culture BY2** dans lequel la carbénicilline a été ajoutée (500 µg/mL). Cet antibiotique contribue à l'élimination d'*Agrobacterium* en bloquant son système de traduction mais n'a aucun effet sur les cellules végétales. L'ensemble est déposé sur des boîtes de Pétri contenant le **milieu BY2 agar**, 500 µg/mL de carbénicilline et l'antibiotique de sélection (100 µg/mL de kanamycine pour les transformations avec pBINplus). Les boîtes sont maintenues à 25°C à l'obscurité et après 3 à 4 semaines les premiers cals apparaissent. Les cals sont ensuite analysés et ceux d'intérêt sont mis culture.

6. Techniques relatives aux mitochondries de plantes

6.1 Purification de mitochondries

6.1.1 Mitochondries de pomme de terre

Ce protocole est une combinaison des techniques décrites par (Neuburger et al., 1982). Le rendement est d'environ 10-15 mg d'équivalents de protéines mitochondriales par kg de tubercules de pommes de terre. Toutes les étapes se déroulent à 4°C. Les tubercules sont pelés, coupés en morceaux. Pour 5 kg de tubercules, la quantité de jus obtenue au moyen d'une centrifugeuse à jus (type Moulinex) est d'environ 2 L. Ce jus est récolté directement dans 1 L de **tampon d'extraction 3x**. Le pH est maintenu à 7,5 au cours de ces opérations par addition de K₂HPO₄ 1 M. Il est préférable de laisser décanter la solution quelques minutes (culot d'amidon) avant de la filtrer sur une toile de Nylon de 46 µm de diamètre de maille. La solution est ensuite enrichie en mitochondries par une série de centrifugations différentielles à basse vitesse (1600 g, rotor Beckman J6B) pour éliminer l'amidon résiduel et les débris cellulaires, puis à haute vitesse (16000 g, rotor Beckman JA10.5 puis JA25.5) répétées deux fois. Les mitochondries sont enfin purifiées sur des **gradients de Percoll** de 30 mL (40000 g pendant 60 min, rotor Beckman JA25.5). Trois lavages successifs avec le **tampon de lavage** permettent l'élimination du Percoll.

Pour une utilisation ultérieure, les mitochondries sont culotées, congelées dans l'azote liquide et conservées à -80°C.

Nous utilisons alternativement un deuxième protocole qui utilise le même principe mais qui permet la purification de petites quantités de mitochondries de pomme de terre (500 g de tubercules sont utilisés). Dans ce protocole, les mitochondries sont purifiées sur des gradients de Percoll de 3 mL (40000 g pendant 15 min, rotor Beckman TLA-100).

Tampon d'extraction 3x : Saccharose 0,9 M, diphosphate de sodium pH 7,5 90 mM, EDTA 6 mM; PVP 25k 2,4% (p/v), cystéine 0,15% (p/v), glycine 15 mM, BSA 0,9% (p/v), β -mercaptoéthanol 6 mM

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

Solution de gradient : Saccharose 0,3 M, phosphate de potassium pH 7,5 10 mM, EDTA 1 mM, BSA 0,1% (p/v), Percoll 28% (v/v).

6.1.2 Mitochondries de haricot

Les mitochondries de haricot sont obtenues à partir d'hypocotyles de haricot. Environ 600 mL de jus est obtenu en passant 1 kg d'hypocotyles dans une centrifugeuse à jus (type Moulinex). On y ajoute 300 mL de tampon de broyage 3x. La suite du protocole est identique à celui utilisé pour les mitochondries de pomme de terre (cf. partie II paragraphe 6.1.1.).

6.1.3 Mitochondries de cellules de tabac BY2

Les mitochondries ont été isolées de suspensions cellulaires de tabac BY2 sauvages ou transgéniques. Pour cela, des protoplastes sont préparés à partir de 80 mL de suspension cellulaire âgée de 5 jours. Tout d'abord, les cellules sont filtrées et remises en suspension dans une **solution enzymatique** (p/v=1). Les parois cellulaires sont ainsi digérées pendant 3 heures sous légère agitation à 30°C dans le noir. Les protoplastes obtenus sont ensuite centrifugés 10 min à 800 g puis lavés dans la **solution I**. Ils sont culotés une deuxième fois et sont remis en suspension dans 40 mL de **tampon de broyage**. L'ensemble est filtré sur toile de nylon de 30 μ m. Le filtrat est centrifugé 15 min à basse vitesse (2000 g, rotor

Beckman J6B). Le surnageant récupéré est centrifugé 20 min à 16000 g (rotor Beckman JA10.5). Le culot est repris dans du **tampon de lavage** et une nouvelle série de centrifugation basse vitesse (2000 g, rotor Beckman J6B)/haute vitesse (16000 g, rotor Beckman JA10.5) est réalisée. Le culot est finalement repris dans un minimum de **tampon de lavage** et déposé sur un gradient discontinu formé par 3 niveaux de **solutions de Percoll 13,5%, 21% et 45%** (respectivement 10, 12 et 10 mL). Après centrifugation (1 heure à 40000 g, rotor Beckman JA25.5), la bande blanche de mitochondries à l'interphase 13,5%-21% est prélevée. Ces dernières sont lavées 2 fois 15 min à 17000 g (rotor Beckman JA25.5) avec du **tampon de lavage** pour éliminer le Percoll. Le culot est repris dans un mL de **tampon de lavage** et subit une dernière centrifugation en Eppendorf de 5 min à 10000 g. Les mitochondries sont soit utilisées directement soit congelées dans l'azote liquide et conservées à -80°C pour une extraction ultérieure des ARN (cf. partie II paragraphe 2.1.2.).

Solution enzymatique : Pectolyase Y23 0,1%, cellulase RS Ozonuka 1%, mannitol 0,45 M, MES pH 5,5 3,6 mM.

Solution I : Mannitol 0,45 M, MES pH 5,5 3,6 mM.

Tampon de broyage : Saccharose 0,3 M, diphosphate de sodium pH 7,5 30 mM, EDTA 2 mM; PVP 25k 0,8% (p/v), cystéine 0.05% (p/v), glycine 5 mM, BSA 0.3% (p/v), β -mercaptoéthanol 2 mM

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

Solution de Percoll 13,5% : Percoll 13,5% (v/v), saccharose 0,25 M, Tris-HCl pH 7,5 50 mM, EDTA 3 mM

Solution de Percoll 21% : Percoll 21% (v/v), saccharose 0,25 M, Tris-HCl pH 7,5 50 mM, EDTA 3 mM

Solution de Percoll 45% : Percoll 45% (v/v), saccharose 0,25 M, Tris-HCl pH 7,5 50 mM, EDTA 3 mM

6.2 Traitement trypsique des mitochondries de pomme de terre

Les protéines extrinsèques accessibles au niveau de la membrane externe peuvent être dégradées par traitement trypsique doux. A 1 mg de mitochondries resuspendues dans 100 μL de **tampon de lavage** (voir ci-dessus) sont ajoutées des concentrations croissantes

de trypsine (2 μg à 16 μg). Après 12 min à 4°C, 50 μL d'inhibiteur tryptique Sigma (10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) et 500 μL de **tampon de lavage** sont ajoutés. Après 10 min d'incubation à 4°C, l'échantillon est centrifugé 10 min à 17000 g. Deux lavages successifs avec 1 mL de **tampon de lavage** sont effectués. Ces mitochondries sont ensuite utilisées pour faire des expériences d'import et/ou sont analysées sur SDS-PAGE.

6.3 Fractionnement fait sur les mitochondries de pomme de terre : mitoplastes et membrane externe

Pour préparer les mitoplastes et les membranes externes, une méthode basée sur le principe de gonflement hypotonique a été utilisée. Le protocole dérive de celui décrit par (Heins et al., 1994).

Les mitochondries « fraîchement » préparées et culotées sont resuspendues dans un tampon de basse osmolarité (phosphate de potassium pH 7,2 5 mM, PMSF 0,5 mM) à raison de 0,1 mg de protéines par mL de tampon. Après 10 min à 4°C, un volume de ce tampon est ajouté et la suspension est maintenue à nouveau 15 min à 4°C. L'osmolarité finale entraîne la rupture de la membrane externe, mais pas celle de la membrane interne. La suspension est passée dans un homogénéisateur de type Potter afin de décrocher, de la membrane interne, les fragments de membrane externe. Les membranes externes sont alors séparées des mitoplastes et des mitochondries non cassées par centrifugation à travers un gradient discontinu de saccharose : 600 μl de l'échantillon sont déposés par gradient discontinu formé de trois couches de 800 μl de **solution de gradient** renfermant respectivement 15, 32 et 60% (p/v) de saccharose. Après centrifugation à 4°C, pendant 18 min à 130000 g (rotor Beckman TL-100), les mitoplastes se trouvent à l'interphase 32-60% et les membranes externes à l'interphase 15-32%. Les mitoplastes et les membranes externes sont prélevés, dilués 10 fois dans du **tampon de lavage** et collectés par centrifugation pendant 15 min à 165000 g (rotor Beckman TLA-100).

Solution de gradient : Phosphate de potassium pH 7,5 10 mM, EDTA 2 mM, BSA 0,2% (p/v).

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.

6.4 Importation in vitro de protéines dans les mitochondries isolées de pommes de terre

6.4.1 Transcription et traduction in vitro

Le précurseur de la protéine dont on souhaite étudier l'importation dans les mitochondries est synthétisé par une transcription et une traduction couplées dans un lysat de réticulocytes de lapin en présence de méthionine marquée au [³⁵S]. Nous utilisons le système « TNT[®] Coupled Retyculocytes Lysate System » (Promega). Le milieu réactionnel de 50 μ L contient :

-25 μ L de TNT[®] Rabbit Retyculocytes Lysate (Promega)

-2 μ L du tampon de transcription TNT[®] (Promega)

-1 μ L de la T7 ARN polymérase TNT[®] (Promega)

-1 μ L d'un mélange d'acides aminés sans la méthionine 1 mM

-6 μ L de [³⁵S] méthionine 10 μ Ci/ μ L (activité spécifique de 1000 Ci/mmol)

-1-2 μ g d'un plasmide contenant le promoteur d'une T7 ARN polymérase et l'ADNc complet de la protéine d'intérêt.

Après 1 h 30 d'incubation, l'ensemble est réparti en fractions de 5 μ l qui sont ensuite congelés à -80°C.

6.4.2 Test d'importation in vitro dans les mitochondries

L'importation *in vitro* de protéines dans les mitochondries a été réalisée selon le protocole décrit par (Rudhe et al., 2002). Cinquante μ g de mitochondries de pomme de terre sont repris dans un volume final de 50 μ L contenant 25 μ L de **tampon d'importation** en présence de 40 μ M d'ADP et 2 mM d'ATP. Les protéines radiomarquées (5 μ L) sont ajoutées et la solution est incubée 30 min à 25°C sous agitation. Le milieu réactionnel est ensuite déposé sur un coussin de saccharose à 27% (p/v) et les mitochondries sont récupérées après centrifugation 10 min à 9000 g. Le surnageant est éliminé et le culot de mitochondries est repris dans du tampon de charge pour analyse sur gel de polyacrylamide (cf. partie II paragraphe 4.3.). Le gel est ensuite séché puis exposé contre une plaque phosphoImager (Fuji) ou mis en autoradiographie.

Dans la pratique, une expérience d'importation nécessite un certain nombre de contrôles, c'est pourquoi quatre essais différents sont généralement réalisés :

-le premier ne subit aucun traitement particulier.

-le second subit un traitement à la protéinase K (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pendant 10 min à température ambiante inhibée ensuite avec 1 mM de PMSF). Avec ce traitement, seules les protéines incorporées dans les mitochondries sont alors protégées de l'action de la protéinase K.

-dans le troisième les mitochondries sont pré-traitées à la valinomycine (2 μM) pendant 10 min à 4°C avant l'ajout des protéines marquées. Ce traitement a pour effet de dissiper le potentiel de membrane bloquant ainsi le transport du précurseur à travers le canal d'importation des protéines.

-le quatrième est traité à la valinomycine et à la protéinase K. Dans ces conditions, ni la protéine précurseur ni la protéine mature sont protégées de la dégradation par la protéinase K. Ce contrôle montre que la bande considérée comme la protéine mature n'est pas un produit de dégradation résistant à la protéinase K.

Tampon d'importation : Mannitol 300 mM, Hepes-KOH pH 7,5 20 mM, KCl 80 mM, K_2HPO_4 1 mM, malate 1 mM, DTT 1 mM, NADH 1 mM

Coussin de saccharose 27% : Tris-HCl pH 7,5 20 mM, saccharose 27%, EDTA pH 8,0 1 mM, K_2HPO_4 100 mM, BSA 1 mg/mL

6.5 Importation d'ARNt *in vitro* dans les mitochondries isolées

L'importation *in vitro* d'ARNt dans les mitochondries a été réalisée selon le protocole décrit par (Delage et al., 2003b) excepté le fait que 0,2 μl d'inhibiteur de RNase (RNase Out, Invitrogen) ont été ajoutés au milieu réactionnel. Ce milieu réactionnel de 50 μl contient :

-25 μl de **tampon import 2x**

-40 μM ADP

-5 mM ATP

-5 mM MgCl_2

-100 μg de mitochondries fraîchement préparées

-50 fmoles de transcrit marqué au $[\alpha^{32}\text{P}]\text{UTP}$ (100 000 cpm)

Après incubation pendant 20 min à 25°C (étuve thermostatée) sous agitation, 50 μ L d'un mélange de RNases (100 μ g/mL de RNase A et 750 U/mL de RNase T1) dans le **tampon de lavage** sans BSA sont ajoutés afin de dégrader les molécules de transcrits se trouvant à l'extérieur des mitochondries. Après une incubation de 10 min à température ambiante, 1 mL de **tampon A** est ajouté et l'ensemble est centrifugé 5 min à 9000 g. Le surnageant est éliminé et le culot de mitochondries subit deux autres étapes similaires de lavage. Puis, les ARN sont extraits selon la technique d'extraction des ARN mitochondriaux (cf. partie II paragraphe 2.1.2.). L'analyse des transcrits incorporés dans la fraction mitochondriale est réalisée sur un gel d'acrylamide dénaturant (15%, 7 M urée). Le gel est ensuite séché puis exposé contre une plaque de PhosphorImager (Fuji) ou mis en autoradiographie.

Afin d'analyser les effets des anticorps, du ruthenium red, de la pré-séquence F1 β , de l'atractyloside ou des transcrits d'ARNt non radiomarqués sur l'importation, les mitochondries sont pré-incubées en présence de l'un des produits pendant 10 min à 4°C avant d'ajouter les transcrits radiomarqués au [α ³²P]UTP.

Tampon import 2x : Mannitol 600 mM, phosphate de potassium pH 7,5 2 mM, Hepes-KOH pH 7,2 20 mM, KCl 40 mM, DTT 2 mM, malate 2 mM, NADH 2 mM

Tampon de lavage : Mannitol 300 M, phosphate de potassium pH 7,5 10 mM, EDTA 1 mM, BSA 0,1% (p/v), glycine 5 mM

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

6.6 Expérience de fixation d'ARNt in vitro à la surface mitochondriale

Les expériences de fixation des ARNt à la surface mitochondriale, également appelée expériences de « binding » sont faites selon le protocole décrit pour l'expérience d'importation *in vitro* à l'exception de l'étape de traitement par les RNases qui est omise. Cette expérience permet d'observer les ARNt non seulement incorporés dans les mitochondries mais également les ARNt fixés au niveau de la surface mitochondriale. Les ARNt incorporés dans les mitochondries ne représentent que 10 % des ARNt fixés.

De la même façon, pour analyser les effets des anticorps sur la fixation des ARNt sur la surface mitochondriale, les mitochondries sont pré-incubées en présence des anticorps pendant 10 min à 4°C avant d'ajouter les transcrits radiomarqués au [α ³²P]UTP.

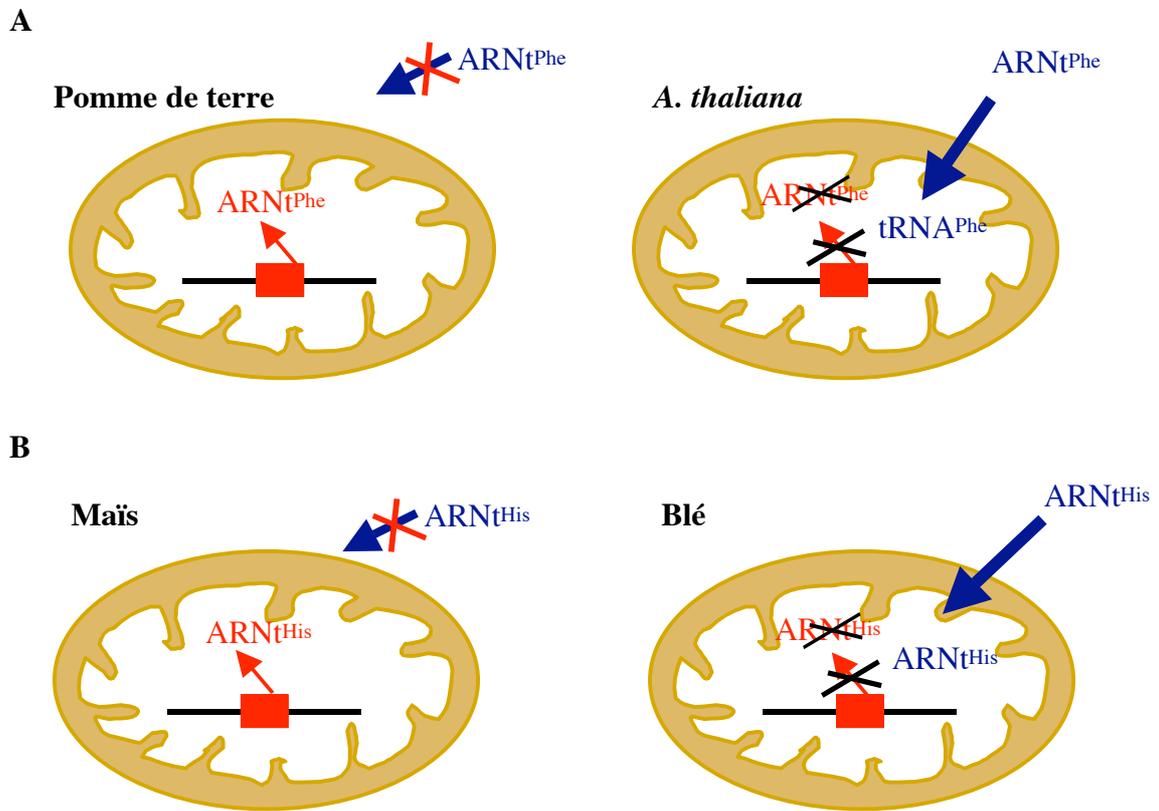


Figure 17 : Importation sélective des ARNt cytosoliques dans les mitochondries végétales

A: exemple de l'ARNt^{Phe} dans le cas des mitochondries la pomme de terre et *A. thaliana*

B: exemple de l'ARNt^{His} dans le cas des mitochondries le maïs et le blé

RESULTATS-DISCUSSION

CHAPITRE I

Etude de la spécificité d'importation des ARNt cytosoliques dans la mitochondrie de plante : le modèle des ARNt^{Gly} isoaccepteurs.

1. L'importation des ARNt est un mécanisme spécifique

Comme nous l'avons dit précédemment, le nombre et l'identité des ARNt importés dans la mitochondrie varie d'une plante à l'autre. De façon surprenante, chez toutes les plantes supérieures étudiées à ce jour, nous avons également remarqué que la mitochondrie n'importe que les ARNt qui lui sont nécessaires. En effet, il a été observé que lorsqu'un ARNt n'est pas exprimé dans la mitochondrie, l'ARNt cytosolique correspondant est alors importé. Par exemple, la mitochondrie de pomme de terre code pour l'ARNt^{Phe} et n'importe pas l'ARNt^{Phe} cytosolique, alors que la mitochondrie d'*A. thaliana* ne code pour aucun ARNt^{Phe} et importe l'ARNt^{Phe} cytosolique (Figure 17). Ainsi, l'importation des ARNt dans la mitochondrie de plante s'avère être un mécanisme hautement sélectif mettant probablement en place un processus de régulation très fin.

Un aspect dans l'étude de l'importation des ARNt dans les mitochondries de plante est de comprendre cette spécificité. Comment la mitochondrie fait-elle pour discriminer les ARNt cytosoliques retrouvés dans la mitochondrie de ceux qui ne le sont pas ? Y-a-t-il des signaux dans les ARNt qui permettent de les distinguer les uns des autres ? Pourquoi d'une espèce végétale à l'autre, un même ARNt cytosolique est-il présent ou non dans la mitochondrie ?

2. Etude des déterminants d'importation sur les ARNt

Une approche a consisté à étudier les déterminants d'importation. En effet, l'idée de départ était que l'identification des éléments importants pour l'importation permettrait également d'émettre des hypothèses quant à la nature du mécanisme et des facteurs impliqués dans l'importation des ARNt. Récemment, une étude a été faite en utilisant

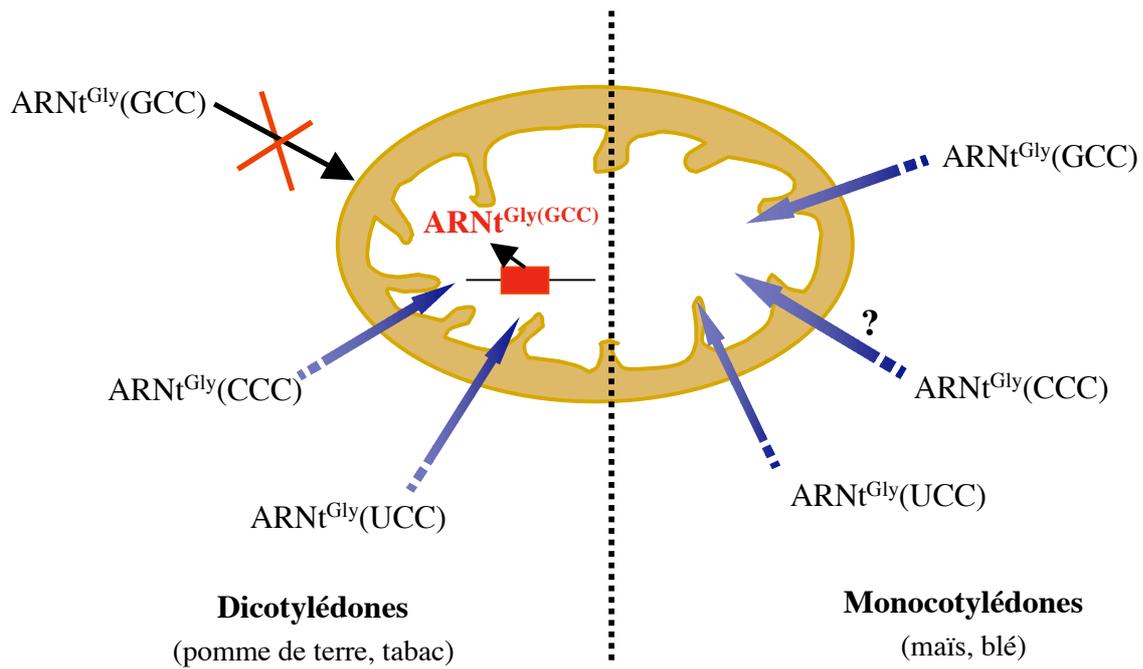


Figure 18 : Importation sélective des ARNt^{Gly} isoaccepteurs (d'après Brubacher-Kauffmann et al., 1999).

? : L'importation des $\text{ARNt}^{\text{Gly}}(\text{CCC})$ a été moins étudiée. Pour la lecture des quatre codons glycine les deux ARNt^{Gly} , l' $\text{ARNt}^{\text{Gly}}(\text{GCC})$ et l' $\text{ARNt}^{\text{Gly}}(\text{UCC})$, sont a priori suffisants

l'approche transgénique sur le couple d'ARNt, ARNt^{Val} et ARNt^{Met-e}. Pour cela, différents mutants des gènes codant pour de ces deux ARNt ont été utilisés pour transformer des cellules BY2 de tabac et l'efficacité d'importation des ARNt mutés correspondant dans les mitochondries a été analysée par northern. *In vivo*, tous les ARNt^{Val} isoaccepteurs sont importés dans les mitochondries de plante alors que l'ARNt^{Met-e} ne l'est pas. L'échange de séquences entre les deux types d'ARNt a permis de déterminer que les mutations affectant la reconnaissance de l'ARNt^{Val} par la valyl-ARNt synthétase inhibaient son importation, suggérant ainsi que les aminoacyl-ARNt synthétases jouaient un rôle dans l'importation des ARNt ce qui est en accord avec les résultats obtenus précédemment (Dietrich et al., 1996a). Par contre, il s'est avéré que des mutations au niveau des domaines T et D, bien que n'affectant pas l'amination de l'ARNt^{Val}, inhibaient aussi son importation (Delage et al., 2003a; Laforest et al., 2005). Ceci conforte les résultats précédents (Dietrich et al., 1996b) à savoir que si les aminoacyl-ARNt synthétases sont nécessaires, elles ne sont pas suffisantes pour l'importation et que d'autres facteurs sont probablement impliqués.

Pour compléter ces données, nous avons choisi d'étudier d'autres ARNt et nous nous sommes particulièrement intéressés aux ARNt^{Gly} isoaccepteurs. En effet, ce modèle présente des particularités qui le rendent intéressant pour l'étude de l'importation.

2.1 Choix du modèle : les ARNt^{Gly} des plantes dicotylédones

2.1.1 Importation sélective des ARNt^{Gly} isoaccepteurs chez les plantes dicotylédones

Alors que, les ARNt^{Gly} sont tous codés par le génome mitochondrial de certaines végétaux comme le bryophyte *Marchantia polymorpha* (Akashi et al., 1997), ils sont tous importés dans chez les mitochondries des plantes monocotylédones comme le blé et le maïs (Glover and Gray, 1994; Kumar et al., 1996). Chez les plantes dicotylédones comme par exemple la pomme de terre et le haricot, on trouve une situation intermédiaire (Figure 18). En effet, seul l'ARNt^{Gly}(GCC) qui permet de lire les codons (GGU) et (GGC) est codé par le génome mitochondrial et il n'est donc pas suffisant pour lire les quatre codons glycine. L'ARNt^{Gly}(UCC) qui permet de lire les codons (GGA) et (GGG) est donc nécessaire pour un bon fonctionnement de la machinerie traductionnelle mitochondriale. Des études ont ainsi montré que l'ARNt^{Gly}(UCC) cytosolique était importé dans les

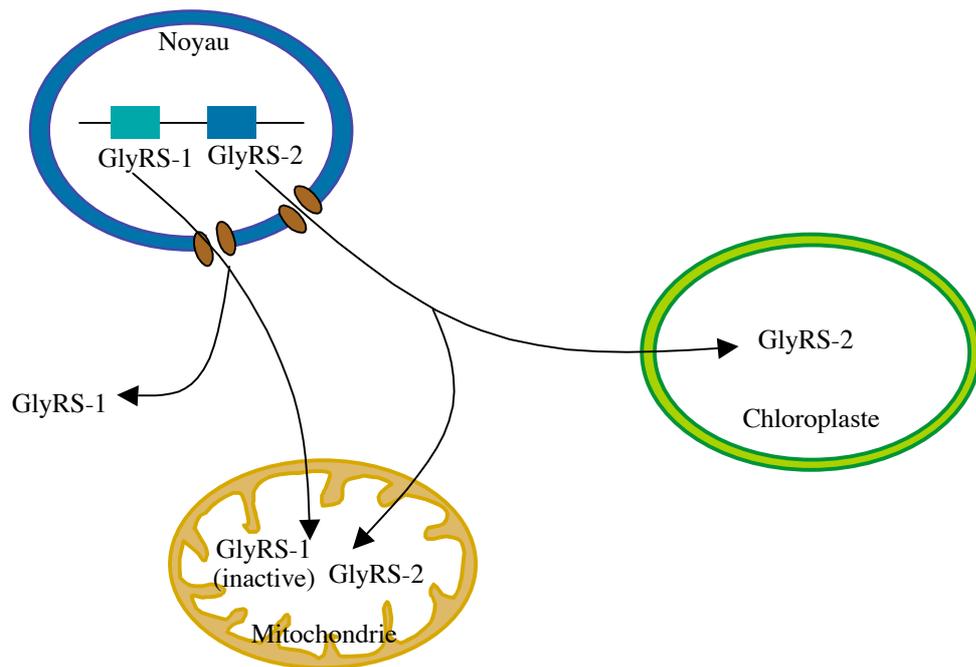


Figure 19 : Les glycyL-ARNt synthétases chez *A. thaliana* et le haricot (d'après (Duchêne et al., 2001))

L'activité de GlyRS-1 n'est pas retrouvée dans les mitochondries

mitochondries alors que l'ARNt^{Gly}(GCC) cytosolique ne l'était pas (Brubacher-Kauffmann et al., 1999). En plus des ARNt^{Gly} (GCC) et (UCC), il existe un troisième ARNt^{Gly} cytosolique, l'ARNt^{Gly}(CCC) qui n'est a priori pas nécessaire mais qui est également importé dans les mitochondries de pomme de terre.

Cette importation sélective des isoaccepteurs est tout à fait originale car de façon générale l'ensemble des isoaccepteurs sont importés (cf. introduction partie III paragraphe 2.3). Ainsi, dans les mitochondries de plantes dicotylédones il y a coexistence d'ARNt^{Gly} d'origines différentes (nucléaire et mitochondriale).

2.1.2 Deux glycyl-ARNt synthétases sont importées dans le cytosol

Il a été montré, avec différents ARNt, qu'il y avait une corrélation entre aminoacylation et importation *in vivo*. Le problème de l' aminoacylation des ARNt^{Gly} mitochondriaux de plantes dicotylédones est rendu particulièrement complexe du fait de la présence d'ARNt^{Gly} d'origines différentes : un ARNt^{Gly}(GCC) codé par le génome mitochondrial et proche des ARNt^{Gly} bactériens, des ARNt^{Gly}(UCC) et (CCC) importés du cytosol et de type eucaryote. Or, il a été montré que les glycyl-ARNt synthétases eucaryotes reconnaissaient mal les ARNt^{Gly} procaryotes et vice-versa (Giegé et al., 1998). Ceci a donc posé la question de savoir quel type de glycyl-ARNt synthétase se trouvait dans la mitochondrie.

Chez les plantes supérieures, aucune aminoacyl-ARNt synthétase n'est codée dans la mitochondrie, elles sont toutes codées dans le noyau. Les travaux fait par (Duchene et al., 2001) montrent l'existence de deux glycyl-ARNt synthétases (GlyRS-1 et GlyRS-2) chez *A. thaliana*. GlyRS-1, de type eucaryotique, est à la fois cytosolique et mitochondriale et GlyRS-2, de type procaryotique, est localisée dans les mitochondries et les chloroplastes (Figure 19). De fait les deux aminoacyl-ARNt synthétases, GlyRS-1 et GlyRS-2, ont été détectées dans les mitochondries (Duchene et al., 2001). Par contre, les travaux de Duchêne et *col.* ont montré que seule GlyRS-2 était active dans la mitochondrie et qu'elle était capable d' aminoacyler l'ARNt^{Gly}(UCC) cytosolique et l'ARNt^{Gly}(GCC) mitochondrial avec des efficacités comparables (Duchene et al., 2001). Si la GlyRS-1 n'a pas d'activité d' aminoacylation dans la mitochondrie, on peut s'interroger sur sa présence dans cette organelle. Une hypothèse attrayante est donc que cette aminoacyl-ARNt synthétase soit impliquée dans l'importation des ARNt^{Gly}.

2.2 Etude des déterminants d'importation des ARNt^{Gly}

Les données obtenues par ces travaux ont fait l'objet d'un premier article publié dans *Biochimie* 87 (2005) 863-872.

Article 1

Dans cet article, nous avons montré que chez les cellules BY2 de tabac, l'importation sélective des ARNt^{Gly} isoaccepteurs était semblable à celle observée chez la pomme de terre et le haricot. Ainsi, après avoir établi que le tabac pouvait être également utilisé comme modèle d'étude pour l'importation différentielle des ARNt^{Gly}, nous avons construit différentes versions mutantes des ARNt^{Gly}(GCC) et (UCC).

Les différents mutants

Quatre types de mutations ont été faites (cf. Figure 1 de l'article 1) :

- **une mutation de repérage** dans la tige de l'anticodon (mutations « tag ») a été faite afin de distinguer dans les cellules transgéniques BY2 de tabac, les ARNt ayant subi une mutation des ARNt « sauvages ».
- **au niveau de l'anticodon** (2 mutants). Ces mutants correspondent à l'ARNt^{Gly}(GCC) muté en position 34 de l'anticodon (G en U) et à l'ARNt^{Gly}(UCC) muté en position 34 de l'anticodon (U en G).
- **au niveau du domaine D** (2 mutants). Ces mutants correspondent à l'ARNt^{Gly}(GCC) dont le domaine D a été échangé par celui l'ARNt^{Gly}(UCC) et vice-versa.
- **au niveau des éléments d'identité pour les GlyRS** (3 mutants). Les deux premiers correspondent à l'ARNt^{Gly}(GCC) muté au niveau de la paire N3-N70 (A3-U70 en G3-C70) puis muté au niveau de la position discriminante N73 (A73 en U73). Le troisième correspond à l'ARNt^{Gly}(UCC) muté au niveau de la paire N3-N70 (G3-C70 en A3-U70).

A partir de ces constructions, deux études ont été réalisées. D'une part, les constructions ont été utilisées pour tester leur capacité à être aminoacylés par la GlyRS-1 (cytosolique) et la GlyRS-2 (mitochondriale). D'autre part, certaines constructions ont été utilisées pour étudier l'importation *in vivo*.

Aminoacylation des mutants

Nous avons observé que l'ensemble des mutations n'ont affecté ni la reconnaissance des ARNt par la GlyRS-1, ni la reconnaissance par la GlyRS-2. Seul l'ARNt^{Gly}(UCC) muté au niveau du domaine D présente une vitesse initiale de glycylation par la glyRS-1, quatre fois inférieure.

Importation *in vivo*

Pour cette étude, seules trois types de constructions ont été choisies pour transformer les cellules BY2 : la construction ayant la mutation de repérage (mutation « tag »), les constructions mutées au niveau de l'anticodon et les constructions mutées au niveau du domaine D.

Nous avons ainsi montré que pour l'importation de l'ARNt^{Gly}(UCC), l'anticodon et le domaine D sont importants. Cependant, le remplacement de l'un ou de l'autre domaine de l'ARNt^{Gly}(GCC) par ceux de l'ARNt^{Gly}(UCC) ne sont pas suffisants pour permettre l'importation. Les études faites chez le tabac sur l'ARNt^{Val} ont également montré que le domaine D et l'anticodon étaient nécessaires pour l'importation de l'ARNt (Delage et al., 2003a) mais qu'ils n'étaient pas suffisants (Laforest et al., 2005). De la même façon, il est probable que le domaine D et l'anticodon de l'ARNt^{Gly}(UCC) soient nécessaires mais pas suffisants pour l'importation.

Importation *in vitro* et stabilité

Nous avons utilisé le système *in vitro* mis en place dans notre laboratoire pour tester l'importation de nos deux transcrits ARNt^{Gly}(GCC) et ARNt^{Gly}(UCC) sauvages. Nous avons ainsi montré, que les ARNt, l'ARNt^{Gly}(UCC) importé et l'ARNt^{Gly}(GCC) non importé *in vivo*, étaient tous les deux importés *in vitro*. De la même façon, lorsque nous avons étudié leur stabilité à l'intérieur de la mitochondrie, nous avons observé que les deux ARNt étaient aussi stables l'un que l'autre. Ceci montre qu'*in vitro* l'ARNt^{Gly}(GCC) est capable de rentrer dans la mitochondrie et qu'aucun signal de « rétention cytosolique » n'est présent dans sa séquence, ce qui est en accord avec ce qui est observé chez les plantes monocotylédones à savoir que l'ARNt^{Gly}(GCC) cytosolique est importé.

ARTICLE 1

Sequence dependance of tRNA^{Gly} import into tobacco mitochondria

Thalia Salinas, Cécile Schaeffer, Laurence Maréchal-Drouard, Anne-Marie Duchêne.

Biochimie 87 (2005) 863-872

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

Sequence dependence of tRNA^{Gly} import into tobacco mitochondria

Thalia Salinas, Cécile Schaeffer, Laurence Maréchal-Drouard et Anne-Marie Duchêne

Biochimie , 2005, Vol. 87, Pages 863-872

Pages 863 à 872 :

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://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2005.04.004>

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

Structure tridimensionnelle

Ex : ARNt^{Gly}, ARNt^{Val}

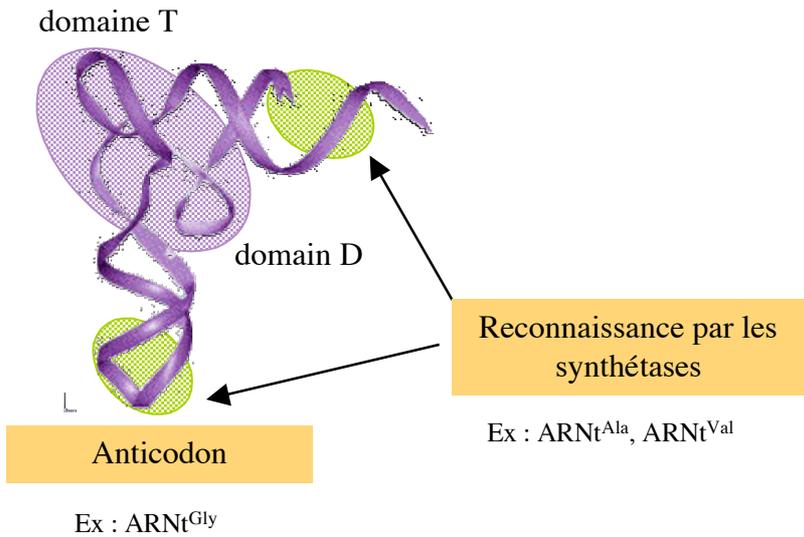


Figure 20 : Récapitulatif des régions importantes pour l'importation des ARNt
Structure tridimensionnelle de l'ARNt. La zone d'interaction entre le domaine T et le domaine D est indiquée par l'ovale violet. Les deux principales zones permettant la reconnaissance par l'aminoacyl-ARNt synthétase sont indiquées par les ovales verts. Les trois types de mutations affectant l'importation des ARNt sont indiquées sur fond orange.

3. Discussion

Ainsi, l'ensemble des études réalisées *in vivo*, mettent en évidence trois types de mutations affectant l'importation des ARNt (Figure 20) :

- les mutations affectant la reconnaissance par les aminoacyl-ARNt synthétases comme c'est le cas pour l'ARNt^{Ala} et l'ARNt^{Val}.
- les mutations localisées au niveau du domaine D ou T et qui affectent probablement la structure tertiaire de l'ARNt comme c'est le cas pour l'ARNt^{Val} et l'ARNt^{Gly}.
- la mutation de l'anticodon qui pour l'ARNt^{Gly}(UCC) est importante (sans pour autant affecter la reconnaissance par la glycyl-ARNt synthétase).

Cette variété de mutations affectant l'importation montre que plusieurs facteurs sont impliqués dans l'importation des ARNt. Ceci dénote également un système d'importation complexe dans lequel différents déterminants pourraient intervenir à différents stades de l'importation. Ceci serait d'ailleurs en accord avec le système d'importation des ARNt hautement spécifique observé chez les plantes.

L'importation des ARNt dans la mitochondrie peut être séparée en trois étapes principales et chacune de ces étapes pourrait être sélective. Ces trois étapes sont (Figure 21) :

- ① l'acheminement des ARNt jusqu'à la surface mitochondriale
- ② le passage à travers les membranes mitochondriales
- ③ leur maintien à l'intérieur de la mitochondrie

3.1 Acheminement

Une première possibilité pour la sélection des ARNt importés est qu'elle se fasse au moment de leur acheminement jusqu'à la surface mitochondriale. La théorie du « channeling » stipule que les ARNt ne sont pas libres mais qu'ils seraient toujours associés à d'autres molécules (Negrutskii and Deutscher, 1991; Negrutskii and El'skaia, 2001). Les ARNt importés dans la mitochondrie ne seraient donc pas par « hasard » au niveau de la surface mitochondriale, mais seraient plutôt acheminés depuis le noyau jusqu'à la mitochondrie de façon spécifique.

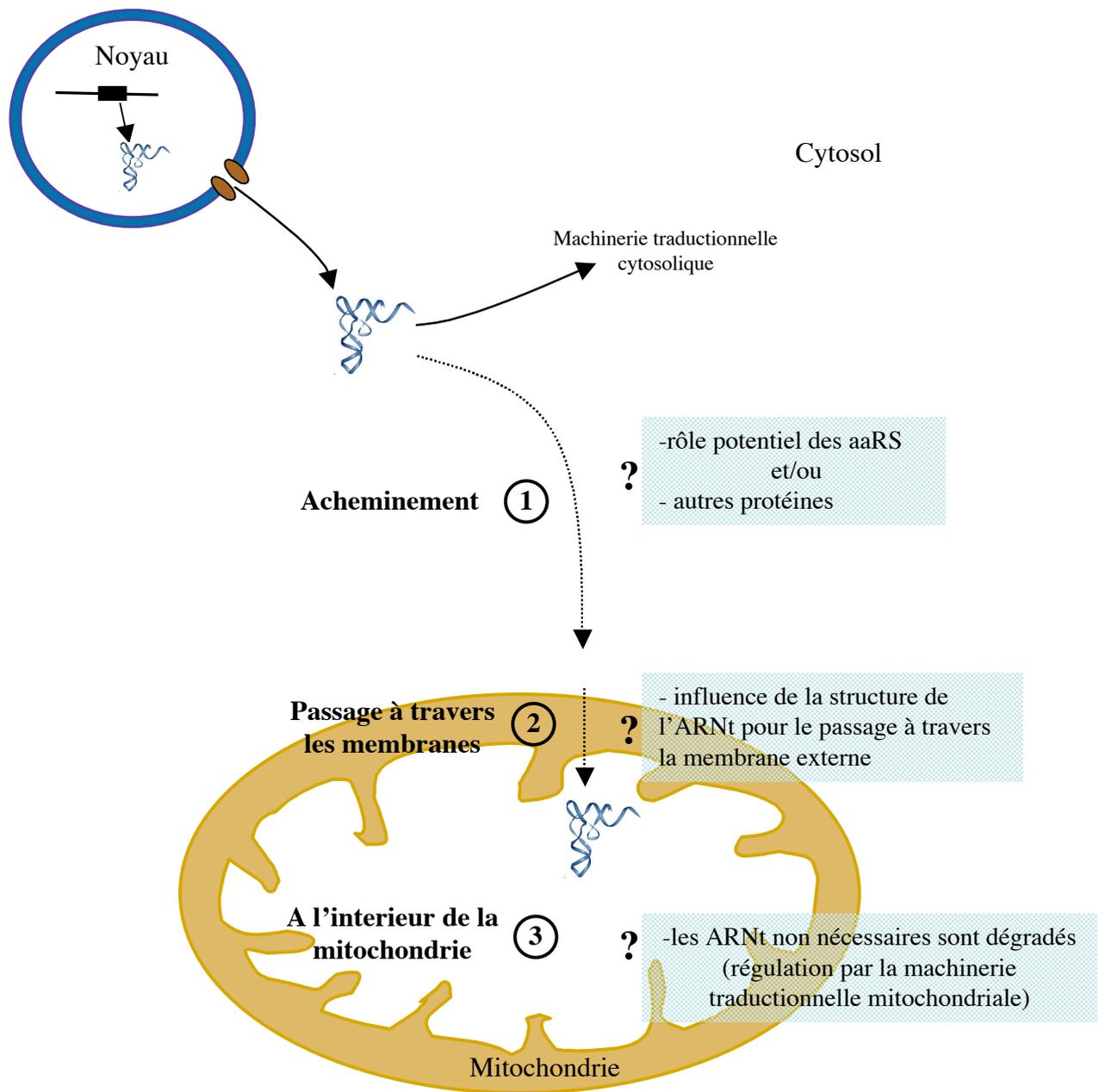


Figure 21 : Trois étapes possibles de sélection lors de l'importation des ARNt cytosoliques dans la mitochondrie végétale
 En fond bleu sont indiquées les différentes hypothèses émises au cours de la discussion
 aaRS: aminoacyl ARNt synthétase

Parmi les différentes protéines interagissant avec les ARNt au cours de la traduction cytosolique, les aminoacyl-ARNt synthétases sont les seules à reconnaître spécifiquement les différents ARNt isoaccepteurs. Ce sont donc de bons candidats pour exercer une sélectivité au niveau de l'importation. D'autant plus, qu'une reconnaissance par la aminoacyl-ARNt synthétase appropriée semble nécessaire pour l'importation *in vivo* (Delage et al., 2003a).

Chez les plantes, toutes les aminoacyl-ARNt synthétases sont importées. Or, tous les ARNt ne sont pas importés dans les mitochondries. Il faut toutefois noter que de nombreuses aminoacyl-ARNt synthétases ont une origine clairement eubactérienne (Duchene et al., 2005) et ne sont probablement pas capables d'interagir et de reconnaître les ARNt cytosoliques, de type eucaryote. En ce qui concerne les ARNt cytosoliques importés, il est à noter que pour cinq familles d'isoaccepteurs (Ala, Leu, Thr, Val et Gly), les aminoacyl-ARNt synthétases cytosoliques correspondantes ont été identifiées comme étant doublement adressées dans le cytosol et la mitochondrie. Il est donc attrayant de proposer, pour ces exemples, que lors de l'adressage des aminoacyl-ARNt synthétases vers les mitochondries, elles entraînent avec elles les ARNt. Ainsi, lors de l'interaction des aminoacyl-ARNt synthétases avec le complexe TOM, elles favoriseraient l'interaction de l'ARNt avec son récepteur qui semble être un complexe protéique comprenant au moins deux composants du complexe TOM (cf. chapitre II).

Cependant bien que les aminoacyl-ARNt synthétases semblent jouer un rôle déterminant dans la spécificité de l'importation des ARNt, on ne peut pas exclure la participation d'autres protéines comme cela a été démontré pour l'énolase chez *S. cerevisiae* (Entelis et al., 2006).

3.2 Passage à travers les membranes

Le système d'importation *in vitro* utilisant des mitochondries de pomme de terre isolées, représente l'outil approprié pour étudier cette étape. En effet, dans notre système, aucun facteur cytosolique n'est a priori présent, les ARNt sont directement mis en contact avec les mitochondries et la détection de leur importation est immédiate.

L'expérience d'importation *in vitro* faite dans notre étude sur les ARNt^{Gly}, montre que l'ARNt^{Gly}(UCC) (importé) et l'ARNt^{Gly}(GCC) (non importé) sont tous les deux importés dans la mitochondrie de pomme de terre. Cette expérience montre que

l'ARNt^{Gly}(GCC) est en fait capable de rentrer dans la mitochondrie isolée et ceci est en accord avec ce qui est observé chez les plantes monocotylédones.

L'importation *in vitro* d'ARNt a également été réalisée sur les ARNt^{Ala} (naturellement importés) puis sur les ARNt^{Phe} et ARNt^{Met} (non importés chez la pomme de terre) (Delage et al., 2003b). *In vivo*, les ARNt^{Phe} et ARNt^{Met} ne sont pas détectés dans les mitochondries de pomme de terre (Kumar et al., 1996) mais ils sont importés à des taux réduits *in vitro*. Par contre, l'ARNt^{Ala} qui est fortement importé *in vivo*, n'est importé *in vitro* qu'à un taux 4 fois supérieur à celui des ARNt^{Phe} et ARNt^{Met}. Il semble donc que notre système *in vitro* soit moins sélectif que le système *in vivo*. Ainsi, il est possible que tous les ARNt cytosoliques soient finalement capables de passer à travers les deux membranes de la mitochondrie. Par contre, une grande partie de la sélection se ferait avant ou après le passage des membranes.

Toutefois, il est à noter que toutes les mutations affectant potentiellement la structure tridimensionnelle d'un ARNt (Val, Met et Gly) affectent également son importation *in vivo*. Or, nous verrons plus loin (cf. chapitre II) que la protéine VDAC (« Voltage Dependent Anion Channel ») semble être impliqué dans le passage des ARNt à travers la membrane externe mitochondriale. Cette VDAC forme un pore de 2 à 4 nm de diamètre. Des études qui ont été faites sur des membranes lipidiques reconstituées contenant la VDAC ont montré qu'elle permettait le passage de l'ADN double brin (Szabo et al., 1998). Si le diamètre de la VDAC est suffisant pour laisser passer une double hélice d'acides nucléiques, le passage d'un ARNt structuré, dans sa forme en « L », est plus difficile à imaginer. Pour le moment nous ne savons pas dire si l'ARNt est importé sous une forme structurée ou non, mais il est possible de supposer que les mutations pouvant affecter la structure tridimensionnelle pourraient également affecter la structure nécessaire pour le passage à travers VDAC.

3.3 A l'intérieur des mitochondries

Chez les plantes, le plus surprenant c'est non seulement la grande spécificité d'importation observée dans les mitochondries d'une plante mais c'est aussi le fait que des ARNt ayant la même séquence sont importés dans les mitochondries de certaines plantes et pas dans d'autres. Une explication possible à ce phénomène est que l'ensemble des ARNt cytosoliques puissent entrer dans la mitochondrie mais qu'il existe une régulation à l'intérieur de l'organelle.

Les travaux de (Negrutskii and Deutscher, 1991), à la base de la théorie du « channeling », montrent que lorsque des ARNt exogènes sont inoculés dans les cellules d'ovaires de hamster, ceux-ci sont très faiblement utilisés. Il propose que les ARNt endogènes sont, après leur transcription, tout de suite pris en charge par diverses protéines pour les acheminer jusqu'à leur destination sans être à aucun moment libres dans le cytosol. Les ARNt exogènes libres se trouvant ainsi isolés ne seraient pas utilisés

De la même façon, il est possible qu'il existe une sorte de « compétition » entre les ARNt codés par la mitochondrie et les ARNt cytosoliques importés codant pour un même codon. Ainsi, les ARNt endogènes codés par le génome mitochondrial seraient préférentiellement utilisés par la machinerie traductionnelle mitochondriale et les ARNt cytosoliques correspondant importés seraient peu ou pas utilisés. Les ARNt cytosoliques non utilisés seraient alors dégradés.

Nous avons donc essayé d'explorer cette possibilité en étudiant la stabilité des ARNt^{Gly}(UCC) et (GCC) dans la mitochondrie après importation *in vitro*. Dans notre étude, les deux ARNt sont tous deux très stables. Ce résultat contredit notre hypothèse, mais il ne faut pas exclure la possibilité que l'absence de différence de stabilité entre les deux ARNt puisse être due aux conditions artificielles du système *in vitro*. Cette hypothèse reste toutefois attractive pour expliquer les différences d'importation d'ARNt d'une plante à l'autre et devrait être étudiée avec d'autres ARNt.

CHAPITRE II

Identification de protéines membranaires mitochondriales impliqués dans l'importation des ARNt chez les plantes

Un autre aspect dans l'étude de l'importation des ARNt est la compréhension du mécanisme permettant leur transport à travers les membranes mitochondriales. Les ARNt sont des molécules de grande taille d'environ 25 kDa qui pour traverser les membranes mitochondriales ont besoin d'une machinerie d'importation. Or, la seule machinerie d'importation de macromolécules caractérisée à ce jour est celle des protéines (Rehling et al., 2004).

Les données concernant les protéines qui sont impliquées dans la machinerie d'importation des ARNt sont encore parcellaires. A l'heure actuelle, deux modèles d'importation d'ARNt à travers les membranes mitochondriales ont été proposés. Dans le premier c'est-à-dire chez *S. cerevisiae*, l'ARNt^{Lys} est cotransporté avec la forme précurseur de la lysyl-ARNt synthétases mitochondriale via le canal d'importation des protéines. Des études d'importation *in vitro* dans des mitochondries de lignées de levure mutantes ont montré que la protéine TOM20 au niveau de la membrane externe et que la protéine TIM44 au niveau de la membrane interne, étaient impliquées dans le transport des ARNt (Tarassov et al., 1995a). Dans le deuxième modèle, caractérisé chez les trypanomatidés, l'importation des ARNt et celle des protéines se fait par des voies différentes (Mukherjee et al., 1999; Nabholz et al., 1999). Au niveau de la membrane externe le seul facteur membranaire connu est un récepteur de 15 kDa trouvé chez *Leishmania*, mais dont l'identité n'a pas encore été établie (Adhya et al., 1997). Ce n'est que récemment qu'un complexe protéique appelé RIC (« RNA import complex ») comprenant des protéines de la chaîne respiratoire, impliqué dans le passage des ARNt à travers la membrane interne a été caractérisé chez *Leishmania* (Bhattacharyya et al., 2003).

En ce qui concerne les plantes, lorsque j'ai débuté cette étude, les données étaient très limitées. L'utilisation du système *in vitro* avait montré qu'un ou des récepteurs protéiques étaient impliqués dans l'importation des ARNt à la surface mitochondriale (Delage et al., 2003b) mais celui-ci ou ceux-ci devaient encore être déterminés. De plus, les protéines impliquées dans le transport des ARNt, à travers la membrane externe et à travers la membrane interne, devaient être identifiées. J'ai dans un premier temps abordé l'étude des protéines de la membrane externe impliquées dans l'importation des ARNt et

dans un deuxième temps nous avons initié la recherche des protéines candidates au niveau de la membrane interne.

1. Etude des protéines de la membrane externe

Avant mon arrivée au laboratoire, une approche biochimique a été initiée par Ludovic Delage afin d'identifier les protéines de la membrane externe pouvant interagir avec les ARNt. C'est ainsi que des expériences de northwestern faites avec les protéines de la membrane externe de mitochondries de pomme de terre ont révélé la présence d'une protéine de 34 kDa pouvant interagir avec les transcrits d'ARNt radiomarqués. Le séquençage en N-terminale de la protéine interagissant avec les ARNt a montré que cette protéine était la protéine « Voltage Dependent Anion Channel » ou VDAC. Il était a priori surprenant de trouver que cette protéine, connue jusqu'à présent pour être un canal permettant le passage de divers métabolites (Bay and Court, 2002), pouvait interagir avec les ARNt. Aussi, nous nous sommes intéressés plus en détail à cette protéine et nous avons étudié sa possible implication dans l'importation des ARNt cytosoliques dans la mitochondrie.

1.1 Etude du rôle de la protéine VDAC dans le transport des ARNt

Les données concernant cette étude à fait l'objet d'un second article qui est actuellement sous presse dans « Proceedings of the National Academy of Sciences, USA »

Article 2

Dans cet article, nous avons démontré par des études biochimiques et par l'utilisation du système d'importation *in vitro* mis au point au laboratoire, que la protéine « Voltage Dependent Anion Channel » (ou VDAC) connue jusqu'à maintenant pour être un transporteur de métabolites, est également impliquée dans le transport des ARNt à travers la membrane mitochondriale externe. De plus, nous avons montré que la fixation des ARNt sur la membrane externe ne se fait pas directement par VDAC mais plutôt par l'intermédiaire de TOM20 et TOM40, des protéines jusqu'alors caractérisées comme des composants du complexe TOM de la machinerie d'importation des protéines. Cependant, bien que les machineries d'importation des protéines et celle des ARNt dans la

mitochondrie utilisent des facteurs communs, nous avons pu montrer par des expériences de compétition *in vitro* que les deux voies de transport sont bien distinctes.

Ainsi, nos travaux nous ont permis de caractériser et d'identifier les premiers facteurs membranaires impliqués dans transport des ARNt à travers la membrane externe de la mitochondrie végétale.

ARTICLE 2

The Voltage-Dependent Anion Channel, a major component of the tRNA import machinery in plant mitochondria

Thalia Salinas, Anne-Marie Duchêne, Ludovic Delage, Stefan Nilsson, Elzbieta Glaser, Marlyse Zaepfel and Laurence Maréchal-Drouard.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Nov 28;103(48):18362-7

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

The voltage-dependent anion channel, a major component of the tRNA import machinery in plant mitochondria

Thalia Salinas, Anne-Marie Duchêne, Ludovic Delage, Stefan Nilsson, Elzbieta Glaser, Marlyse Zaepfel et Laurence Maréchal-Drouard

PNAS, 2006, Vol. 103, Pages 18362-18367

Pages 18362 à 18367 :

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.pnas.org/cgi/content/full/103/48/18362>

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

Les résultats présentés dans cet article soulèvent un certain nombre de questions. Certaines d'entre elles seront abordées plus en détail lors de la présentation du modèle (paragraphe 3 de ce chapitre). Par contre, plusieurs expériences supplémentaires réalisées dans le cadre de l'implication du complexe TOM et plus spécifiquement de TOM20 dans l'importation des ARNt, sont décrites ci-dessous.

1.2 Etude du rôle de la protéine TOM20

Lors de l'expérience de northwestern avec les protéines de la membrane externe mitochondriale de pomme de terre, seule l'interaction entre une protéine VDAC et les transcrits d'ARNt radiomarqués a pu être détectée. Or, les expériences d'importation *in vitro* en présence d'anticorps, ont montré que les protéines TOM20 et TOM40 participent à la fixation des ARNt au niveau de la surface mitochondriale. Bien que ces deux données semblent a priori contradictoires, il peut y avoir plusieurs explications à cela. Dans l'expérience de northwestern, les protéines sont d'abord dénaturées au moment de leur séparation par gel SDS-PAGE et sont ensuite renaturées sur membrane. Il est possible que les conditions utilisées dans notre protocole ne permettent pas une renaturation correcte des protéines TOM et de ce fait, l'interaction avec l'ARNt est impossible. D'autre part, la technique du northwestern est une technique peu sensible. Dans nos conditions, un minimum de 300 ng de protéines est nécessaire pour observer une interaction. Au niveau de la membrane externe, la protéine VDAC est au moins 50 fois plus abondante que la protéine TOM20. Lors de l'expérience de northwestern, 10 µg de protéines de la membrane externe ont été déposés sur gel. Sachant que les protéines VDAC représente 50 % des protéines de la membrane externe, dans les 10 µg de protéines on a 5 µg de VDAC. Comme nous venons de le voir, VDAC est 50 fois plus abondante que TOM20. Donc, dans les 10 µg de protéines, on a une centaine de ng de TOM20, ce qui est vraisemblablement insuffisant pour pouvoir observer une interaction par northwestern.

Afin d'examiner cette hypothèse, nous avons étudié l'interaction entre l'ARNt et des protéines TOM20 de plantes surexprimées chez *E. coli* et purifiées.

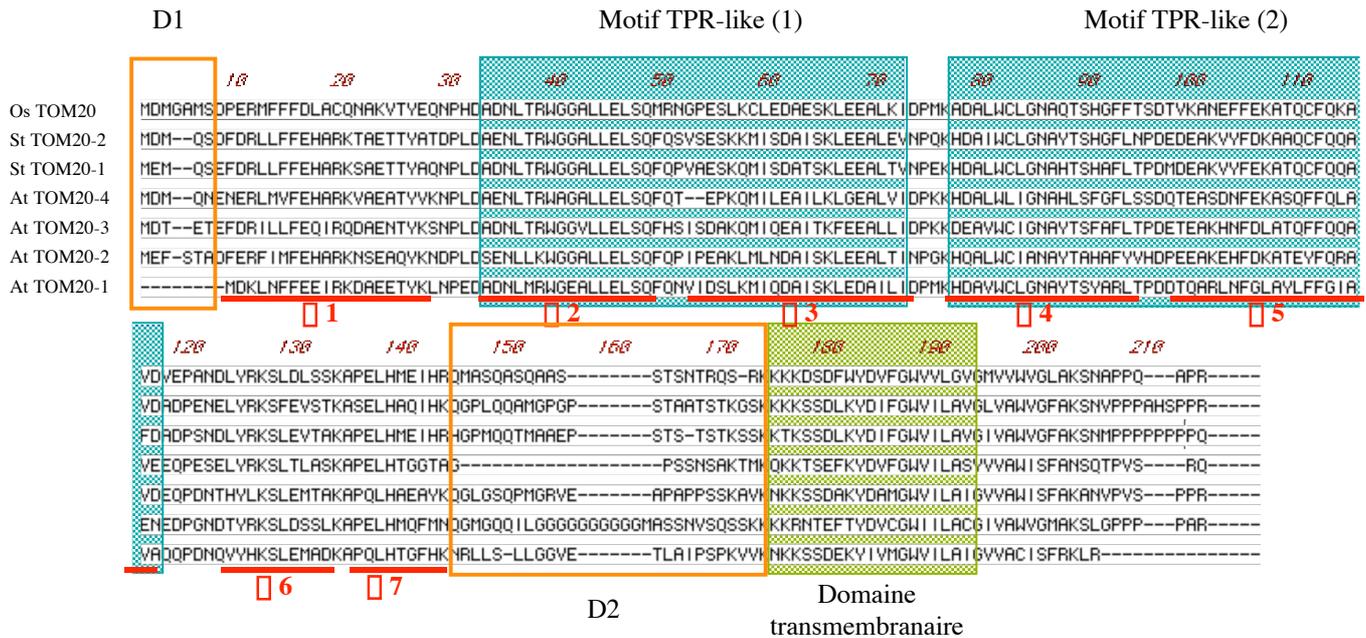


Figure 22 : Alignement des TOM20 de plante

Les séquences de TOM20 d’*A. thaliana* (At), de *S. tuberosum* (St) et d’*O. sativa* (Os) ont été alignées avec MacVector 7.2.3

Les motifs TPR-like sont sur fond bleu, le domaine transmembranaire est sur fond vert et les domaines non structurés (D1 et D2) sont encadrés en orange.

□1 à □7 : indiquent les hélices □ déterminées chez *AtTOM20-3* d’après (Perry et al., 2006).

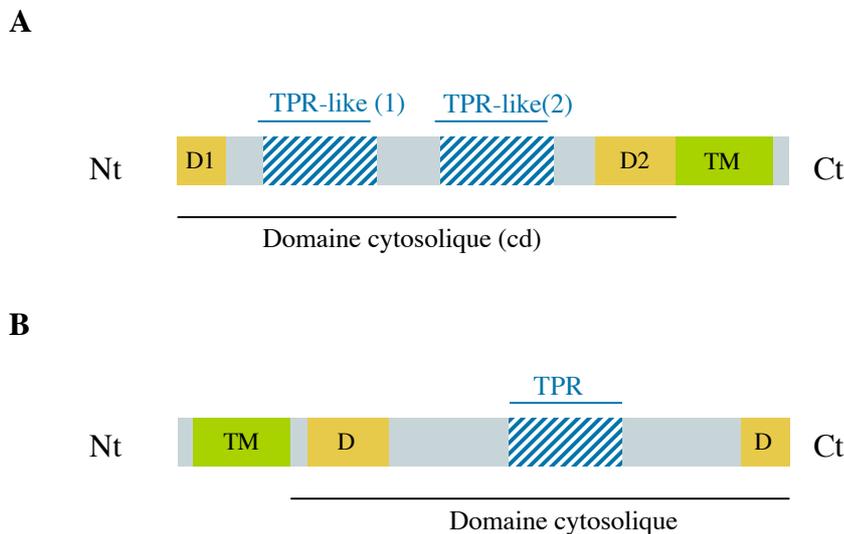


Figure 23 : Représentation schématique des protéines TOM20 de plantes (A), d’animaux et de levures (B) (d’après (Perry et al., 2006))

Différences structurales entre les protéines TOM20 de plante , d’animaux et de levures

Les domaines hachurés sont les domaines TPR

TM : domaine transmembranaire

D : domaines non structurés

1.2.1 Les protéines TOM20 de plantes

La protéine TOM20 est le récepteur du complexe TOM de la machinerie d'importation des protéines. Chez les plantes, plusieurs gènes codent pour différentes protéines TOM20. Chez *A. thaliana*, quatre protéines TOM20 ont été caractérisées : AtTOM20-1, AtTOM20-2, AtTOM20-3 et AtTOM20-4 (Werhahn et al., 2001). Chez la pomme de terre, il existe deux protéines TOM20 : StTOM20-1 et StTOM20-2. La première, StTOM20-1, a été caractérisée par (Heins and Schmitz, 1996) et la deuxième, StTOM20-2, a été identifiée lors de notre travail par l'intermédiaire de la banque d'EST « TIGR potato » (clone EST :TC128858 sur le site <http://www.tigr.org/tigr-scripts/tgi/>).

La comparaison de plusieurs séquences de TOM20 de plante montre que des domaines sont conservés (Perry et al., 2006) (Figure 22) :

- deux régions non structurées (D1 et D2) respectivement en N-terminale et C-terminale.
- deux régions hautement conservées, correspondant à deux motifs TPR-like. Le motif TPR (« Tetratricopeptide Repeat ») est un motif structural qui a été caractérisé comme étant responsable d'interactions protéine-protéine. Le motif TPR consiste en 34 acides aminés qui adoptent un arrangement hélice-boucle-hélice avec un angle entre les deux hélices de 24° (D'Andrea and Regan, 2003). Chez les TOM20 de plante, les motifs TPR-like sont atypiques par le fait qu'ils sont plus longs (43 et 44 acides aminés respectivement) mais ils gardent tout de même les caractéristiques structurales des motifs TPR (Heins and Schmitz, 1996; Perry et al., 2006)
- finalement une région trans-membranaire (TM) en C-terminale.

Il est à noter également que les travaux de Perry et col. (Perry et al., 2006) ont montré que les protéines TOM20 de plante et les protéines TOM20 de levure et de mammifères, bien que fonctionnellement équivalentes, ont évolué à partir de gènes distincts. Cette origine différente a été en particulier mise en évidence par les différences structurales observées entre les deux types de protéines (Figure 23).

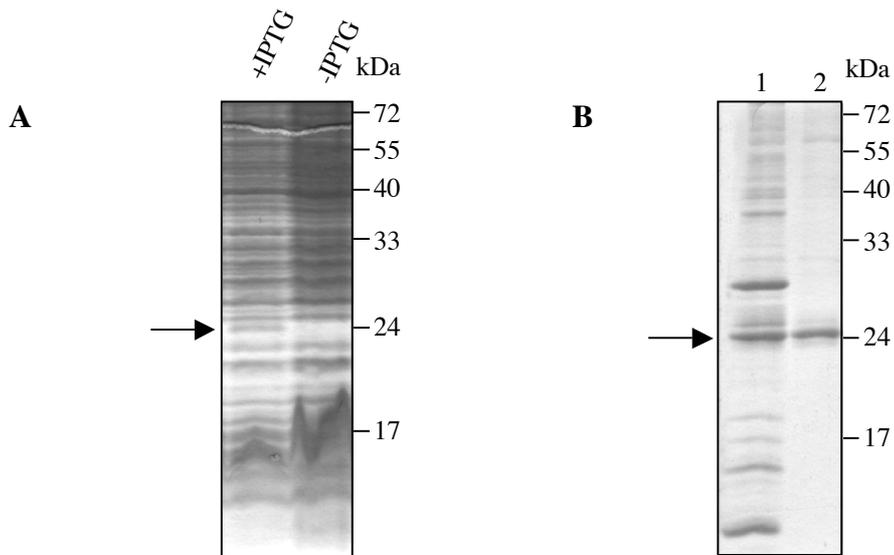


Figure 24 : Surexpression et purification de TOM20-1 de pomme de terre

A : Induction de l'expression de TOM20 en présence de 1 mM d'IPTG

B : Purification de TOM20-1.

1 : Première purification de TOM20-1 en condition dénaturantes (Imidazole 10 mM et NaCl 200 mM dans le tampon de lavage)

2 : Purification de TOM20-1 en conditions dénaturantes et plus stringentes (Imidazole 25 mM et NaCl 600 mM dans le tampon de lavage)

1.2.2 Surexpression de TOM20-1 de pomme de terre

Ce travail a été réalisé avec L. Faure et F. Sement (étudiants en DUT Génie biologique à l'IUT Louis Pasteur) dont j'ai participé à l'encadrement.

La protéine TOM20-1 de pomme de terre avait déjà été caractérisée (Heins and Schmitz, 1996) et c'est pour cette raison que nous choisissons d'analyser l'interaction des ARNt avec la protéine TOM20-1 de pomme de terre.

L'ADNc de la protéine TOM20-1 (n° d'accèsion X92491) (Heins and Schmitz, 1996) a été obtenu par RT-PCR grâce à des oligonucléotides spécifiques à partir d'ARN totaux extraits de pousses de pomme de terre puis cloné dans le vecteur pCRII-TOPO. Après vérification de la séquence, l'ADNc a été inséré dans le vecteur d'expression pQE60 qui permet d'ajouter une séquence codant pour six codons histidines en C-terminal de la protéine et de ce fait facilite sa purification. La protéine TOM20-1 a été surexprimée chez *E. coli* (Figure 24A) puis purifiée en conditions dénaturantes en présence de 8 M urée. Lors de cette purification, la protéine TOM20 surexprimée était copurifiée avec de nombreux contaminants dont certains se sont avérés pouvoir interagir avec les transcrits d'ARNt radiomarqués lors d'expériences de northwestern. Nous avons changé les conditions de purification en augmentant les concentrations en NaCl (de 200 mM à 600 mM) et en imidazole (10mM à 25 mM) des solutions utilisées pour le lavage de la colonne de nickel afin d'éliminer les contaminants. Toutefois, bien que la qualité de la purification ait été améliorée, la protéine TOM20-1 n'a pas été obtenue totalement pure (Figure 24B).

Récemment, dans les travaux de Perry et col. (Perry et al., 2006), des expériences de compétition d'importation de protéines ont été réalisées en utilisant comme compétiteur la partie cytosolique soluble de TOM20-3 d'*A. thaliana* surexprimée. En effet, comme l'indiquent les figures 22 et 23, les protéines TOM20 de plante possèdent un domaine transmembranaire dans sa partie C-terminale qui la rend insoluble. Le domaine cytosolique de TOM20-1 de pomme de terre d'environ 19 kDa a donc été cloné dans pQE60 et la protéine a été surexprimée. La protéine dcTOM20-1 (« dc » pour domaine cytosolique) étant soluble, la purification a été faite en conditions non dénaturantes (Figure 25). Pour l'obtention de la protéine dcTOM20-1, deux purifications successives ont été nécessaires. Lors de la première purification, plusieurs fractions ont été obtenues à des concentrations croissantes d'imidazole. La meilleure fraction a ensuite été utilisée pour effectuer la deuxième purification dans les mêmes conditions que la première. La fraction éluée à

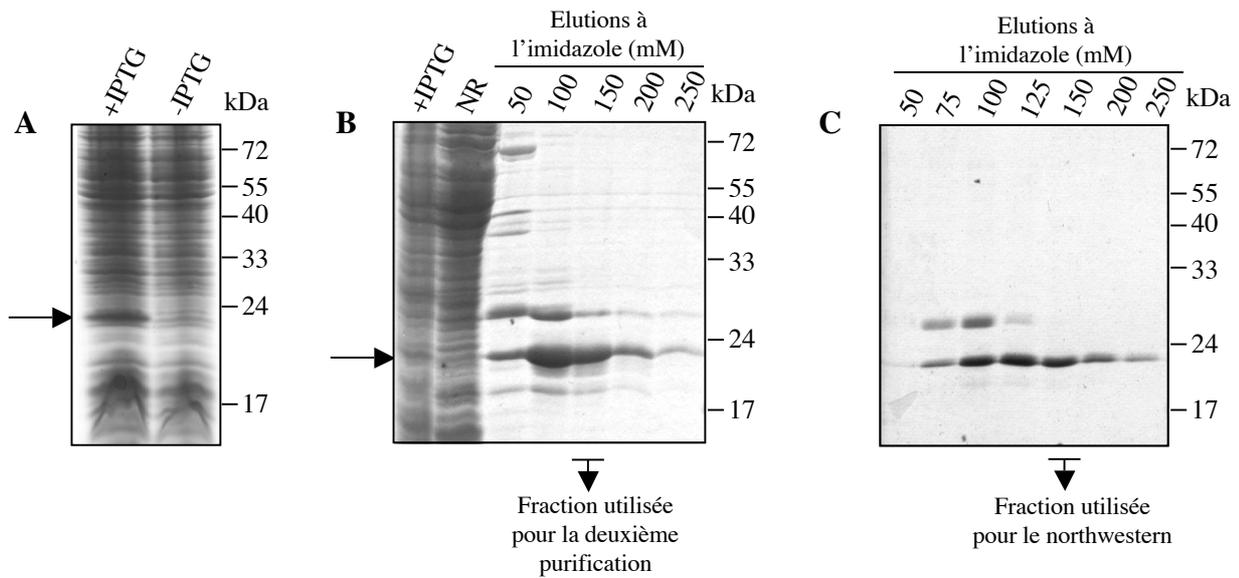


Figure 25 : Surexpression et purification de dcTOM20-1 de pomme de terre (domaine cytosolique).

A : Induction de l'expression de dcTOM20-1 en présence de 1 mM d'IPTG

B : Première purification de dcTOM20-1. La fraction (+IPTG) correspond à l'extrait bactérien contenant la protéine dcTOM20-1 surexprimée, la fraction (NR) correspond aux protéines non accrochées à la colonne de nickel. Les autres pistes correspondent aux différentes fractions d'élution à des concentrations d'imidazole croissantes.

C : Deuxième purification de dcTOM20 à partir de la fraction d'élution à 150 mM d'imidazole.

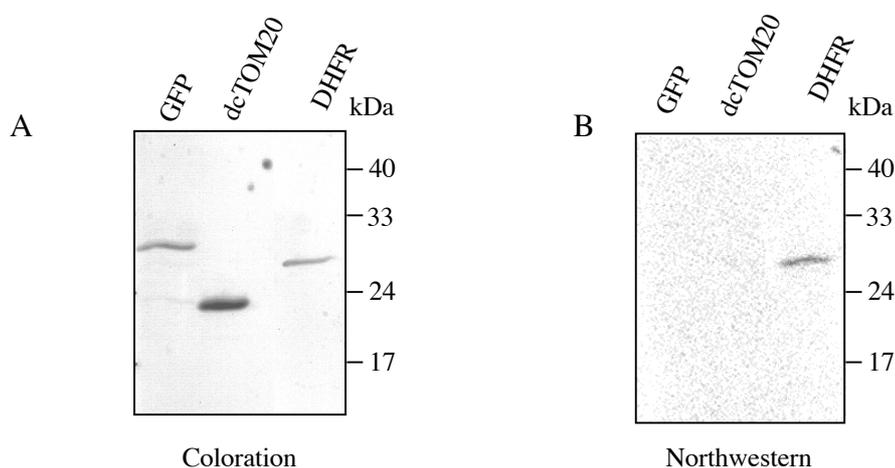


Figure 26 : Expérience de northwestern avec dcTOM20 de pomme de terre.

A : Coloration au bleu de coomassie de la membrane après transfert des protéines. Nous pouvons observer les trois protéines : (GFP) contrôle négatif, (DHFR) contrôle positif et (dcTOM20).

B : Expérience de northwestern.

150 mM d'imidazole a donné un rendement appréciable et une pureté correcte. Cette fraction a donc été utilisée pour les expériences ultérieures.

1.2.3 *Northwestern avec dcTOM20-1 de pomme de terre*

La technique de northwestern a été utilisée pour étudier l'interaction entre dcTOM20-1 et les transcrits d'ARNt. Pour cette expérience, nous avons utilisé 0,9 µg de dcTOM20-1. La protéine GFP (« Green Fluorescent Protein ») a été utilisée comme contrôle négatif et comme contrôle positif nous avons utilisé la protéine DHFR (dihydrofolate réductase) qui dans des expériences faites dans notre laboratoire ont montré qu'elle pouvait interagir avec les ARNt (Laurence Drouard, communication personnelle). Les protéines ont été séparées par SDS-PAGE et transférées sur une membrane d'immobilon-P (Figure 26A). Après l'étape de renaturation, la membrane a été mise en présence des transcrits d'ARNt radiomarqués.

La figure 26B, montre que la DHFR interagit avec les ARNt, par contre aucune interaction avec dcTOM20-1 n'a pu être visualisée. Ceci montre que la partie soluble de TOM20-1, même en quantité suffisante, n'interagit pas directement avec les transcrits d'ARNt dans les conditions que nous avons utilisées. Cependant nous ne pouvons exclure que l'absence d'interaction entre dcTOM20-1 et les transcrits d'ARNt observée par northwestern est due à une mauvaise renaturation de la protéine. En effet, des travaux ont montré que la protéine TOM20 de plante présente dans sa partie cytosolique sept hélices α antiparallèles. Quatre de ces hélices α forment deux motifs TPR-like importants pour les interactions (Perry et al., 2006) (Figure 22). Or il a été montré que les motifs TPR ont une structure tridimensionnelle bien définie, formés de deux hélices α antiparallèles et avec un angle inter-hélicoidale de 24° (D'Andrea and Regan, 2003; Main et al., 2003). De la même façon, il est possible que l'interaction de TOM20 avec les ARNt nécessite des motifs structuraux ayant une disposition précise, or ces repliements ont pu ne pas s'effectuer convenablement lors de l'expérience de northwestern.

1.2.4 *Gel-retard avec TOM20-3 d'A. thaliana*

Une expérience de gel-retard a été effectuée, pour étudier l'interaction entre la protéine TOM20 et l'ARNt en conditions non dénaturantes. Il s'est avéré que notre

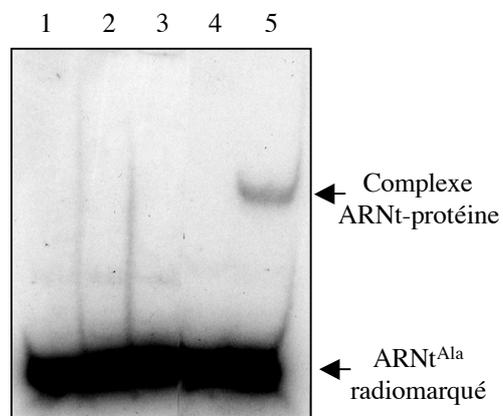


Figure 27 : Expérience de «gel-shift» avec dcTOM20-3 d'*A. thaliana*.

- 1 :** pas de protéines
- 2 :** 7 pmoles de TOM20-3 d'*A. thaliana*
- 3 :** 21 pmoles de TOM20-3 d'*A. thaliana*
- 4 :** 6 pmoles de GFP (contrôle négatif)
- 5 :** 4,5 pmoles de VDAC (contrôle positif)

protéine dcTOM20-1 de pomme de terre purifiée contenait certaines protéines bactériennes contaminantes qui comme nous l'avons dit précédemment pouvaient interagir avec les ARNt. Cette présence pouvant gêner l'interprétation des résultats, nous avons préféré utiliser la protéine dcTOM20-3 d'*A. thaliana* purifiée à homogénéité qui nous a été fournie par E. Glaser (Université de Stockholm, Suède) (Perry et al., 2006).

Pour l'expérience de gel-retard, nous avons utilisé les protéines GFP et VDAC comme contrôle négatif et positif respectivement. La figure 27 montre que VDAC est capable d'interagir avec les ARNt (comme indiqué sur la figure 1 de l'article 2) alors qu'aucun complexe protéine-ARNt n'est observé ni dans le cas de la protéine GFP, ni dans le cas de la protéine dcTOM20-3 d'*A. thaliana*. La protéine TOM20-3 d'*A. thaliana* ne semble donc pas non plus interagir avec les ARNt.

Ces expériences semblent indiquer que TOM20 seule ne puisse pas interagir avec les ARNt. Face à ces résultats, différentes interprétations sont possibles. Il est tout d'abord possible que l'interaction avec les ARNt ne se fasse pas de façon directe mais par l'intermédiaire d'un complexe protéique. En effet, nous avons aussi observé que les anticorps dirigés contre TOM40 inhibaient l'importation des ARNt *in vitro* (Figure 3B, article 2), il est donc possible que les protéines TOM20 et TOM40 fassent partie d'un complexe récepteur permettant la fixation des ARNt. Il est également intéressant de noter que la protéine TOM20 de plante possède deux motifs TPR contrairement aux protéines TOM20 de levure ou de mammifère qui n'en possèdent qu'un seul. Il a été montré chez la TOM20 de rat que le motif TPR faisait partie du site de fixation de la séquence d'adressage mitochondriale. Ainsi, il est facile d'imaginer que la présence d'un deuxième motif TPR permettrait aux protéines TOM20 de plante de reconnaître des protéines autres que les séquences d'adressage mitochondriales pour former un complexe protéique.

D'autre part il existe différentes isoformes de TOM20 chez les plantes et notamment chez *A. thaliana*. Il est possible d'envisager que les différentes formes de TOM20 aient des rôles biologiques spécifiques. En effet chez *Caenorhabditis elegans*, il existe deux TOM20 : TOM20(I) et TOM20(II) (Likic et al., 2005). La protéine TOM20(II) est essentielle. Par contre, la protéine TOM20(I) ne l'est pas. Cependant, la répression de son expression provoque un retard de croissance chez l'animal. Cette différence de phénotype, suggère que ces deux protéines jouent des rôles différents (Likic et al., 2005). De la même façon, nous pouvons supposer que les isoformes de TOM20 de plante possèdent différentes fonctions et l'une d'entre elles pourrait jouer un rôle plus spécifique dans la fixation des

ARNt, soit d'une façon directe ou soit par l'intermédiaire d'une autre protéine pouvant interagir avec les ARNt.

Pour l'instant nous ne disposons pas suffisamment d'informations pour comprendre comment se fait la fixation des ARNt au niveau de la surface mitochondriale. Des études futures seront nécessaires pour mieux appréhender ce mécanisme.

Par exemple, il serait intéressant de vérifier si les autres protéines TOM20 (TOM20-1, TOM20-2 et TOM20-4 d'*A. thaliana* et TOM20-2 de pomme de terre) peuvent interagir ou non avec les ARNt. Il faudrait également analyser l'interaction de TOM40 avec les ARNt afin de savoir si cette protéine a un rôle direct ou indirect dans la fixation des ARNt au niveau de la surface mitochondriale. D'autre part, des expériences de co-immunoprécipitation, de double-hybride ou de split-ubiquitine (Obrdlik et al., 2004)) avec les trois protéines qui ont été caractérisées c'est-à-dire TOM20, TOM40 et VDAC pourraient être effectués. Ceci permettra de vérifier si ces protéines interagissent entre elles et de rechercher d'autres protéines partenaires impliquées dans le mécanisme d'importation des ARNt au niveau de la membrane externe.

2. Protéines de la membrane interne

Chez *S. cerevisiae*, des études *in vivo* et *in vitro* ont montré que la protéine TIM44 du complexe TIM de la machinerie d'importation des protéines était indispensable pour le transport de l'ARNt^{Lys} au niveau de la membrane interne des mitochondries (Tarassov et al., 1995a). Chez les trypanosomes, ce sont surtout des travaux sur *Leishmania tropica* qui ont montré qu'un complexe appelé « RIC » était impliqué dans l'importation des ARNt à travers la membrane (Bhattacharyya et al., 2003). De façon surprenante, deux sous-unités de ce complexe « RIC », RIC1 et RIC8, sont des homologues des protéines de la chaîne respiratoire mitochondriale. RIC1 est l'homologue structurale de la sous-unité α de l'ATP synthase (Goswami et al., 2006) et RIC8 est l'homologue de la sous unité 6b de l'ubiquinol cytochrome *c* réductase (Chatterjee et al., 2006). Chez les plantes, au moment de mon arrivée au laboratoire, des expériences de northwestern réalisées avec des protéines mitochondriales de pomme de terre, avaient révélé que le transporteur ADP/ATP (ANT) pouvait interagir avec des ARNt et de l'ADN (Delage, 2001). Toutefois, l'implication de cette protéine dans le mécanisme d'importation des ARNt n'avait pas été démontrée.

L'ensemble travaux que j'ai effectué avaient essentiellement pour but d'étudier le transport des ARNt au niveau de la membrane externe. Cependant certaines des

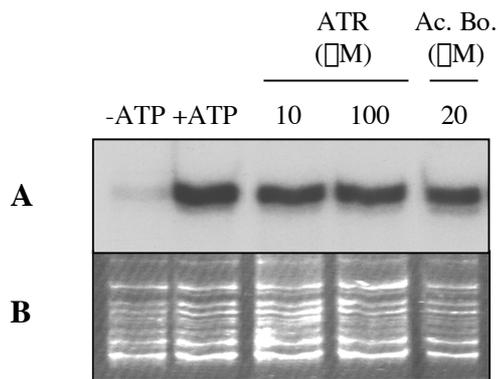


Figure 28 : Effet de l'atractyloside et de l'acide bongkrékrique sur l'importation *in vitro* des transcrits d'ARNt^{Ala} radiomarqués.

A : Autoradiographie du gel

B : Coloration du gel au BET

ATR : atractyloside

Ac.Bo. : acide bongkrékrique

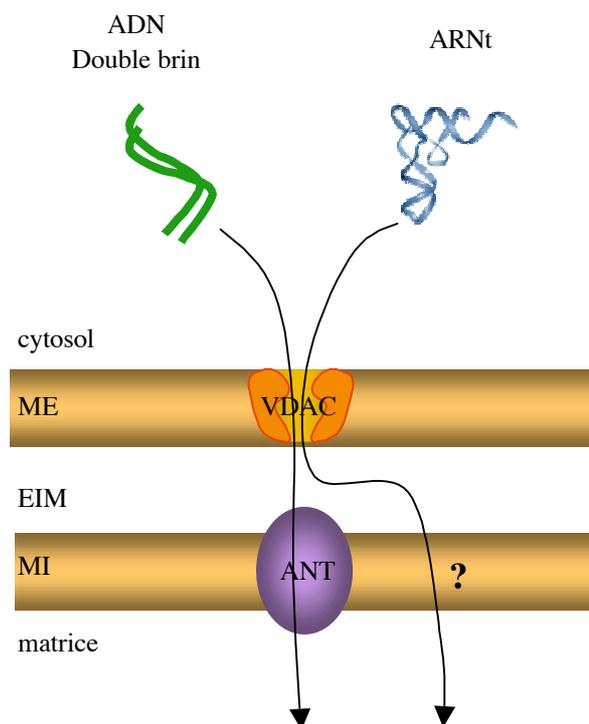


Figure 29 : Importation des acides nucléiques dans la mitochondrie

Bien que l'ADN et l'ARNt passent par la VDAC au niveau de la membrane externe, il semble qu'il n'utilisent pas la même voie au niveau de la membrane interne.

expériences réalisées, nous ont aussi fourni des informations quant à l'implication ou non de certaines protéines de la membrane interne dans ce processus.

2.1 Transporteur ADP/ATP ou ANT

Le transporteur d'ADP/ATP (ANT) est la protéine la plus abondante au niveau de la membrane interne de la mitochondrie. Cette protéine permet l'échange équimoléculaire entre l'ATP qui se trouve au niveau de la matrice et l'ADP qui se trouve au niveau de l'espace intermembranaire.

Nous nous sommes intéressés à cette protéine pour deux raisons. D'une part, comme nous l'avons dit ci-dessus, des expériences de northwestern, avaient déjà montré que l'ANT pouvait interagir *in vitro* avec les transcrits d'ARNt^{Ala} radiomarqués (Delage, 2001). D'autre part, des études faites à la suite ont montré que de l'ADN linéaire double brin pouvait être importé dans la mitochondrie de plante et que cette importation se faisait via un canal impliquant la protéine VDAC au niveau de la membrane externe et l'ANT au niveau de la membrane interne (Koulintchenko et al., 2003). Le passage des ARNt au niveau de la membrane externe se faisant par la protéine VDAC, nous avons donc voulu savoir si le mécanisme d'importation des ARNt et celui de l'ADN était le même au niveau de la membrane interne.

Dans les travaux de (Koulintchenko et al., 2003) deux inhibiteurs de l'ANT ont été utilisés lors des expériences d'importation d'ADN *in vitro* : l'atractyloside et l'acide bongkrékrique. L'atractyloside qui agit du côté de l'espace intermembranaire, abolit l'importation de l'ADN à une concentration finale de 10 μ M. Par contre, l'acide bongkrékrique qui agit du côté matriciel stimule l'importation de l'ADN à une concentration finale de 20 μ M.

Nous avons donc testé l'effet de ces deux produits sur l'importation des ARNt. La figure 28, montre que ni l'atractyloside, ni l'acide bongkrékrique n'ont un effet sur l'importation des ARNt. Ceci suggère que l'ANT n'est pas impliqué dans l'importation des ARNt dans les mitochondries (Figure 29). D'autres expériences devront être tout de même nécessaire pour confirmer ces résultats. Des expériences de compétition en présence d'ADP, substrat naturel de l'ANT, permettront de vérifier si l'importation des ARNt est inhibée comme cela a été démontré pour l'importation de l'ADN. Cette étude pourra être complétée par des expériences d'importation *in vitro* avec des mitoplastes (matrice et

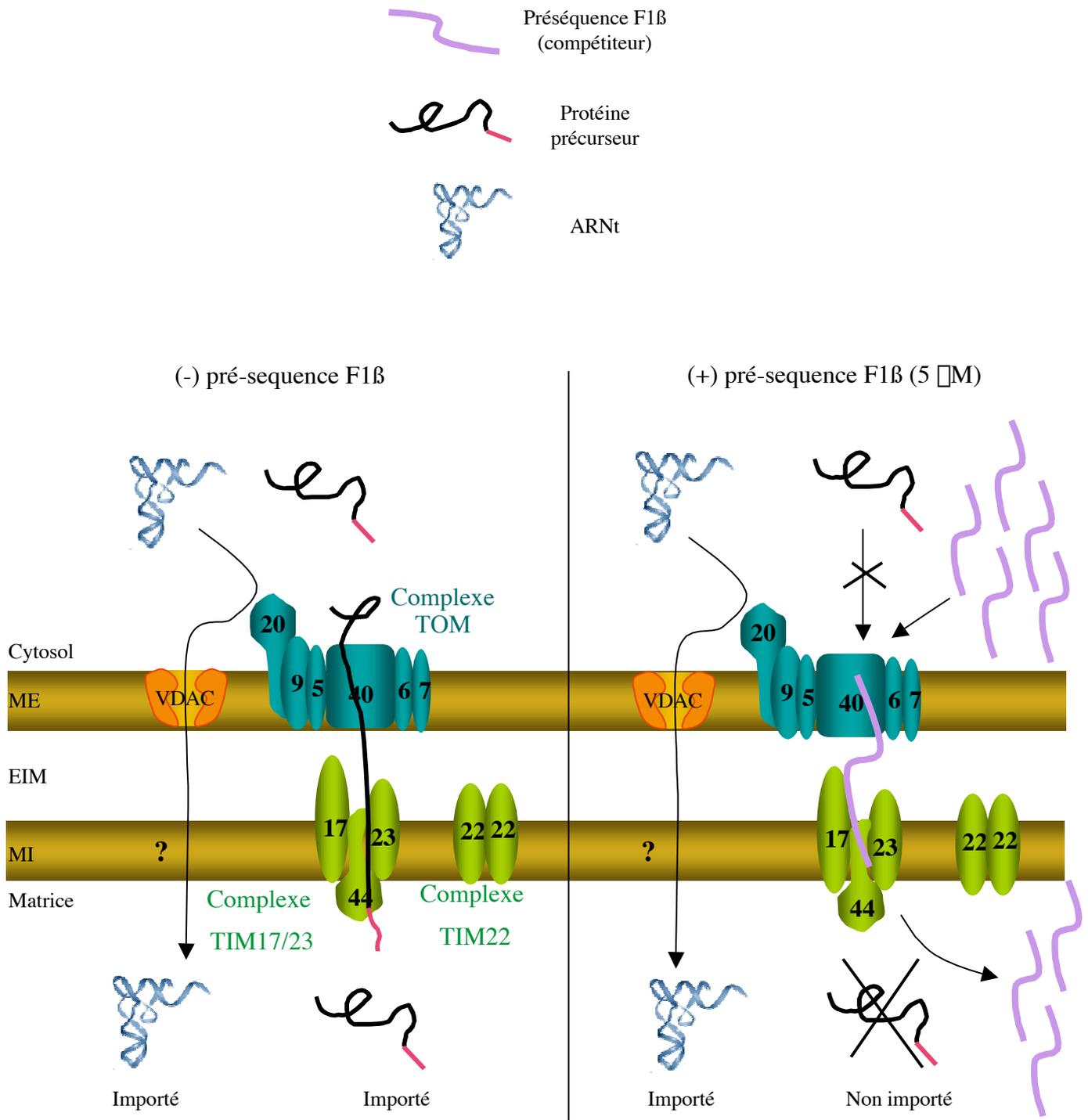


Figure 30 : Schéma de l'expérience de compétition d'importation des ARNt et des protéines précurseur en présence du compétiteur, la pré-séquence F1β.

membrane interne intacte) en présence d'anticorps dirigés contre l'ANT afin de voir si l'importation des ARNt est affectée

2.2 Complexe TIM

Au niveau de la membrane interne il existe deux complexes TIM : le complexe TIM17/23 qui permet le passage des protéines précurseur d'importation à travers la membrane interne et le complexe TIM22 qui permet l'incorporation des protéines de la membrane interne dans la membrane (Figure 30).

Au cours de notre étude dans l'article 2, nous avons mis en évidence que les protéines du complexe TOM participaient à la fixation des ARNt. Nous nous sommes donc demandé si les protéines et les ARNt étaient importés par la même voie ou par deux voies différentes. Afin de répondre à cette question des expériences de compétition *in vitro* ont été réalisées. Pour ces expériences, nous avons utilisé la préséquence F1 β (la pré-séquence de la sous unité β de la partie F1 de l'ATP synthase de *Nicotiana*) qui est aussi un bon compétiteur pour l'importation des protéines (Moberg et al., 2004). Ainsi nous avons testé l'effet de cette pré-séquence sur l'importation des protéines et sur l'importation des ARNt. Dans notre expérience, cette pré-séquence F1 β inhibe efficacement l'importation des protéines à 5 μ M alors que l'importation des ARNt n'est pas modifiée (Figure 4 dans l'Article 2 et figure 30 dans cette partie) . Ceci montre qu'en effet les ARNt et les protéines passent par des voies différentes. Cette expérience suggère également que les ARNt ne passent pas par le canal du complexe TIM17/23. En effet, des études faites sur l'importation des protéines en présence de cette pré-séquence ont montré que la compétition ne se faisait pas lors de l'étape de fixation mais plutôt dans des étapes ultérieures. De plus, les travaux de (Dekker et al., 1997) chez *S. cerevisiae* montrent que la mitochondrie possède davantage de complexes TOM que de complexes TIM17/23. Ces travaux indiquent en effet que seul 25% des complexes TOM participent au transport des protéines précurseur et que le transport de ces protéines est limité par le nombre de complexes TIM17/23. Donc si les ARNt passaient par le canal TIM17/23 alors leur importation serait inhibée vraisemblablement en présence de 5 μ M de la pré-séquence F1 β , ce qui n'est pas le cas. Il semble donc que le canal du complexe TIM17/23 n'est pas impliqué dans l'importation des ARNt au niveau de la membrane interne. Toutefois, nous n'excluons pas la possibilité que des protéines de ce complexe, comme cela a été montré pour le complexe TOM, soient impliquées dans le mécanisme d'importation des ARNt.

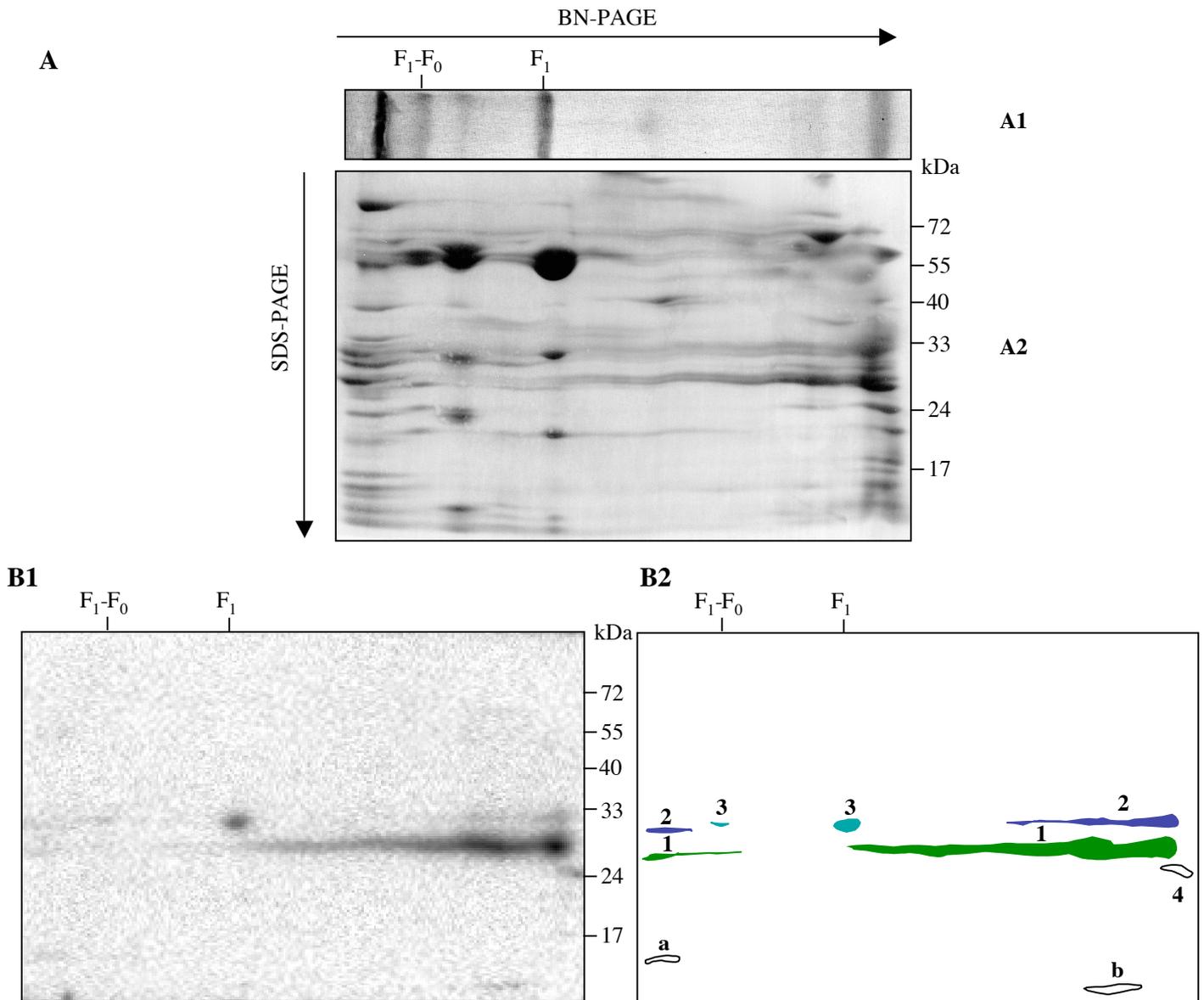


Figure 31 : Expérience de northwestern sur des protéines séparées par BN-PAGE/SDS-PAGE.

Les protéines mitochondriales ont été solubilisées avec du n-dodecyl- β -D-maltoside et ont été analysées sur un gel bidimensionnel BN-PAGE (première dimension) (A1) et SDS-PAGE (deuxième dimension) (A2).

A : Coloration des protéines au bleu de coomassie après transfert sur membrane

B1 : Expériences de Northwestern

B2 : Le dessin indique les spots d'interaction. 1, 2, 3, et 4 indiquent les spots d'interaction majeurs.

Les spots 1 et 2 ont été identifiés par des expériences de western. Ils correspondent respectivement à la protéine ANT et à la protéine VDAC.

Une expérience de western avec des anticorps contre la sous-unité β de l'ATPsynthase a permis d'identifier le complexe F₁-F₀ et le sous-complexe F₁. La comparaison des travaux faits par (Heazlewood et al., 2003) avec nos résultats a permis d'identifier le spot 3 comme étant la sous-unité β de l'ATPsynthase.

Le spot 4 ainsi que les spots plus faibles n'ont pas été identifiés.

2.3 Sous-unité gamma de l'ATP synthase

Nous avons choisi de rechercher d'autres protéines capables d'interagir avec les ARNt, mais cette fois-ci en nous focalisant sur les protéines mitochondriales appartenant à des complexes. Pour cela, nous avons réalisé une expérience de northwestern sur des protéines séparées par un gel bidimensionnel (BN-PAGE/SDS-PAGE) (Schagger and von Jagow, 1991). Dans la première dimension (BN-PAGE), en conditions non dénaturantes, les complexes protéiques (membranaire et solubles) sont séparés et dans la deuxième dimension (SDS-PAGE), en conditions dénaturantes, les protéines qui constituent les complexes sont séparées en fonction de leur poids moléculaire. Pour réaliser cette expérience, les complexes membranaires ont été solubilisés à partir de mitochondries purifiées en présence de n-dodecyl- β -maltoside, un détergent doux non ionique.

Après la deuxième dimension, les protéines ont été transférées sur membrane immobilon-P (Figure 31A). Les protéines ont été renaturées et mises en présence de transcrits d'ARNt radiomarqués. La figure 31B1 correspond à l'expérience de northwestern et sur la figure 31B2 sont schématisées les différents « spots » radioactifs observés. Ainsi, quatre « spots » d'interaction majeurs (1, 2, 3 et 4) et certaines plus faibles dont (a et b) font partie.

Pour l'instant seuls trois des six spots ont pu être identifiés. Des expériences de western ont permis d'identifier les spots (1) et (2) qui correspondent aux protéines ANT et VDAC respectivement. Il est important de noter que les protéines de la membrane externe ne représentent que 7 % des protéines mitochondriales totales (Bligny and Douce, 1980). Ceci implique que les protéines analysées sont les protéines de la membrane interne. La seule protéine visible de la membrane externe est la VDAC qui est la protéine majoritaire de la membrane externe.

Des anticorps dirigés contre la sous-unité β de F1 ATP synthase ont permis d'identifier par western blot le complexe F1-F0 ATP synthase et le sous-complexe F1 ATP synthase (Figure 31A). La comparaison du profil de notre gel avec celui des travaux de (Heazlewood et al., 2003), suggère fortement que le spot (3) correspond à la sous-unité γ de l'ATP synthase. Ceci devra être confirmé d'une part par le séquençage de la protéine par MS/MS et d'autre part en clonant le cDNA, surexprimant la protéine pour étudier son interaction avec les ARNt.

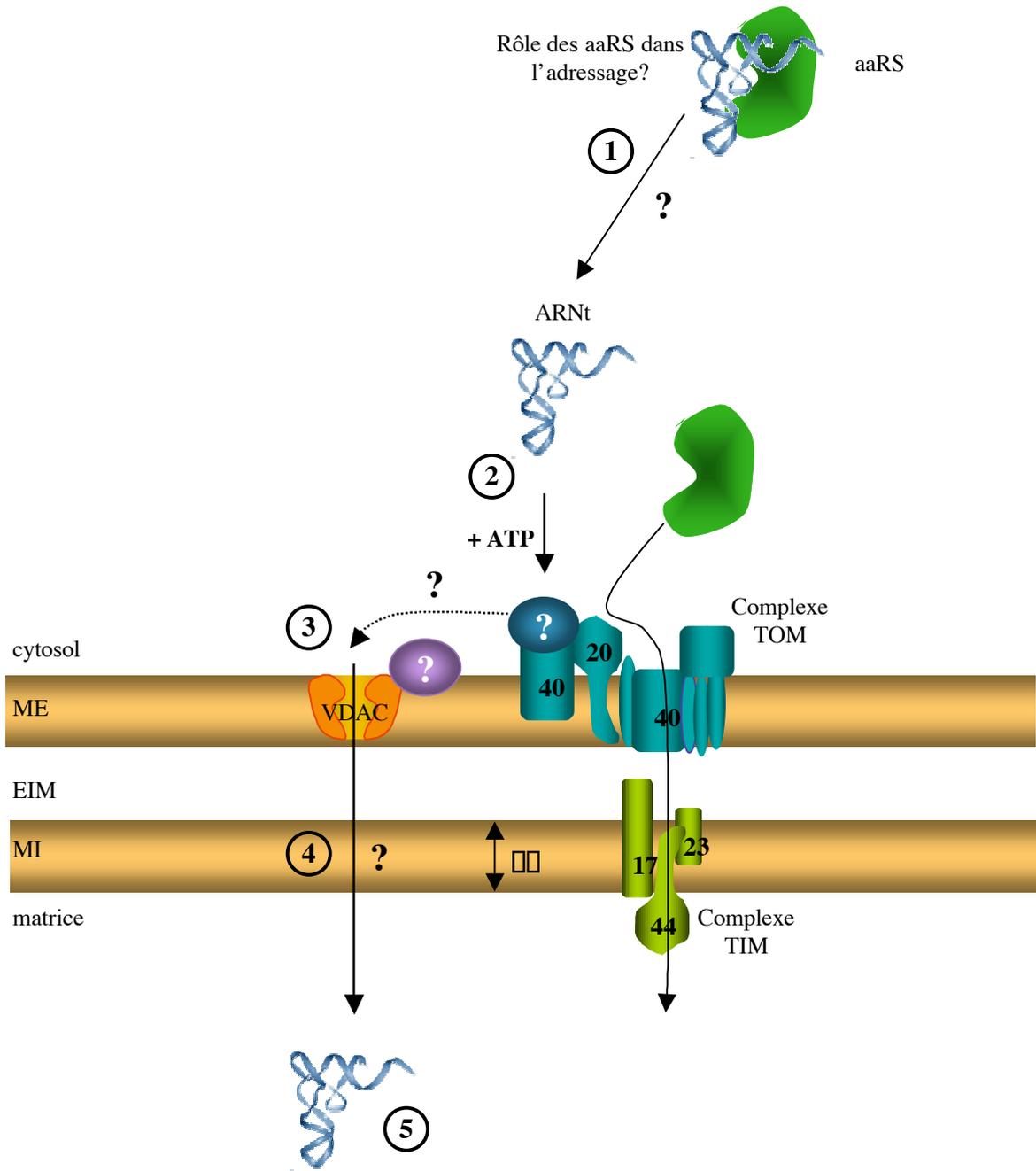


Figure 32 : Importation des ARNt dans les mitochondries de plantes

□□ : potentiel membranaire

Ce résultat est d'autant plus intéressant que chez *Leishmania* ce sont des protéines de la chaîne respiratoire, homologues des sous-unités du complexe III et du complexe V qui sont impliqués dans l'importation des ARNt. Toutefois il faut considérer cette information avec précaution. En effet, la sous-unité γ se trouve au cœur du complexe de l'ATP synthase, à la jonction de F1 et F0 (Papa et al., 2000). Comment l'ARNt pourrait-il accéder à cette protéine ? Il est possible que cette protéine tout en étant présente dans ce complexe ATP synthase soit aussi présente dans un autre complexe liant l'ARNt. Ceci est par exemple le cas de la sous-unité α de l'ATP synthase de *Leishmania* qui est aussi présente dans le complexe RIC « RNA Import Complex » (Goswami and Adhya, 2006). Des travaux seront donc initiés afin de confirmer ce premier résultat et s'ils s'avèrent encourageants nous pourrions commencer à étudier son rôle en tant que protéine liant l'ARN et son implication éventuelle dans l'importation des ARNt dans la mitochondrie végétale.

3. Modèle proposé

A la vue de nos observations, un modèle peut être proposé pour le transport des ARNt à travers les membranes mitochondriales de plante (Figure 32).

3.1 Adressage des ARNt aux mitochondries ①

Les ARNt cytosoliques sont synthétisés dans le noyau, exportés dans le cytosol puis adressés aux mitochondries. Les ARNt ne sont jamais libres dans la cellule mais toujours associés à une protéine (théorie du « channeling »). Nous avons vu dans le chapitre I, que cette étape d'adressage pourrait être responsable de la spécificité de l'importation des ARNt. A l'heure actuelle, les principales protéines candidates pour exercer une sélectivité au niveau de l'importation sont les aminoacyl-ARNt synthétases. D'une part, ce sont les seules protéines connues capables de différencier les différents ARNt. D'autre part, il a été montré *in vivo*, qu'il existe une corrélation entre aminoacylation et importation. Toutefois, ceci n'exclut pas l'implication d'autres protéines à cette étape.

3.2 Interaction des ARNt avec le récepteur de la membrane externe ②

Au niveau de la surface mitochondriale, il existe un récepteur capable de fixer les ARNt. Nos résultats semblent indiquer que ce récepteur semble impliquer plusieurs protéines dont au moins les protéines TOM20 et TOM40 du complexe TOM d'importation des protéines. Il est intéressant de noter que les travaux de (Dekker et al., 1997) chez la levure *S. cerevisiae* indiquent que seul 25% des complexes TOM participent au transport des protéines. Le reste de complexes TOM sont disponibles pour participer à la fixation des ARNt sans gêner l'importation des protéines. Nos études faites sur l'interaction de TOM20 avec les ARNt, semblent indiquer que la fixation ne se fait pas directement avec l'ARNt mais plutôt par l'intermédiaire d'une autre protéine. Pour l'instant nous ne savons pas si TOM40 peut interagir avec les ARNt. Des études futures permettront d'une part de connaître le rôle exact de TOM40 mais également d'identifier d'autres protéines participant au complexe de fixation de l'ARNt.

Les expériences d'importation *in vitro* ont montré que la fixation des ARNt au niveau de la surface mitochondriale était ATP dépendante. Le rôle de cet ATP nous est inconnu. Nous pouvons simplement supposer que pour la fixation et pour le passage à travers les membranes mitochondriales, l'ARNt requiert une dénaturation au moins partielle de sa structure en « L » qui nécessiterait une action ATP dépendante. Ceci pourrait se faire par l'action d'hélicases ou de chaperones, connues pour avoir besoin d'ATP pour leur activité.

3.3 Passage des ARNt à travers la membrane externe ③

3.3.1 La protéine VDAC

Nous avons montré par des expériences d'importation *in vitro* soit en présence d'anticorps dirigés contre VDAC soit en présence d'un agents chimique bloquant VDAC que cette protéine était impliquée dans le transport des ARNt à travers la membrane externe. Ainsi, la protéine VDAC qui forme un pore au niveau de la membrane externe permettrait le passage des ARNt du cytosol vers l'espace intermembranaire.

Des études faites sur VDAC ont montré qu'elle pouvait être associé à des protéines soit du côté cytosolique, soit du côté de l'espace intermembranaire et que certaines de ces protéines auraient une fonction régulatrice sur le pore (Holden and Colombini, 1993; Liu et

al., 1994). Il serait donc intéressant de vérifier d'une part si des protéines sont associées à VDAC et d'autre part de savoir si ces protéines sont impliquées dans le transport des ARNt. Des expériences de « split-ubiquitine » qui est une méthode de type double-hybride, mais spécialement adaptée à la détection d'interactions avec des protéines membranaires pourraient être réalisées.

3.3.2 *Du récepteur à VDAC*

Le passage entre le complexe récepteur et la protéine VDAC implique soit que VDAC et le récepteur sont à proximité l'un de l'autre, soit qu'il existe une protéine qui permette le transfert de l'un à l'autre. Pour l'instant nous ne savons pas si la protéine VDAC se trouve associée ou pas aux protéines TOM20 ou TOM40. Des expériences d'immunoprécipitation en utilisant la VDAC ou les protéines TOM comme appât permettront probablement de répondre à cette question.

3.3.3 *Spécificité de la protéine VDAC*

La protéine VDAC interagit fortement *in vitro* avec les ARNt lors d'expériences de northwestern et de gel retard (Article 2). A ce jour il n'existe aucune indication permettant de comprendre comment cette protéine peut interagir avec les ARNt. L'interaction n'est toutefois pas spécifique des ARNt cytosoliques importés puisque des ARNt importés et non importés sont capables d'interagir tout aussi efficacement avec VDAC. De plus, des études faites, par L. Delage ont montré que VDAC pouvait également interagir avec de l'ADN double brin (Delage, 2001) et les travaux réalisés par Koulintchenko et *col.* ont montré que l'importation d'ADN double brin dans la mitochondrie de plante se faisait aussi via la protéine VDAC (Koulintchenko et al., 2003).

Afin de mieux comprendre la nature de l'interaction entre VDAC et les ARNt, une étude a été initiée (chapitre III).

3.3.4 Structure des ARNt lors du passage à travers les membranes

Une autre interrogation à laquelle nous voudrions également répondre est de savoir comment l'ARNt passe à travers le canal formé par VDAC. En effet, le diamètre de VDAC est de 2 à 4 nm (Mannella et al., 1992) et permet le passage de métabolites tels que l'ATP ou le NADH. Il a été également démontré avec des membranes bilipidiques reconstituées contenant la protéine VDAC purifiée, qu'elle pouvait permettre le passage de l'ADN double brin (Szabo et al., 1998). Cependant, l'encombrement d'un ARNt est plus important à cause de sa structure en « L », et la question se pose de savoir si l'ARNt est dénaturé lors de son passage à travers les membranes mitochondriales. Pour répondre à cette question nous voulons faire des expériences d'importation *in vitro* permettant de déterminer si l'ARNt est importé de façon structurée ou non. Pour cela, deux parties d'un ARNt seront synthétisées séparément *in vitro* et seront ensuite hybridés pour former un ARNt capable de former une structure tridimensionnelle correcte mais contenant une brèche. Cet ARNt reconstitué sera utilisé pour des expériences d'importation *in vitro*. Ainsi, si l'ARNt entier est importé cela signifiera que l'ARNt n'est pas dénaturé. Par contre si les deux fragments sont retrouvés à l'intérieur de la mitochondrie, l'ARNt aura été dénaturé au cours de son passage à travers les membranes mitochondriales.

3.4 Passage des ARNt à travers la membrane interne ④

Nous n'avons pas encore identifié les protéines intervenant au niveau de la membrane interne. Toutefois, l'expérience de compétition *in vitro* suggère que les ARNt n'utilisent pas le canal d'importation des protéines TIM17/23. En ce qui concerne l'ANT bien qu'elle puisse interagir avec les ARNt, nos premiers résultats semblent indiquer qu'elle n'est pas impliquée dans l'importation des ARNt au niveau de la membrane interne. Nous avons également identifié la sous-unité γ de l'ATP synthase comme pouvant interagir avec les ARNt mais des études devront être faites avant de pouvoir avancer un rôle possible de cette protéine dans le transport des ARNt.

3.5 *Au niveau de la mitochondrie* ⑤

Afin d'expliquer la sélectivité d'importation chez les plantes, une des hypothèses proposées (chapitre I) est que le contrôle se fasse à l'intérieur de la mitochondrie. Dans cette hypothèse, l'ensemble des ARNt cytosoliques seraient capables d'entrer dans la mitochondrie. Il existerait ainsi une sorte de compétition entre les ARNt endogènes et les ARNt cytosoliques importés codant pour un même codon. Les ARNt mitochondriaux étant préférentiellement utilisés pour la machinerie traductionnelle mitochondriale, les ARNt importés seraient alors dégradés.

CHAPITRE III

Etude de l'interaction de la protéine VDAC de pomme de terre avec l'ARNt

Comme nous l'avons vu dans le chapitre II, les travaux de thèse de L. Delage avaient montré qu'au niveau de la membrane externe de la mitochondrie de pomme de terre, la protéine VDAC ayant une taille apparente de 34 kDa était capable d'interagir avec les ARNt. Or, il existe plusieurs VDAC dans chaque organisme. En parallèle des études montrant l'implication de protéines VDAC dans le transport des ARNt (cf. article 2), nous avons également souhaité comprendre comment la protéine VDAC de 34 kDa qui n'a aucun motif connu de liaison aux ARN dans sa séquence pouvait interagir avec les ARNt. Ainsi des études ont été initiées afin d'identifier le ou les domaines importants de cette protéine pour l'interaction avec les ARNt.

1. Les protéines VDAC

1.1 Caractéristiques des protéines VDAC

Les protéines VDAC également connues sous le nom de porines mitochondriales, sont présentes chez l'ensemble des eucaryotes (Zalman et al., 1980). Elles ont une structure en tonneau β similaire à celles des porines bactériennes et forment un pore d'environ 3 nm (Colombini, 1989). Elles constituent le principal canal de diffusion de métabolites et de nucléotides à travers la membrane externe de la mitochondrie. Mais elles sont également impliquées dans d'autres fonctions telles que la compartimentation (Adams et al., 1991), la fixation du cytosquelette (Linden and Karlsson, 1996), la fixation d'enzymes (Blachly-Dyson et al., 1993), l'apoptose (Zamzami and Kroemer, 2001; Rostovtseva et al., 2004) et l'importation d'ADN chez les plantes (Koulintchenko et al., 2003).

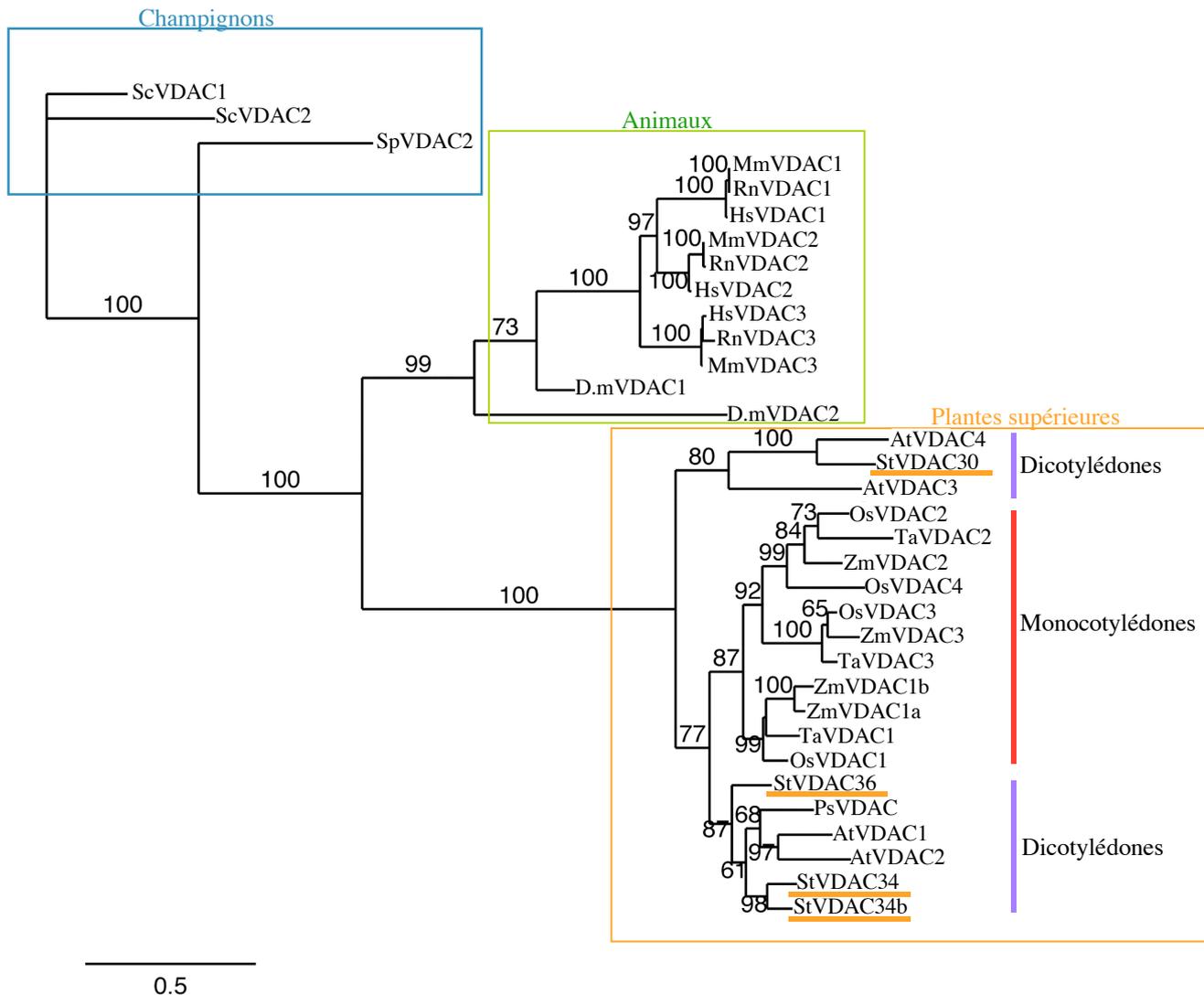


Figure 33 : Arbre phylogénétique non raciné construit par la méthode de PhyML

Les alignements des séquences des protéines VDAC ont été réalisées avec le logiciel ClustalX-1.83.1 (Thompson et al, 1997). Une analyse phylogénétique a ensuite été réalisée avec le logiciel PhyML (Guindon et al, 2003). Les arbres obtenus ont été dessinés avec le logiciel Treedyn (Chevenet et al, 2006). La robustesse des branches a été testée par la méthode des bootstraps (le nombre de bootstrap réalisé est de 100). Seules les valeurs de bootstrap supérieures à 50 (sur 100 réplifications) ont été indiquées. La barre horizontales indique la distance d'évolution (nombre de substitution d'acides-aminés par site). Cet arbre a été construit avec l'aide de Valérie Cognat (Plateforme bioinformatique, IBMP)

Les protéines VDAC de pomme de terre sont soulignées en orange.

Saccharomyces Cerevisiae (Sc) {1: NP_014343.1; 2: NP_012152.1}, *Schizosaccharomyces pombe* (Sp) {NP_594661.1}, *Drosophila melanogaster* (Dm) {1: NP_476813.1; 2: NP_609462.1}, *Homo sapiens* (Hs) {1:NP_003365.1 ; 2:NP_003366.2 ; 3:NP_005653.3}, *Mus musculus* (Mm) {1:NP_035824.1 ; 2:NP_035825.1 ; 3:NP_035826.1}, *Rattus norvegicus* (Rn) {1:NP_112643.1 ; 2:NP_112644.1 ; 3: NP_112645.1}, *Arabidopsis thaliana* (At) {1:NP_186777.1 ; 2:NP_197013.1 ; 3: NP_200557.1; 4:NP_201551.1}, *Oryza sativa* (Os) {1:NP_001062983.1 ; 2:NP_001056162.1 ; 3:NP_001043433.1 ; 4: }, *Pisum sativum* (Ps) {P42054}, *Solanum tuberosum* (St) {34:P42055 ; 34b:ABC01904.1 ; 36:P42056 ; 30:CAA63968.1}, *Triticum aestivum* (Ta) {1:P46274 ; 2:CAA57647.1 ; 3:CAA57646.1} et *Zea mays* (Zm) {1a:AAD56651.1 ; 1b:AAD56652.1 ; 2:AAD56653.1 ; 3: P42057}.

{ } : sont indiquées les numéros d'accension des protéines VDAC

L'ensemble des protéines VDAC, de protozoaires, de mammifères, de levures et de plantes supérieures, présentent des propriétés analogues. En effet, il a été montré lors d'études physiologiques dans des systèmes membranaires reconstitués, que le pore fonctionnait de manière voltage-dépendante et c'est d'ailleurs cette propriété qui a donné son nom à VDAC pour « Voltage Dependant Anion Channel ». A un potentiel membranaire inférieur à 20 mV, le canal laisse passer des molécules chargées négativement. Le canal est alors en conformation « ouverte ». A un potentiel membranaire supérieur, le canal se trouve dans une conformation « fermée » et est plutôt sélectif aux cations (Rostovtseva and Colombini, 1996). *In vivo*, ces deux états existent et sont modulés par des facteurs cellulaires comme la protéine « modulant la VDAC » (Liu and Colombini, 1992) et le NADH (Zizi et al., 1994).

Les protéines VDAC forment une petite famille mutigénique (Figure 33). Par exemple, 3 gènes ont été trouvés chez l'homme (Blachly-Dyson et al., 1993; Mao et al., 1998), 2 gènes chez *S. cerevisiae* (Sampson et al., 1996) et 4 gènes chez le riz, *A. thaliana* et la pomme de terre (Al Bitar et al., 2003). Un arbre phylogénétique a été construit à partir des séquences des protéines VDAC publiées ou identifiées dans GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Ainsi, sur cet arbre (Figure 33), nous pouvons voir que les VDAC de plantes, de levure et d'animaux se trouvent sur trois branches distinctes.

1.2 Différents isoformes avec différentes fonctions ?

Les différentes VDAC ont les mêmes propriétés et la même structure tridimensionnelle. La présence de différents isoformes dans un même organisme pose alors la question de la raison de leur présence et de savoir si ces isoformes ont un rôle biologique spécifique. Actuellement, peu d'études ont abordé ce sujet. Des expériences faites, sur les VDAC de blé et sur les VDAC de riz ont montré qu'il existait une expression différentielle des isoformes dans les organes. Ainsi chez le riz, le gène de OsVDAC2 est exprimé de façon constitutive dans la plante alors que les gènes de OsVDAC1 et OsVDAC3 sont exprimés de façon différentielle dans les organes de la plante. Ces mêmes travaux ont également montré qu'il existait une régulation de l'expression des différents isoformes lors du développement des graines (Elkeles et al., 1995; Al Bitar et al., 2003). Ainsi la présence de plusieurs isoformes et leurs abondances

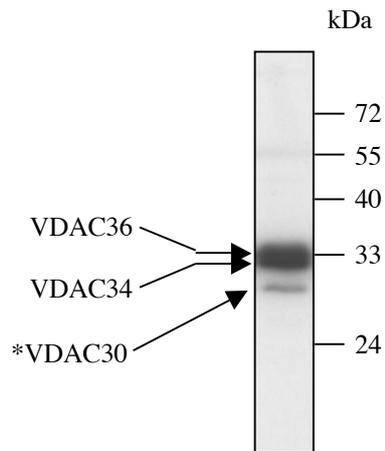


Figure 34 : Expériences de western avec des anticorps dirigés contre les protéines VDAC réalisée sur des protéines mitochondriales de pomme de terre séparées par SDS-PAGE.
 * La bande correspondant à VDAC30 n'est visible qu'après une longue exposition

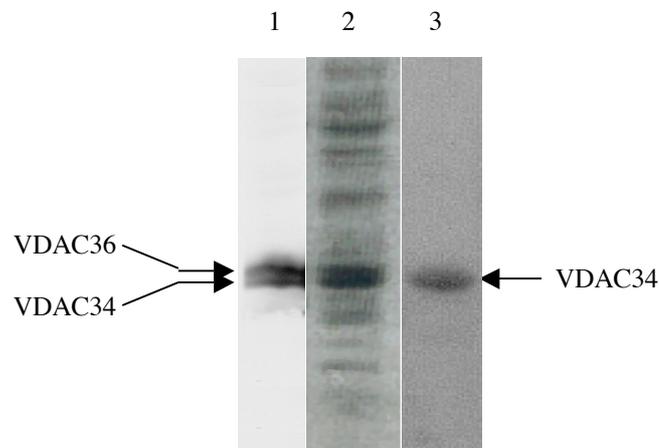


Figure 35 : Expériences de western et de northwestern réalisées sur des protéines de la membrane externe mitochondriale de pomme de terre séparées par SDS-PAGE.
 1 : Western avec des anticorps dirigés contre les VDAC de pomme de terre
 2 : Coloration au bleu de coomassie des protéines de la membrane externe de pomme de terre après séparation par SDS-PAGE
 3 : Autoradiographie de la membrane après l'expérience de northwestern avec des ARNt^{Ala} radiomarqués

relatives dans les différents organes laisse penser que les différentes VDAC ont des rôles différents.

Chez le blé, les travaux d'Elkeles et *col.* montrent que bien que les trois isoformes aient globalement la même fonction, elles présentent des caractéristiques électrophysiologiques spécifiques (Elkeles et al., 1997). Il faut aussi noter que chez l'homme des expériences faites avec les deux VDAC, HsVDAC1 et HsVDAC2, ont montré qu'elles se différencient par leur capacité à fixer l'hexokinase. En effet, HsVDAC1 est capable de fixer spécifiquement l'hexokinase alors que HsVDAC2 ne le fait pas et ceci en dépit du fait que ces deux protéines ont 75 % d'identité de séquence (Blachly-Dyson et al., 1993).

2. Les protéines VDAC de pomme de terre

Chez la mitochondrie de pomme de terre, les travaux de Heins et *col.* ont permis d'identifier et de caractériser deux protéines VDAC (Heins et al., 1994). Elles ont été nommées VDAC34 et VDAC36 car elles ont une masse moléculaire apparente de 34 kDa et 36 kDa respectivement. Par la suite, des études faites au niveau de la membrane externe de pomme de terre par L. Delage ont permis d'identifier les deux protéines, VDAC34 (numéro d'accèsion P42055) et VDAC36 (numéro d'accèsion P42056), mais également une troisième VDAC de 30 kDa appelée VDAC30 (numéro d'accèsion CAA63968.1) (Delage, 2001) (Figure 34). Finalement, le gène d'une quatrième VDAC exprimée a été identifié dans la banque de données GenBank et a été nommée VDAC34b de part sa forte homologie avec VDAC34 (numéro d'accèsion DQ294272) (Figure 33).

Lors des expériences de northwestern réalisées avec les protéines de la membrane externe mitochondriale de pomme de terre, une seule bande radioactive correspondant à une protéine de 34 kDa a été observée. Le séquençage en N-terminale de la protéine interagissant avec les ARNt a révélé que cette protéine correspondait à VDAC34. Les deux protéines VDAC, VDAC34 et VDAC36, sont présentes en quantités équivalentes sur la membrane externe de pomme de terre (Figure 35). Or, seule VDAC34 semble interagir (Figure 35).

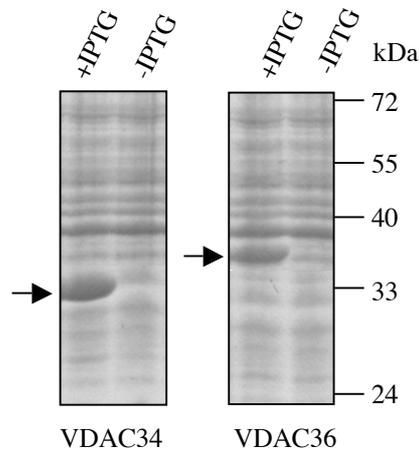


Figure 36 : Surexpression des protéines VDAC34 et de VDAC36 mitochondriales de pomme de terre, chez *E. coli* après induction à l'IPTG

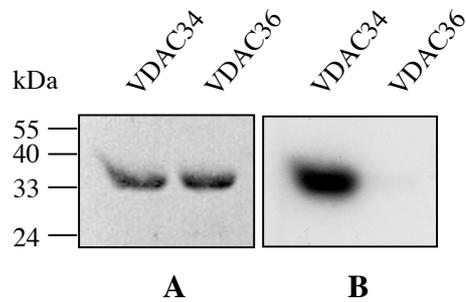


Figure 37 : Analyse par northwestern de l'interaction de VDAC34 et VDAC36 purifiées avec les ARNt^{Ala} radiomarqués.

A : Coloration au bleu de comassie après transfert sur une membrane d'immobilon-P de VDAC34 et de VDAC36 surexprimées et purifiées

B : Autoradiographie de la membrane après l'expérience de northwestern avec des ARNt^{Ala} radiomarqués.

Pour confirmer ce résultat, les ADNc codant pour VDAC34 et VDAC36, ont été clonés dans le vecteur d'expression pQE60. Les protéines ont été surexprimées chez *E. coli* (Figures 36). Etant donné qu'elles sont insolubles, elles ont été purifiées par fixation sur billes de Nickel en conditions dénaturantes (Figure 37A). Une expérience de northwestern effectuée avec les deux protéines purifiées (Figure 37B) a permis de confirmer que la protéine VDAC34 interagissait avec les ARNt alors que la protéine VDAC36 en était incapable.

Deux questions se sont posées :

- D'une part, comment la protéine VDAC34 qui ne possède aucun motif de fixation aux ARN peut-elle fixer les ARNt ?
- D'autre part pourquoi seule l'une des deux VDAC peut-elle interagir avec les ARNt alors que ces deux VDAC possèdent 75 % d'identité de séquence (Heins et al., 1994).

Afin de mieux comprendre cette interaction entre VDAC34 et les ARNt, des constructions mutantes ont été réalisées et les protéines correspondantes ont été surexprimées, purifiées puis testées pour leur interaction avec les ARNt par northwestern

3. Choix des mutations

3.1 Structure secondaire des protéines VDAC

Avant de faire le choix des mutations, nous avons aussi essayé d'obtenir une prédiction de la structure de la protéine VDAC34. En effet, la connaissance de la structure de la protéine nous permettrait de prédire quels acides aminés pourraient potentiellement entrer en contact avec les ARNt et donc être importants pour l'interaction.

Les porines bactériennes ont souvent été utilisées comme référence pour l'étude des structures des protéines contenant plusieurs feuillets β . Ceci est essentiellement dû au fait qu'il existe un grand nombre de structures cristallographiques disponibles pour ces porines bactériennes (Jap and Walian, 1996; Koebnik et al., 2000). L'étude des structures

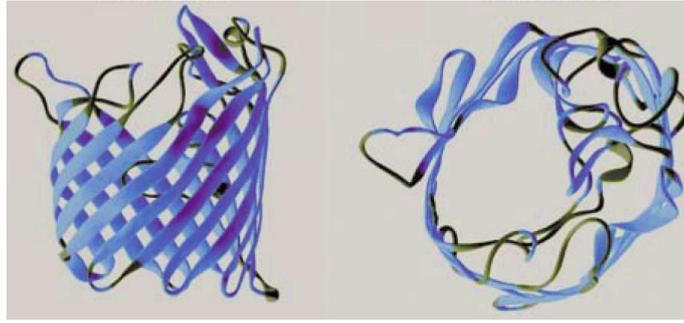


Figure 38 : Structure en tonneau β

Structure tridimensionnelle de la porine OmpF d'*E. coli*. Déterminée par diffraction aux rayons X (d'après Bay et al., 2002). Les feuillets β sont représentés par des rubans bleus. OmpF est représentée vue de face (à gauche) et vue de dessus (à droite).

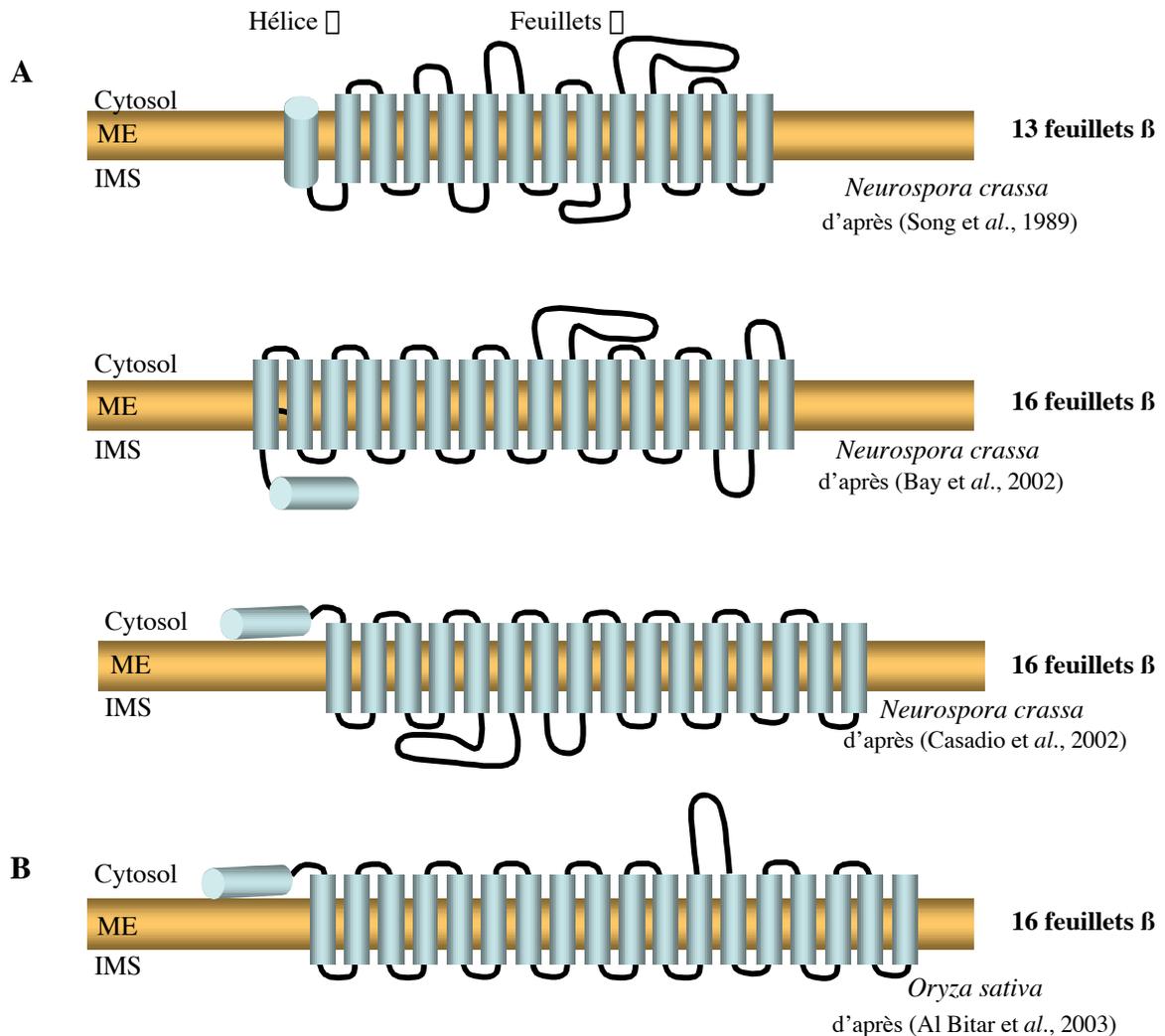


Figure 39 : Différents modèles structuraux proposés pour les protéines VDAC

A : Chez *Neurospora crassa*

B : Chez le riz

cristallographiques révèle que les porines bactériennes présentent une structure en tonneaux β composé de 8 à 24 feuilletts β antiparallèles transmembranaires (Figure 38).

En se basant sur les séquences des protéines et sur les analogies aux porines bactériennes, la structure des protéines VDAC d'eucaryotes a pu être déterminé. Il a ainsi été prédit que les protéines VDAC forment un tonneau constitué de 13 à 18 feuilletts β et à la différence des porines bactériennes, les protéines VDAC possèdent une hélice α dans leur partie N-terminale (De Pinto and Palmieri, 1992; Colombini et al., 1996; Al Bitar et al., 2003).

La protéine HsVDAC1 humaine a été cristallisée mais les cristaux obtenus par (Dolder et al., 1999) n'ont pas permis d'obtenir une structure à haute résolution (environ 0,8 nm). Toutefois, ces cristaux ont pu confirmer que la structure de VDAC était compatible avec la structure prédite en tonneau β (Dolder et al., 1999). D'autres données structurales, comme par exemple sur les changements de conformation, ont été obtenues par cryomicroscopie électronique pour la protéine VDAC de *Neurospora crassa* par (Guo and Mannella, 1993). Cependant l'absence de cristaux de VDAC de bonne résolution pour l'analyse de diffraction aux rayons X n'a pas permis de connaître la disposition des feuilletts transmembranaires et de nombreux modèles ont été proposés (Figure 39). Dans ces modèles, deux éléments sont sujets à débat. Le premier sujet concerne la disposition de l'hélice α . Certains modèles indiquent que l'hélice α fait partie de la structure en tonneau alors que d'autres indiquent que l'hélice α se trouve soit du côté de l'espace intermembranaire, soit du côté cytosolique. L'autre sujet de débat concerne l'assignation des feuilletts β . En effet, selon le modèle, le nombre de feuilletts β peut varier de 13 à 18.

Le modèle de structure secondaire de VDAC34 que nous avons utilisé lors de mes travaux a été développé à partir du modèle de VDAC de riz proposé par (Al Bitar et al., 2003) en utilisant les programmes de prédiction proposés sur le site <http://pbil.ibpc.fr/htm/index.php>. Dans notre modèle (Figure 40A), la protéine VDAC34 est constituée de 18 feuilletts β antiparallèles et d'une hélice α amphiphile en N terminal (Figure 40B). Cette hélice α ne fait pas partie du pore mais se trouve sur la membrane lipidique du côté cytosolique. On trouve 17 boucles séparant les 18 feuilletts β ; leur taille varie de 4 à 6 acides aminés à l'exception de la boucle entre les feuilletts 11 et 12 du côté

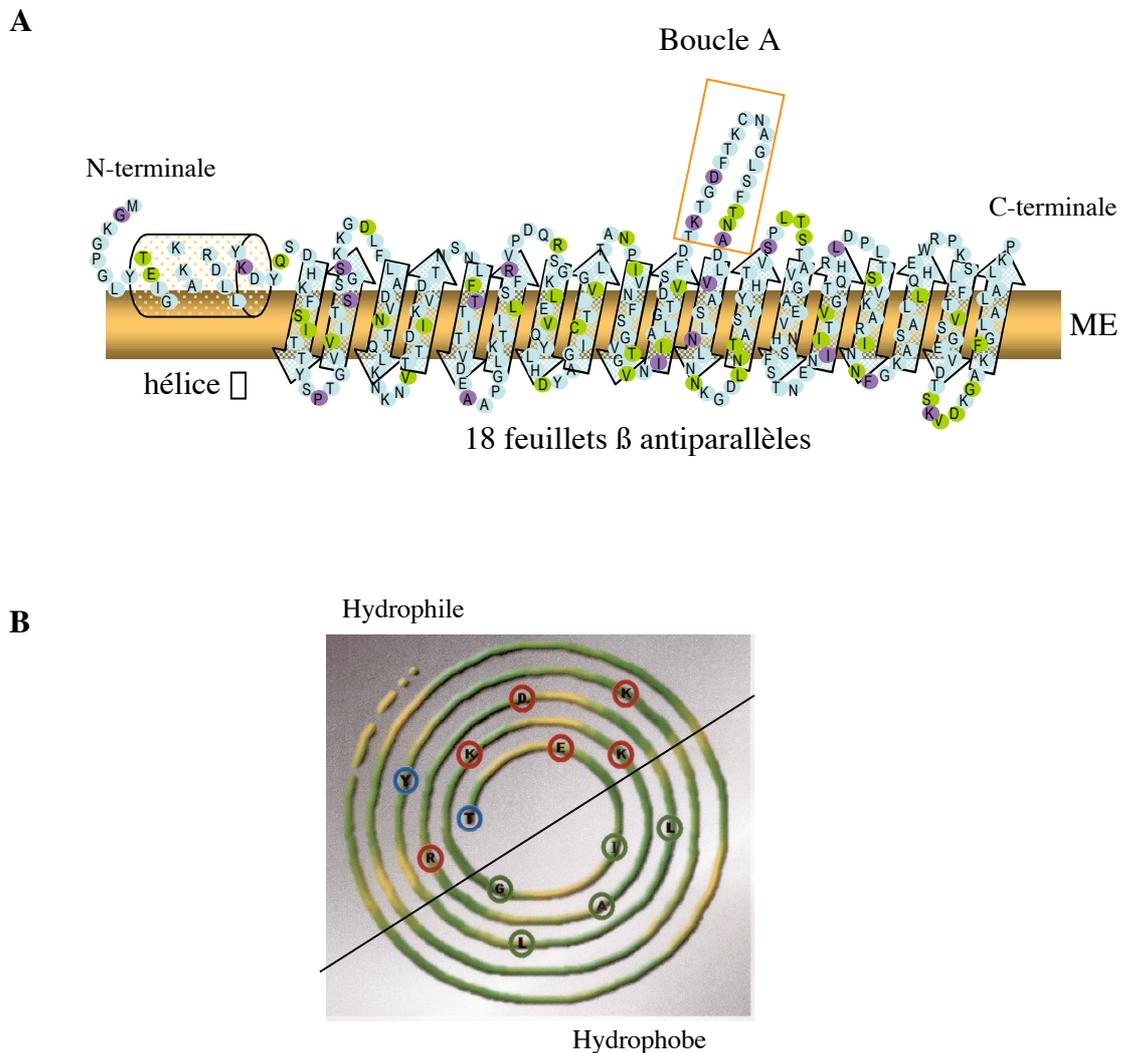


Figure 40 : Structure secondaire de VDAC34 de pomme de terre

A : Structure qui a été établie grâce aux alignements entre VDAC34 et OsVDAC2 de riz (d'après Al Bitar et *al.*, 2003 et Figure 33) en utilisant les programmes de prédiction proposés sur le site <http://pbil.ibpc.fr/htm/index.php>.

Les ronds vert et mauves indiquent les acides aminés différents entre les deux protéines VDAC.

Les ronds verts indiquent des changements qui sont a priori neutres (ex: 1 acide aminé hydrophile par un autre acide aminé hydrophile)

Les ronds mauves indiquent les changements de type d'acide aminé (ex: 1 acide aminé hydrophile par 1 acide aminé hydrophobe)

B : Hélice □ amphiphile (d'après le programme de prédiction HelixDraw (www.bioinf.man.ac.uk))

Séquence de l'hélice **T E I G K K A R D L L Y K**

○ résidus hydrophobes ○ résidus chargés ○ résidus polaires

cytosolique qui a une longueur de 18 acides aminés (boucle A). Une structure similaire peut être proposée pour VDAC36.

Les protéines VDAC34 et VDAC36 possèdent 75 % d'identité de séquence (Figure 40A et 41). Seuls 67 acides aminés sur 276 sont différents entre les deux protéines et parmi ces 67 acides aminés seuls 18 ont clairement des caractéristiques physico-chimiques différentes (acide aminé hydrophobe en acide aminé hydrophile par exemple).

Les acides aminés importants pour l'interaction avec l'ARNt doivent se situer sur la partie accessible de la protéine du côté cytosolique et/ou à l'intérieur du pore. Les acides aminés se trouvant au niveau de la boucle A et au niveau de l'extrémité N-terminale (8 acides aminés suivis de l'hélice α) constituent ainsi des candidats intéressants pour l'interaction.

3.2 Les constructions mutantes

Etant donné que les acides aminés différents entre VDAC34 et VDAC36 sont répartis sur l'ensemble de la séquence nous n'avons pas voulu dans un premier temps effectuer des mutations ponctuelles. L'idée a donc été de tirer parti de l'interaction différentielle entre VDAC34 et VDAC36 et de remplacer des domaines de VDAC34 par les domaines équivalents de VDAC36. Ces constructions chimériques devaient permettre ainsi de délimiter les domaines de VDAC34 importants pour l'interaction avec les ARNt.

Les protéines VDAC34 et VDAC36 ont été arbitrairement divisés en trois parties (Figures 41 et 42). Le premier tiers va de l'acide aminé 1 à l'acide aminé 87, le deuxième tiers va de l'acide aminé 87 à l'acide aminé 173 et le troisième tiers va de l'acide aminé 173 à l'acide aminé 273. Sur le premier tiers, 18 acides aminés diffèrent entre VDAC34 et VDAC36, sur le deuxième tiers 21 acides aminés et sur le troisième tiers 28 acides aminés. Deux types de constructions ont été effectuées, d'une part des protéines chimères entre les deux protéines VDAC34 et VDAC36, d'autre part des mutants de délétions de la protéine VDAC34 (Figure 42).

3.3 Protéines chimères

Quatre protéines chimères nommées respectivement C1, C2, C3 et C4. Les deux premières constructions (C1 et C2) possèdent respectivement un tiers et deux tiers de VDAC36 suivi ensuite respectivement de deux tiers et d'un tiers de VDAC34. Les deux

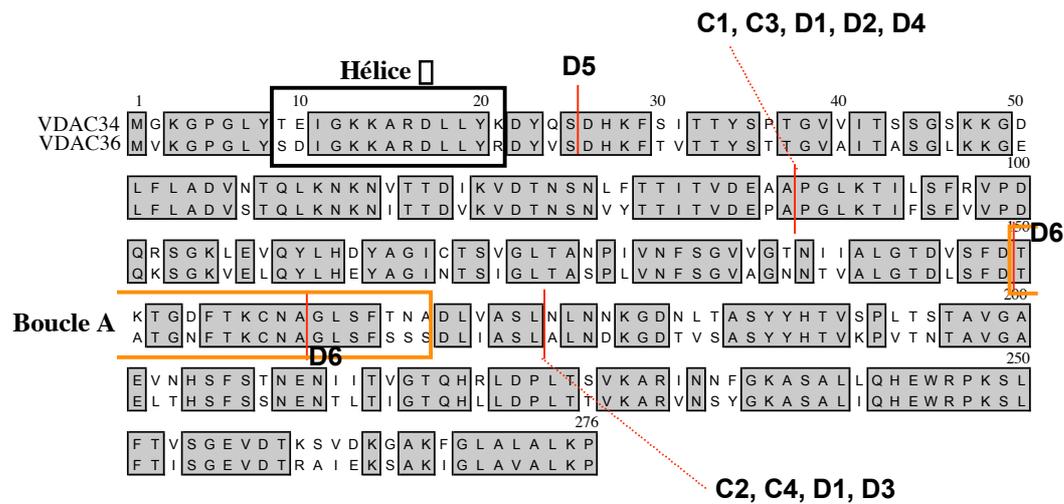


Figure 41 : Les deux VDAC mitochondriales de pomme de terre : comparaison de leur séquence.

Alignement des séquences protéiques de VDAC34 et VDAC36. Les acides aminés identiques sont encadrés sur fond grisé.

Les limites des constructions sont indiquées par un trait vertical rouge. La position de l'hélice □ est représentée par un cadre gras noir. La position de la boucle A est représentée par un cadre gras orange.

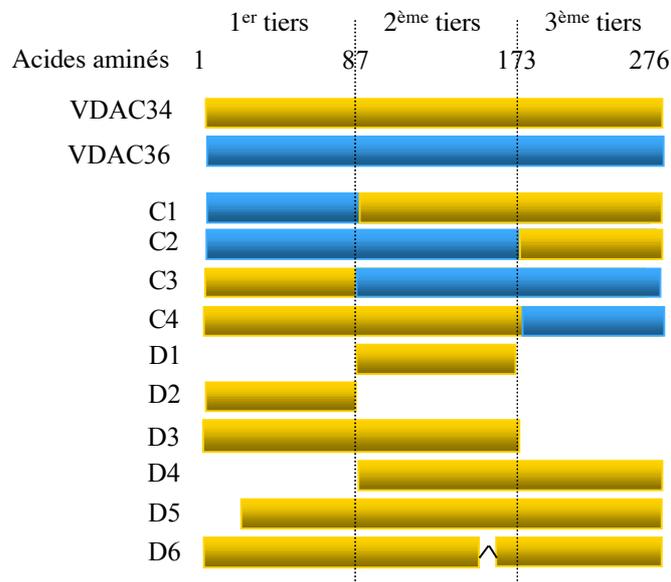


Figure 42 : Schéma des constructions réalisées à partir de VDAC34 (en jaune) et VDAC36 (en bleu).

Quatre protéines chimériques (C1 à C4) et six protéines VDAC34 tronquées en C-terminale et en N-terminale (D1), en C-terminale (D2 et D3), en N-terminale (D4 et D5) et avec une délétion interne (11 acides aminés de la boucle A) (D6).

autres protéines chimères (C3 et C4) correspondent aux constructions opposées (Figure 42).

3.4 Mutants de délétion

Six mutants de délétion ont été réalisés. Ces mutants correspondent à des protéines VDAC34 délétées des parties N-terminales (D4 et D5), des parties C-terminales (D2 et D3), des deux extrémités (D1) ou de séquences internes (D6) (Figure 42).

4. Analyse par northwestern de l'interaction des différentes constructions avec les ARNt

Les dix constructions ont été réalisées par mutagenèse par PCR selon l'approche décrite dans la partie « matériel et méthodes ». Elles ont été clonées dans le vecteur d'expression pQE60 et les protéines ont été ensuite surexprimées dans *E. coli*. Toutes les protéines ont été purifiées par fixation sur billes de Nickel en conditions dénaturantes (Figure 43 B).

Pour réaliser les expériences de northwestern (Figure 43C), les protéines ont été fractionnées par SDS-PAGE puis transférées sur une membrane immobilon-P (Figure 43B). Après renaturation, les protéines sont incubées en présence des transcrits d'ARNt^{Ala} radiomarqués. Pour chaque expérience, les deux protéines VDAC34 et VDAC36 sauvages sont toujours analysées et servent de référence positive et négative respectivement.

L'efficacité d'interaction entre la protéine et les ARNt est calculée en faisant le rapport entre le signal radioactif obtenu (Figure 43C) et la quantité de protéines transférées sur la membrane (Figure 43B). Cette quantification des protéines colorées sur membrane et des signaux radioactifs, est réalisée à l'aide du logiciel MacBas. L'efficacité d'interaction entre VDAC34 et les ARNt est choisie comme valeur de référence (100 %). Seules deux expériences indépendantes ont été réalisées et l'efficacité moyenne obtenue pour chaque construction est présentée sous forme d'histogramme.

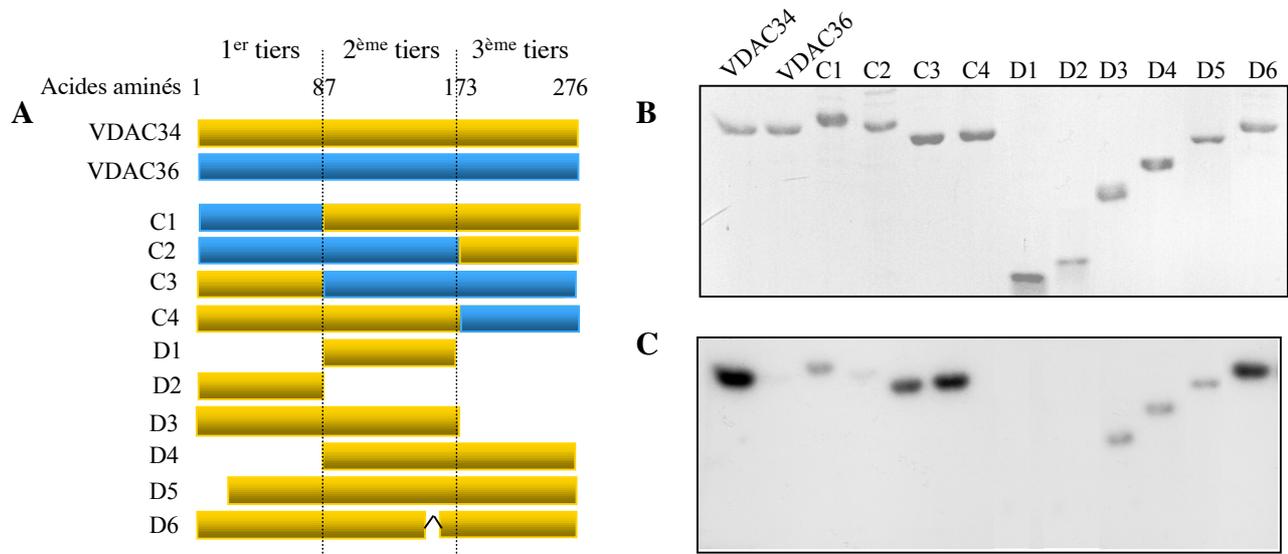


Figure 43 : Expériences de northwestern réalisées avec les différents protéines mutantes surexprimées et purifiées.

A : Schéma des constructions réalisées

B : Coloration après transfert sur membrane des protéines surexprimées chez *E. coli* et purifiées

C : Résultats de l'une des expériences de northwestern

4.1 Protéines chimères

L'étude de l'interaction entre les protéines chimères (Figure 44A) montre que lorsque le premier ou les deux tiers de VDAC34 sont remplacés par VDAC36 (C1 et C2), l'interaction avec les ARNt est très fortement diminuée (de l'ordre de 90 %). Par contre, lorsque le premier ou les deux tiers de VDAC36 sont remplacés par ceux de VDAC34 (C3 et C4), environ 70 % de l'interaction avec les ARNt est récupérée. L'efficacité d'interaction entre C3 et C4 étant équivalente, il semble donc que le premier tiers de VDAC34 soit le plus important pour l'interaction avec les ARNt.

4.2 Mutants de délétion

Les délétions de grands fragments de VDAC34 (constructions D1, D2, D3 et D4) entraînent la diminution d'au moins 85 % de l'interaction (Figure 44B). Cependant, la construction D5, à laquelle seuls les 25 premiers acides aminés ont été délétés, n'est plus non plus capable d'interagir efficacement avec les ARNt (environ 10 % d'interaction). Ceci suggère que ces 25 acides aminés ont un rôle important pour l'interaction (Figure 44B).

La délétion de 11 acides aminés au niveau de la boucle A (D6) n'affecte pas l'interaction de la protéine avec les ARNt. Ceci indique que la boucle A n'est pas importante pour l'interaction avec les ARNt (Figure 44B).

La comparaison des interactions entre les constructions C3 et D2 indique que le premier tiers de VDAC34, bien qu'essentiel n'est pas suffisant pour maintenir l'interaction avec l'ARNt (Figure 44C). De plus, la comparaison des constructions C4 et D3 montre que pour avoir une interaction, il faut une protéine entière (Figure 44C).

5. Discussion

L'analyse des quatre constructions chimères (constructions C1, C2, C3 et C4) suggère que le premier tiers de VDAC34 (comprenant l'hélice α et 5 feuillets β) joue un rôle important dans l'interaction. Dans ce premier tiers, 18 acides aminés diffèrent entre VDAC34 et VDAC36 et sont répartis sur l'ensemble cette région. Il est curieux de noter

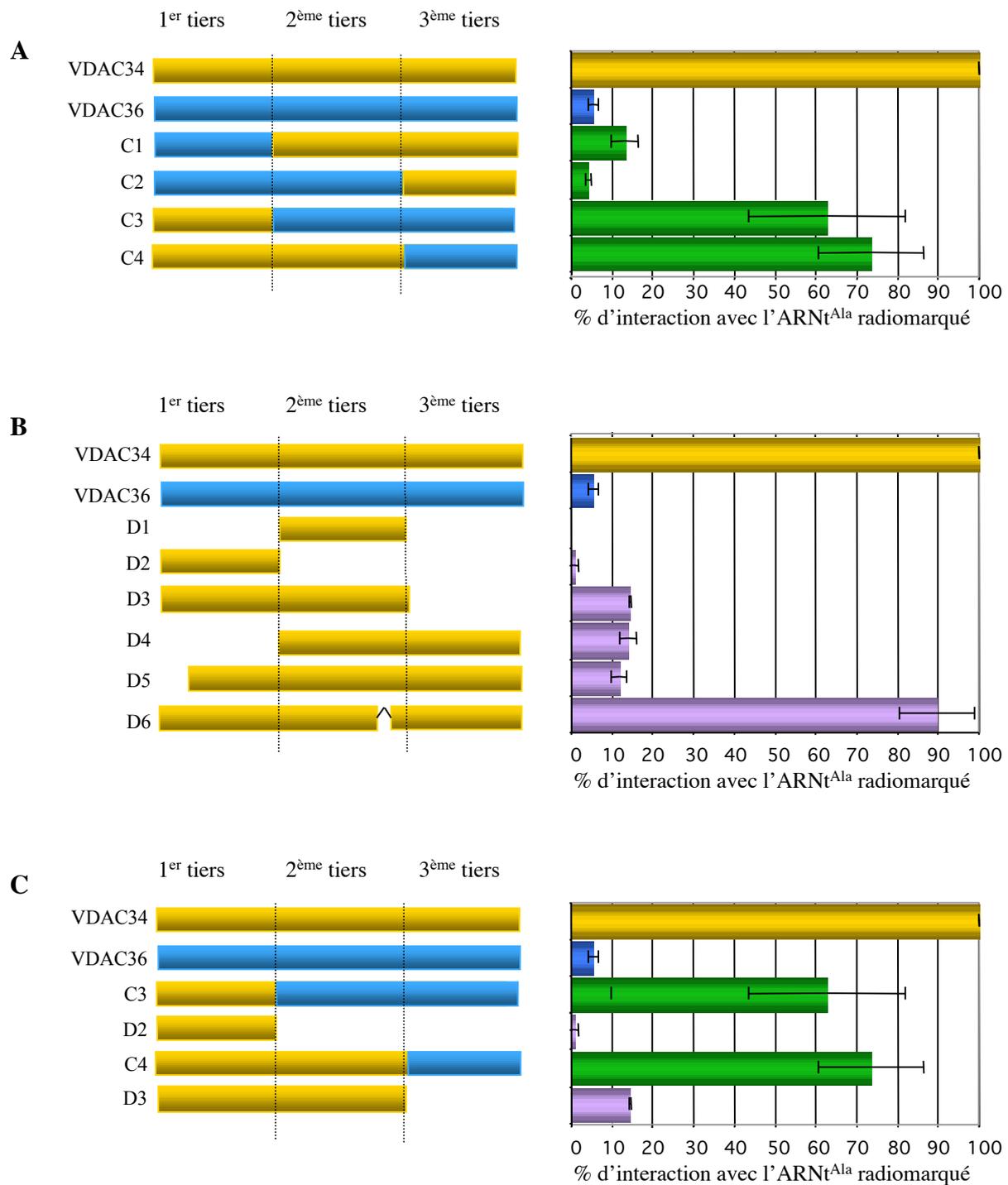


Figure 44 : Efficacité d'interaction des différentes constructions avec l'ARNt^{Ala} radiomarqué
 Les histogrammes donnent des valeurs d'interaction moyennes obtenues lors de 2 expériences de northwestern.

L'interaction de VDAC avec les ARNt a été prise comme référence (100%).

La valeur de VDAC34 est représentée par une barre jaune

La valeur de VDAC36 est représentée par une barre bleu

Les valeurs des constructions chimères sont représentées par des barres vertes

Les valeurs des mutants de délétion sont représentées par des barres mauves

A : Protéines chimères

B : Protéines délétées

C : Comparaison de protéines chimères et délétées

que cette région, en comparaison aux deux autres tiers de VDAC34, est la région présentant le moins de différences entre les deux VDAC. Toutefois, il semble que ce premier tiers (construction D2) n'est pas suffisant pour assurer une interaction avec les ARNt. D'ailleurs, la comparaison des constructions C3 et D2 suggère fortement que la protéine entière est nécessaire pour une bonne interaction avec les ARNt. Etant donné que la protéine forme un tonneau β , il est donc probable que cette structure soit importante pour l'interaction avec les ARNt. Cette structure doit probablement jouer un rôle important dans la disposition des acides aminés nécessaires pour l'interaction avec les ARNt. Ceci laisse également penser que l'interaction entre la protéine VDAC et les ARNt n'est pas due à un motif particulier mais plutôt à des acides aminés importants répartis sur l'ensemble de la protéine et en particulier dans le premier tiers de la protéine, qui grâce à la structure tridimensionnelle de la protéine se regroupent pour créer un environnement permettant l'interaction avec les ARNt.

Finalement, la construction D5 est intéressante car elle semble indiquer que les 25 premiers acides aminés sont importants pour l'interaction. Cette région comporte l'hélice α amphiphile (du 9^{ème} au 21^{ème} acide aminé) (Figure 41). Dans cette région, 5 acides aminés diffèrent entre VDAC34 et VDAC36 et parmi ces 5 acides aminés, 3 se trouvent au niveau de l'hélice α . De plus, dans la partie hydrophile de cette hélice α , se trouvent trois lysines qui sont chargées positivement et qui pourraient potentiellement interagir avec les ARNt qui sont chargés négativement. Il serait donc intéressant de vérifier si cette hélice α a un rôle dans l'interaction avec les ARNt. Toutefois, il est possible que la faible interaction observée pour la cette construction soit due au fait que la délétion ne permette plus à la protéine VDAC d'adopter une structure correcte qui, comme nous l'avons vu ci-dessus, semble importante pour l'interaction avec les ARNt. Pour écarter cette dernière hypothèse, il faudrait remplacer cette région par la partie équivalente de VDAC36, de façon à ce que la structure de la protéine entière soit conservée.

Cette première série de mutants a servi de point de départ pour définir le choix de nouvelles constructions en vue d'identifier et de délimiter plus finement la ou les régions de VDAC34 essentielle pour l'interaction. J'ai poursuivi ce travail avec Samira El Farouk actuellement en première année de thèse et dont j'ai participé à l'encadrement lors de son stage de master. Ainsi, quatre nouvelles constructions chimériques sont en cours d'étude. Pour ces nouvelles constructions, le premier tiers de la partie N-terminale a été divisé arbitrairement en trois parties : les 23, 50 et 87 premiers acides aminés (Figure 45). Les

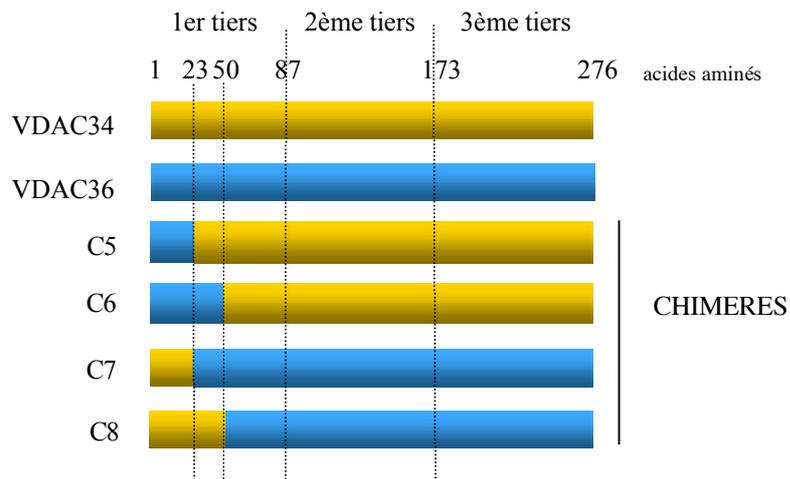


Figure 45 : Les 4 nouvelles constructions réalisées

VDAC34 (en jaune) et VDAC36 (en bleu) : protéines «sauvages»

C5 : chimère correspondant aux 23 premiers acides aminés de VDAC36 suivis de VDAC34

C6 : chimère correspondant aux 50 premiers acides aminés de VDAC36 suivis de VDAC34

C7 : chimère correspondant aux 23 premiers acides aminés de VDAC34 suivis de VDAC36

C8 : chimère correspondant aux 50 premiers acides aminés de VDAC34 suivis de VDAC36

constructions ont donc la structure suivante : les 23 ou 50 premiers acides aminés de VDAC36 suivies de la séquence de VDAC34 (constructions C5 et C6) et inversement (constructions C7 et C8). Ces nouvelles constructions permettront de définir plus précisément la région importante pour l'interaction et il sera par la suite intéressant de réaliser d'autres mutations ponctuelles au niveau de cette région.

La stratégie que nous avons développée a toutefois ses limites. En premier lieu, pour assurer la reproductibilité des données, il sera nécessaire d'augmenter le nombre d'expériences de northwestern avec les constructions déjà obtenues et les nouvelles constructions ceci afin de calculer plus précisément l'efficacité d'interaction moyenne. Deuxièmement, les expériences de northwestern reposent en particulier sur l'étape de renaturation des protéines sur les membranes. Par défaut, nous avons supposé que celle-ci ne différerait pas significativement entre les différentes constructions. Or, ceci n'est peut-être pas le cas. Par la suite nous nous proposons de valider les résultats obtenus pour les constructions les plus intéressantes par une deuxième technique, le gel retard. Pour cela il sera nécessaire, malgré la difficulté, d'obtenir pour chaque construction testée suffisamment de protéine soluble en condition native. Ceci a d'ailleurs été essayé pour la protéine VDAC34. Pour cela la protéine VDAC34 après avoir été surexprimée chez *E. coli*, a été solubilisée en présence de 8 M urée. Les protéines ont été ensuite fixées sur une colonne Ni-NTA et ont été renaturées par des lavages successifs avec une solution contenant des concentrations décroissantes d'urée (8 M à 0 M) et en présence de 2 % (p/v) de n-octyl glucoside (détergent non ionique). La protéine VDAC34 ainsi renaturée a été utilisée avec succès pour l'expérience de gel retard (Figure 1 article 2). Une approche similaire sera utilisée dans le futur pour les autres constructions d'intérêt.

Il serait également intéressant, d'élargir notre étude aux autres VDAC de la même famille : VDAC30 et VDAC34b. Pour l'instant nous ne savons pas si ces protéines peuvent ou non interagir avec les ARNt. L'étude de l'interaction de ces deux protéines avec les ARNt serait donc intéressante. D'autant plus que sur l'arbre phylogénétique (Figure 33), on peut observer que VDAC30 avec 52 % d'identité avec VDAC34 est la protéine appartenant à la famille de VDAC de pomme de terre la plus éloignée de VDAC34, alors que VDAC34b avec 84 % d'identité avec VDAC34 est la protéine la plus proche de VDAC34. Ces travaux permettront ainsi de déterminer s'il existe une unique protéine VDAC responsable de l'interaction avec les ARNt chez la pomme de terre. Par la suite, cette même étude sera intéressante chez d'autres plantes et en particulier chez *A. thaliana*.

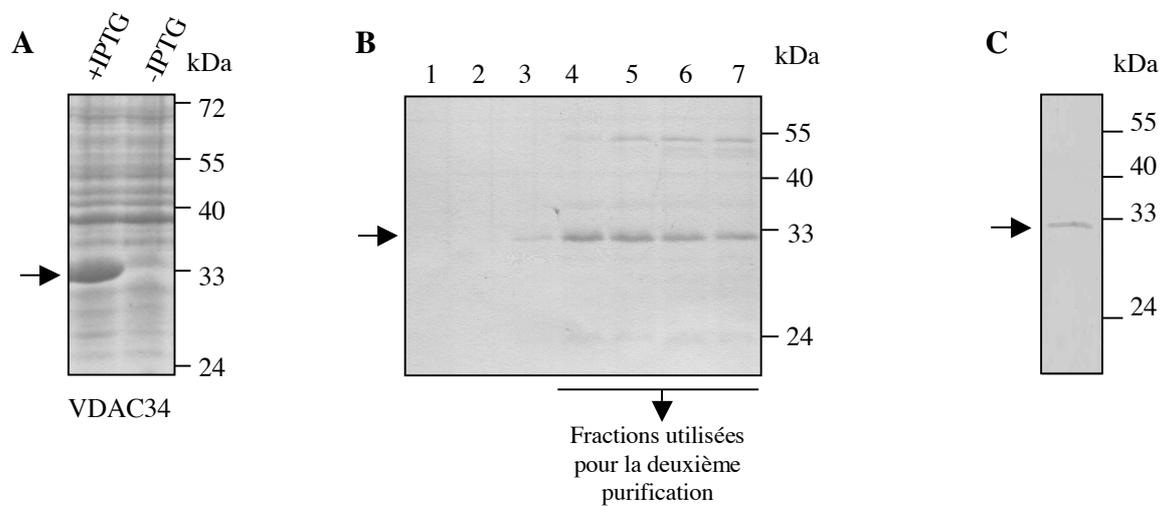


Figure 46 : Différentes étapes de la purification de VDAC34 surexprimée chez *E. coli*

A: Surexpression de VDAC34 mitochondriale de pomme de terre chez *E. coli* après induction à l'IPTG

B : Première purification de VDAC34 sur une colonne d'hydroxylapatite. Sept fractions de 500 μ L ont été obtenues et seules les fractions 4, 5, 6 et 7 ont été utilisées pour la deuxième purification.

C : Deuxième purification de VDAC34 sur une colonne de Ni-NTA

D'autre part, des travaux utilisant des bicouches lipidiques comportant VDAC34 ont été initiés en collaboration avec l'équipe de F. Homblé (Université Libre de Bruxelles). Nous voulons tout d'abord tester la capacité de VDAC34 à être traversée par l'ARNt^{Ala}. Si ce premier résultat est positif, nous pourrions alors aussi tester certaines de nos constructions dans ce système.

Finalement, il est clair que la nature de l'interaction de VDAC34 avec les ARNt ne pourra être complètement comprise qu'en déterminant la structure tridimensionnelle de cette protéine. Ainsi, dans le cadre d'une étude structure/fonction, l'obtention de la structure cristallographique de cette protéine serait primordiale. Pour cela des travaux ont déjà été initiés. Pour la cristallisation, il nous faut trois principaux prérequis qui sont : avoir une protéine pure, en condition native et en quantité suffisante. Le principal problème des protéines VDAC réside dans le fait qu'elles sont hautement hydrophobes. Deux stratégies ont alors été mises en place. La première stratégie a consisté à purifier la protéine en conditions dénaturantes et à la renaturer ensuite comme cela a été décrit ci-dessus. Par cette méthode, nous avons obtenu 200 µg de VDAC34 pour 500 mL de culture bactérienne. Toutefois, cette méthode implique une étape de dénaturation. Or, l'idéal serait de purifier la protéine en conditions natives. Pour cela, sept détergents non ioniques ont été utilisés pour tester leur capacité à solubiliser les protéines VDAC34 surexprimées chez *E. coli* : le n-octyl glucoside, le LDAO, la digitonine, le n-dodecyl-β-D-maltoside, le Triton X-100, le Tween 20 et le Nonidet P40. Parmi ces sept, le n-octyl glucoside et le Triton X-100 sont les détergents avec lesquels nous avons eu les meilleurs résultats.

Ainsi nous avons fait un premier essai de purification selon la technique décrite dans (de Pinto et al., 1987). Dans cette méthode, de Pinto et al. purifient des protéines VDAC de mammifères sur une colonne d'hydroxylapatite à partir de mitochondries isolées et solubilisées au Triton X-100. Le principe a été utilisé sauf que VDAC34 a été obtenue à partir de bactéries *E. coli* surexprimant la protéine (Figure 46). Cependant après la colonne d'hydroxylapatite, des protéines contaminantes ont aussi été isolées avec VDAC34. Nous avons donc fait une deuxième étape de purification sur une colonne de Ni-NTA en tirant parti du fait que la protéine VDAC34 surexprimée possède une queue poly-histidine. Nous avons également profité de cette étape pour changer de détergent et passer du Triton X-100 au n-octyl glucoside. Finalement, la protéine VDAC34 a été correctement purifiée et on a pu obtenir environ 2,5 µg de VDAC34 pour 500 mL de culture bactérienne. Cet essai est satisfaisant, mais il devra être reproduit et des quantités plus grandes devront être faites.

Pour commencer à réaliser des tests de cristallisation, il nous faut 1 mg de protéine native. Avec la première méthode, nous avons obtenu suffisamment de protéines pour réaliser ces tests et cette partie cristallographique sera faite en collaboration avec l'équipe de C. Sauter (IBMC, Strasbourg).

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

1. Conclusion générale : récapitulatif des résultats

1.1 Déterminants d'importation

Lors de ce travail de thèse, un premier aspect des recherches a consisté à étudier la spécificité du mécanisme d'importation des ARNt dans les mitochondries de plante. Pour cela nous avons étudié par une approche transgénique les déterminants d'importation en utilisant comme modèle les ARNt^{Gly} isoaccepteurs des plantes dicotylédones. Les résultats indiquent que le domaine D ainsi que l'anticodon de l'ARNt^{Gly}(UCC), importé *in vivo*, sont nécessaires mais insuffisants individuellement pour l'importation dans les mitochondries. De plus, des expériences ont montré que l'ARNt^{Gly}(GCC) qui normalement n'est pas importé *in vivo*, est capable d'être importé *in vitro*. Ceci suggère que l'ARNt^{Gly}(GCC) n'a aucun signal de « rétention cytosolique » présent dans la séquence et ceci est en accord avec ce qui est observé chez les plantes monocotylédones, à savoir que l'ARNt^{Gly}(GCC) cytosolique est importé dans la mitochondrie.

L'ensemble des études faites pour identifier les déterminants d'importation indique que différents facteurs pouvant agir au moment de l'adressage des ARNt à la surface mitochondriale ou au moment du passage de l'ARNt à travers les membranes mitochondriales ou bien dans un mécanisme de régulation impliquant les machineries traductionnelles, pourraient être à l'origine de la sélectivité dans l'importation des ARNt dans les mitochondries végétales. La présence de plusieurs facteurs suggère donc que la spécificité d'importation observée chez les plantes nécessite très probablement la mise en œuvre d'une régulation très fine.

1.2 Facteurs membranaires impliqués dans l'importation

Un second aspect des travaux de thèse a porté sur la recherche des facteurs protéiques des membranes mitochondriales impliqués dans le mécanisme d'importation des ARNt dans la mitochondrie végétale. Des approches *in vitro* ont montré que les protéines TOM20 et TOM40, jusqu'à présent connues pour leur fonction dans l'importation des protéines mitochondriales, étaient impliquées dans l'attachement des

ARNt sur la membrane externe mitochondriale. Toutefois, nous avons montré que TOM20 ne semblait pas interagir directement avec les ARNt. L'implication de TOM20 dans ce mécanisme doit donc être indirecte. Nous avons également montré par des expériences de northwestern et de gel retard que la protéine VDAC pouvait interagir avec les ARNt. Par la suite, l'utilisation du système d'importation *in vitro* a permis de démontrer que la protéine VDAC connu jusqu'à maintenant pour être un transporteur de métabolites, permettait également le passage des ARNt au niveau de la membrane externe. Des expériences de compétition ont par ailleurs démontré que les ARNt et les protéines étaient importés dans les mitochondries par des voies distinctes.

En ce qui concerne la membrane interne, nous n'avons pas encore identifié les protéines intervenant dans l'importation des ARNt. Des travaux antérieurs à ma thèse avaient montré que le transporteur ADP/ATP (ANT) pouvait interagir avec les ARNt. Toutefois, nos premiers résultats semblent indiquer qu'il n'est pas impliqué dans l'importation des ARNt au niveau de la membrane interne. D'autre part, l'expérience de compétition *in vitro* suggère que les ARNt n'utilisent pas non plus le canal d'importation des protéines TIM17/23. Nous avons donc cherché d'autres protéines candidates et la sous-unité γ de l'ATP synthase a été identifiée comme pouvant interagir avec les ARNt. D'autres études seront nécessaires pour démontrer son implication ou non dans l'importation des ARNt.

1.3 Eléments d'interaction entre VDAC et l'ARNt

Un troisième aspect de ce travail de thèse a consisté à étudier la nature de l'interaction entre les ARNt et VDAC. Chez la pomme de terre, les deux protéines majoritaires, VDAC34 et VDAC36, se différencient par 67 acides aminés. Cependant seule VDAC34 interagit *in vitro* avec les ARNt. Nous avons donc construit des mutants de délétion ainsi que des mutants chimériques entre VDAC34 et VDAC36 et effectué des expériences de northwestern. Les résultats préliminaires suggèrent que la région N-terminale de VDAC34 et notamment les premiers 87 acides aminés sont importants pour l'interaction. Cependant, cette région seule ne semble pas suffisante car nos expériences suggèrent que l'ensemble de la protéine est nécessaire pour qu'il y ait une interaction efficace avec l'ARNt. Ces résultats préliminaires ont servi de point de départ pour définir le choix de nouvelles constructions en vue d'identifier plus précisément les éléments

essentiels à l'interaction de VDAC34 avec les ARNt. Ce travail qui est actuellement en cours d'étude nous permettra dans le futur de mieux comprendre ce processus d'importation.

2. Perspectives dans l'étude du mécanisme d'importation des ARNt dans les mitochondries de plantes

Au cours de ce travail sur l'importation des ARNt dans les mitochondries végétales, deux aspects nous ont principalement intéressés : d'une part la question de la spécificité et d'autre part, les facteurs membranaires impliqués dans l'importation. Toutefois, il reste de nombreuses questions auxquelles nous n'avons pas répondu.

2.1 Comprendre la spécificité d'importation des ARNt

Chez les plantes supérieures, le nombre d'ARNt cytosoliques trouvés dans la mitochondrie peut aller jusqu'à la moitié de la population d'ARNt mitochondriaux. De ce fait, certains ARNt cytosoliques sont trouvés uniquement dans le cytosol et d'autres sont trouvés dans le cytosol et dans la mitochondrie. Une des plus grande question concernant le mécanisme d'importation des ARNt dans la mitochondrie est de comprendre comment se fait cette spécificité d'importation. Cette question est particulièrement importante chez les plantes car non seulement il y a une grande spécificité d'importation dans une plante mais surtout car des ARNt ayant la même séquence sont importés dans les mitochondries de certaines plantes et pas dans d'autres.

L'ensemble des études réalisées *in vivo* suggère l'existence de différents facteurs probablement impliqués à différents niveaux de l'importation des ARNt. Le mécanisme d'importation peut-être modélisé en trois étapes où la sélection pourrait se faire. Ces trois étapes sont l'adressage de l'ARNt vers la mitochondrie, le passage à travers les membranes mitochondriales et une sélection à l'intérieur de la mitochondrie.

Afin de mieux comprendre le mécanisme de sélectivité de l'importation des ARNt chez les mitochondries de plantes, une première approche pourra consister à essayer d'identifier l'ensemble des ARNt localisés à la surface des mitochondries. Pour cela, des membranes externes seront préparées à partir de mitochondries isolées et les ARN fixés au niveau de ces membranes seront purifiés. Des expériences de northern blot, de RT-PCR suivi du clonage et du séquençage de ces ARN nous permettrons de les identifier. Une

approche analogue utilisée chez les mitochondries de levure a révélé que de nombreux ARN messagers codant pour des protéines mitochondriales importées se trouvaient à la surface mitochondriale (Sylvestre et al., 2003). Chez les mitochondries de plante, une telle approche permettra de déterminer si l'ensemble des ARNt cytosoliques importés et non importés se trouvent à la surface mitochondriale ou si seuls les ARNt importés y sont présents. Dans ce dernier cas, cela suggérerait que la sélection de l'importation se ferait à l'extérieur de la mitochondrie, soit au moment de l'adressage des ARNt vers les mitochondries, soit au niveau de récepteurs qu'il leurs seraient spécifiques.

Par ailleurs, des expériences réalisées au laboratoire ont montré que les aminoacyl-ARNt synthétases étaient importantes pour l'importation des ARNt (Dietrich et al., 1996a; Delage et al., 2003a). Toutefois, nous ignorons toujours à quel niveau ces protéines interviennent dans l'importation des ARNt. Il est possible qu'elles soient requises pour l'adressage vers la mitochondrie. Par exemple si nous prenons le cas des ARNt^{Gly} et des glycyl-ARNt synthétases, dans ce cas deux glycyl-ARNt synthétases sont importées à l'intérieur des mitochondries. L'une de type procaryotique (GlyRS-2) est active et aminoacyle les ARNt^{Gly} mitochondriaux ainsi que les ARNt^{Gly} cytosoliques importés. L'autre enzyme de type eucaryotique (GlyRS-1) bien qu'active dans le cytosol n'a pas d'activité d'aminoacylation dans la mitochondrie. La raison de la présence de cette enzyme dans la mitochondrie est inconnue. Il est possible qu'elle soit importante uniquement pour l'importation des ARNt. Afin de vérifier cette hypothèse, des approches *in vivo* et *in vitro* seraient envisageables.

In vivo, il serait intéressant de disposer d'un mutant d'insertion où la séquence d'adressage mitochondriale de la protéine serait interrompue par un ADN-T. Dans une telle plante, seule la forme cytosolique de la protéine pourrait être produite. Ainsi on pourrait déterminer si la forme mitochondriale de la protéine a une fonction essentielle dans la cellule, comme l'importation des ARNt. A l'heure actuelle un tel mutant d'insertion n'a pas été identifié dans les banques de FST. Une autre approche pourrait donc être de construire un mutant exprimant un ARNi placé sous le contrôle d'un promoteur inductible.

In vitro, il serait intéressant de voir si l'efficacité d'importation des ARNt^{Gly} dans les mitochondries pourrait être modifiée en ajoutant au système le précurseur de la GlyRS-1 ou de GlyRS-2 surexprimées. Il est possible qu'*in vivo*, la reconnaissance des ARNt à la surface mitochondriale s'effectue alors qu'ils sont en complexe avec leurs aminoacyl-

ARNt synthétases respectives. D'autre part, à l'heure actuelle aucun facteur cytosolique n'est présent dans notre système *in vitro* et l'absence de spécificité dans notre système est peut-être liée à cela.

2.2 Le rôle de VDAC34 dans l'importation des ARNt

Au cours de cette thèse, une étude a été initiée pour comprendre l'interaction de VDAC34 mitochondriale de pomme de terre avec les ARNt. Ainsi, nous avons construit une série de mutants de VDAC34 et nous avons testé leur capacité à interagir avec les ARNt. Les premiers résultats indiquent que la région N-terminale de la protéine est importante pour l'interaction, mais il semble également que la structure tridimensionnelle de la protéine joue un rôle dans l'interaction. De nouvelles constructions chimères sont en cours d'étude afin de déterminer plus précisément la ou les régions, voir les acides aminés nécessaires à l'interaction avec les ARNt.

Toutefois, la nature de l'interaction de VDAC34 avec les ARNt ne pourra être complètement comprise qu'en déterminant la structure tridimensionnelle de cette protéine, seule et/ou en complexe avec un ARNt. Pour se faire VDAC34 devra être purifiée en condition native en quantité suffisante pour permettre l'obtention de cristaux. Des études préliminaires ont déjà été initiées au laboratoire pour obtenir la protéine native. La cristallisation de la protéine se fera en collaboration avec l'équipe de C. Sauter (IBMC, Strasbourg). La purification d'une telle protéine en condition native et en grande quantité est ardue, cependant, les progrès dans le domaine de la cristallogénèse permettent d'obtenir des cristaux avec des quantités toujours décroissantes de protéines (Nollert, 2005).

En parallèle, une étude a été initiée en collaboration avec l'équipe de F. Homblé (Université libre de Bruxelles) pour étudier le passage de l'ARNt^{Ala} à travers des systèmes membranaires reconstitués contenant des protéines VDAC purifiées. Si les premiers essais sont positifs, des travaux seront alors initiés pour savoir s'il y a une différence dans le passage des ARNt entre VDAC34 et VDAC36.

Nous nous sommes principalement intéressés à deux protéines VDAC. Or, comme nous l'avons vu précédemment, les protéines VDAC forment des petites familles multigéniques, comportant à ce jour au maximum quatre représentants identifiés (quatre gènes chez *A. thaliana* et quatre gènes chez la pomme de terre). Pour l'instant, nous avons uniquement étudié l'interaction des protéines VDAC34 et VDAC36 avec les ARNt. Il serait donc intéressant d'élargir l'étude à l'ensemble de la famille des protéines VDAC de

pomme de terre mais également à l'ensemble de la famille des protéines VDAC d'*A. thaliana*. Il faudra déterminer si un ou plusieurs isoformes de VDAC sont capables d'interagir avec les ARNt.

Il est possible que les différentes protéines VDAC aient des fonctions biologiques différentes. Pour déterminer *in vivo* si l'ensemble des VDAC participe ou non au transport des ARNt dans la mitochondrie, des études sur des plantes mutantes des différents isoformes de VDAC pourraient être envisagées. Des mutants d'insertion d'ADN-T sont actuellement disponibles dans l'équipe de H. Barbier-Brygoo (ISV, Paris). Une collaboration a été initiée avec N. Robert et G. Ephritikhine afin d'étudier le rôle des différentes VDAC mitochondriales dans le cadre de l'étude du transport des ARNt dans les mitochondries.

2.3 Etude des facteurs protéiques impliqués dans le mécanisme d'importation des ARNt

2.3.1 Au niveau de la membrane externe

D'après nos expériences, il semble que TOM20 et TOM40 ont un rôle dans la fixation des ARNt à la surface des mitochondries. Les résultats concernant TOM20-1 de pomme de terre et TOM20-3 d'*A. thaliana*, suggèrent que ces protéines n'interagissent pas directement avec l'ARNt. Toutefois, on ne peut pas exclure que d'autres isoformes de TOM20 interagissent directement avec les ARNt. Il faudrait donc déterminer si c'est le cas. Pour cela d'autres isoformes de TOM20 devront être sur exprimés et leur interaction sera étudiée par gel retard et/ou par northwestern. De même l'interaction des ARNt avec la protéine TOM40 de pomme de terre et d'*A. thaliana* devra aussi être étudiée.

Une autre possibilité pour expliquer l'absence d'interaction de TOM20 avec les ARNt est que cette interaction se fasse par l'intermédiaire d'une autre protéine. Il serait donc intéressant d'identifier d'autres partenaires protéiques impliqués dans l'importation des ARNt interagissant soit avec TOM20 et/ou TOM40 pour former le récepteur des ARNt, soit avec VDAC pour former un complexe d'importation au niveau de la membrane externe. Pour cela différentes approches sont envisageables.

-Tout d'abord, nous pourrions tenter d'immunoprécipiter des complexes protéiques à l'aide des anticorps dirigés contre TOM20, TOM40 ou VDAC.

-Une deuxième approche, *in vivo*, pourrait être envisagée en immunoprécipitant des complexes à partir d'extraits protéiques provenant de plantes mutantes transformées avec nos protéines d'intérêt exprimées en fusion avec des tag.

-Une troisième approche de type protéomique permettant d'identifier le complexe récepteur des ARNt à la surface mitochondriale serait d'effectuer un cross-link des ARN sur des mitochondries intactes. Ensuite les membranes externes de la mitochondrie seraient récupérées et les complexes seraient alors séparés par des gels de type Bleu Natif. Une fois les complexes identifiés, les protéines qui les composent pourraient être identifiées par spectrométrie de masse de type MALDI TOF ou MS/MS.

-Finalement une approche pour identifier des partenaires protéiques de TOM20, de TOM40 et de VDAC pourrait consister en l'utilisation de méthodes de type double hybride. Des banques d'ADNc pourront ainsi être criblées en utilisant nos protéines d'intérêt comme appâts. La méthode dite de « split-ubiquitin » (Obrdlik et al., 2004) spécialement adaptée à la détection d'interactions entre protéines membranaires pourrait donner des résultats intéressants.

2.3.2 Au niveau de la membrane interne

Au niveau de la membrane interne, nous ignorons le mécanisme d'importation des ARNt. Des expériences de northwestern ont permis d'identifier le transporteur ADP/ATP (ANT) comme pouvant interagir avec les ARNt. Nos expériences d'importation *in vitro* en présence d'inhibiteurs du canal semblent indiquer que l'ANT n'est pas impliquée dans l'importation des ARNt dans la mitochondrie. Toutefois, ces premiers résultats devront être confirmés soit par des expériences d'importation *in vitro* avec des mitoplastes en présence d'anticorps dirigés contre l'ANT, soit par des expériences de compétition en présence d'ADP qui est un substrat naturel de l'ANT.

Nos expériences de northwestern ont également permis d'identifier la sous unité γ de l'ATP synthase comme pouvant interagir avec les ARNt. Dans un premier temps, il faudra confirmer l'interaction de cette protéine avec les ARNt par northwestern et ou gel retard. Ensuite, si ces premiers résultats sont confirmés, il faudra étudier la possible implication de cette protéine dans l'importation des ARNt dans la mitochondrie. Comme la sous unité γ de l'ATP synthase est localisée au cœur du complexe V, il est difficile d'imaginer comment elle pourrait interagir avec l'ARNt dans ce complexe. Il serait donc intéressant de

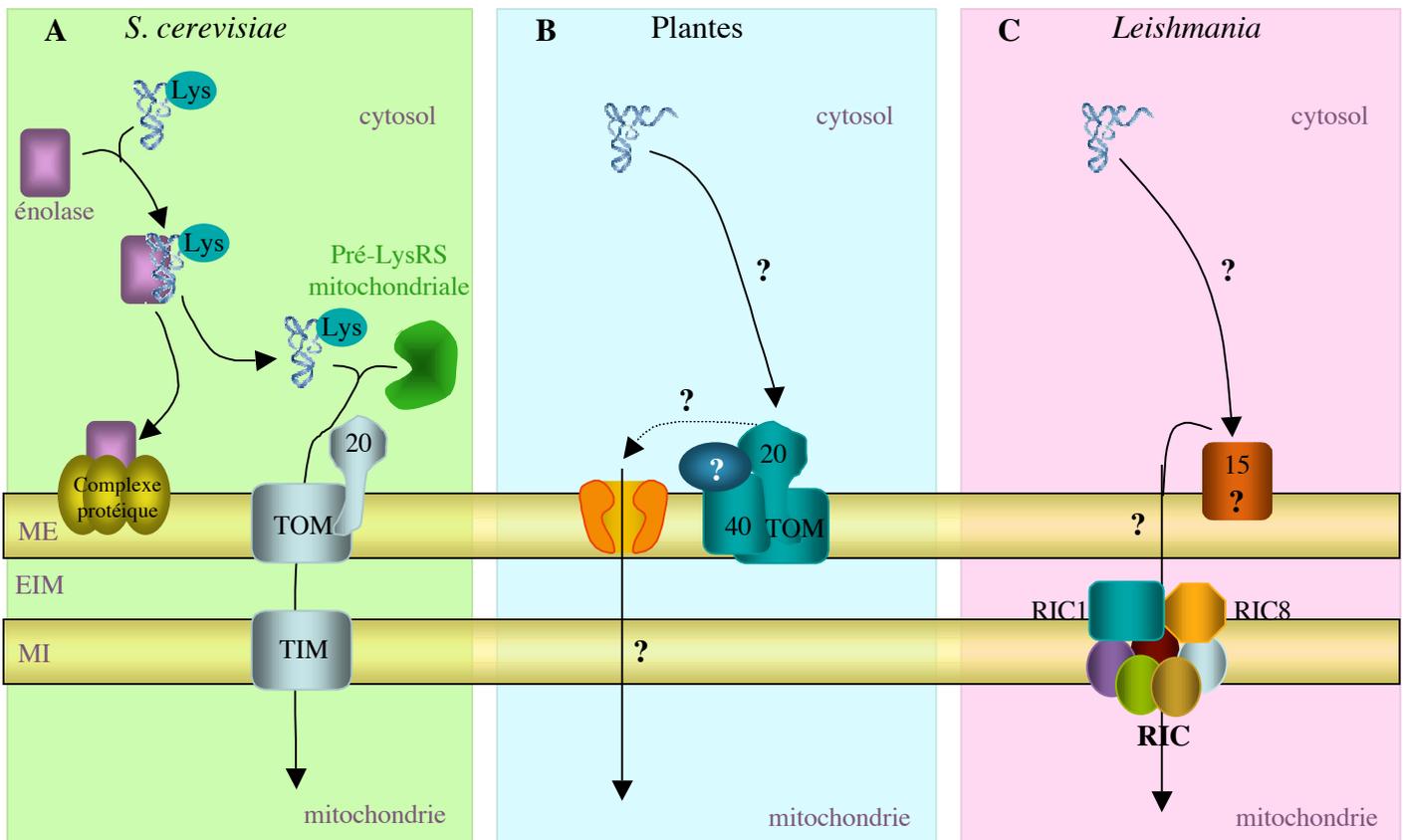


Figure 47 : Modèles des trois systèmes d'importation des ARNt dans les mitochondries

A : Modèle d'importation chez *S. cerevisiae*

Lys : lysine; pré-LysRS mitochondriale : précurseur de la lysyl-ARNt synthétase mitochondriale.
 20 : sous-unité TOM20 du complexe TOM d'importation des des protéines.

B : Modèle d'importation chez les plantes

20 et 40 : sous-unités TOM20 et TOM40 respectivement du complexe TOM d'importation des protéines.

C : Modèle d'importation chez *Leishmania*

15 : récepteur de 15 kDa non identifié; RIC : «RNA Import Complex»; RIC1 : sous-unité du complexe RIC homologue à la sous unité β de l'ATP synthase; RIC8 : sous-unité du complexe RIC homologue à la sous-unité 6b de la cytochrome *c* réductase

Les points d'interrogations indiquent des éléments encore inconnus dans les modèles

voir si cette protéine pourrait se trouver dans un autre complexe, comme cela a été montré pour le complexe RIC chez *Leishmania* qui comporte des protéines de la chaîne respiratoire (Chatterjee et al., 2006; Goswami et al., 2006).

Pour identifier un tel complexe, une approche serait d'utiliser une colonne d'affinité contenant un ARNt comme cela a été fait par Bhattacharyya et col., pour identifier le complexe RIC chez *Leishmania* (Bhattacharyya et al., 2003). Une autre approche serait aussi d'effectuer un cross-link des ARN sur des mitoplastes et de séparer ensuite les complexes membranaires par des gels de type Bleu Natif. Si un tel complexe est identifié, il pourra être alors étudié par les mêmes méthodes que celles décrites pour la membrane externe.

3. Discussion générale : les systèmes d'importation des ARNt chez les différents organismes modèles.

Au début de cette étude, les informations concernant le mécanisme d'importation des ARNt dans la mitochondrie de plante étaient limitées. Maintenant, avec les résultats acquis au cours de cette thèse, il est possible de proposer un modèle de travail pour l'importation des ARNt dans les mitochondries végétales.

Bien que ce modèle soit encore parcellaire, il apporte une nouvelle vision du mécanisme d'importation des ARNt dans les mitochondries. En effet, jusqu'à maintenant seuls deux modèles de transport a priori très différents avaient été décrits :

Modèle de la levure *S. cerevisiae*

Ce modèle repose principalement sur l'étude de l'adressage de l'ARNt^{Lys} dans la mitochondrie (Figure 47A). Tout d'abord l'ARNt^{Lys} serait aminoacylé par la lysyl-ARNt synthétase cytosolique. L'énolase fixerait alors la forme aminoacylée de l'ARNt^{Lys} dans le cytosol et acheminerait ce dernier vers la surface mitochondriale où se trouve la forme précurseur de la lysyl-ARNt synthétase mitochondriale. Cette dernière jouerait alors le rôle de transporteur pour le passage à travers les membranes mitochondriales via le canal d'importation des protéines.

Modèle du protozoaire *Leishmania*

Ce deuxième modèle correspond à un mécanisme de transport direct des ARNt dans les mitochondries qui se ferait par le biais de récepteurs membranaires (Figure 47C). Chez *Leishmania*, au niveau de la membrane externe, un récepteur de 15 kDa appelé TAB serait

| Protéines impliquées | <i>S. cerevisiae</i> | plantes | <i>Leishmania</i> |
|-------------------------------------|-----------------------------|----------------|--------------------------|
| Aminoacyl-ARNt synthétase | oui | oui | non |
| Enolase | oui | n.d | n.d |
| Protéines du complexe TOM | oui | oui | n.d |
| VDAC | n.d | oui | n.d |
| Protéines du complexe TIM | oui | n.d | n.d |
| ANT | n.d | non? | n.d |
| Protéines de la chaîne respiratoire | n.d | n.d | oui |

Table 9: Bilan des systèmes d'importation d'ARNt dans la mitochondrie des trois organismes modèles

n.d : non déterminé

? : les premiers résultats obtenus devront être confirmés par d'autres expériences

impliqué dans la fixation des ARNt. Au niveau de la membrane interne, le passage des ARNt se ferait par un complexe protéique appelé RIC dont deux des composants ont été identifiés comme des homologues de sous-unités des complexes respiratoires.

Modèle des plantes

Dans notre modèle (Figure 47B), la fixation des ARNt à la surface mitochondriale se ferait par un complexe protéique comprenant des protéines du complexe TOM, TOM20 et TOM40. Le passage des ARNt à travers la membrane externe se ferait ensuite par le pore formé par la protéine VDAC. Le passage à travers la membrane interne reste pour l'instant inconnu.

Ce modèle proposé chez les plantes présente la particularité de partager des caractéristiques avec les deux modèles précédents :

Plantes et protozoaires

Le transport des ARNt chez les plantes ressemble à celui des protozoaires, par le fait que l'importation d'ARNt dans les mitochondries de plante ne nécessite pas la présence de facteurs cytosoliques *in vitro*. De plus, pour ces deux modèles des expériences de compétition *in vitro* montrent que l'importation des protéines et l'importation des ARNt se fait par des voies différentes.

Plantes et la levure

Le modèle d'importation d'ARNt des plantes partage des éléments avec celui de la levure car dans l'un comme dans l'autre la protéine TOM20 ainsi que les aminoacyl-ARNt synthétases jouent un rôle important dans l'importation. Chez la levure, la protéine TOM20 participe à l'ancrage de la lysyl-ARNt synthétase mitochondriale associée à l'ARNt^{Lys} au niveau du complexe TOM permettant ensuite le transport de l'ARNt à travers les membranes. Chez les plantes, la protéine TOM20 est impliquée dans la fixation des ARNt, par contre elle ne semble pas jouer un rôle direct. Par ailleurs, chez les plantes l'ensemble des données obtenues *in vivo* suggèrent fortement que les aminoacyl-ARNt synthétases ont un rôle important dans l'importation des ARNt, mais nous ignorons toujours à quel niveau ces protéines interviennent dans l'importation.

Actuellement, il est encore difficile d'avoir une vision globale des différents modèles d'importation des ARNt dans les mitochondries car chaque modèle concerne des aspects différents du mécanisme (Figure 47 et Table 9). En effet, chez les levures, c'est l'adressage des ARNt à la surface mitochondriale qui a été le mieux décrit. Chez les protozoaires, les études publiées décrivent principalement le passage des ARNt à travers la membrane

interne mitochondriale. Chez les plantes, mes travaux de thèse ont permis de comprendre comment l'ARNt franchissait la membrane externe des mitochondries. Par conséquent, il n'est pas simple de déterminer les caractéristiques communes et les différences entre les systèmes d'importation des ARNt des différents organismes.

Par exemple, chez *Leishmania*, une protéine de 15 kDa interagissant avec les ARNt à la surface mitochondriale a été mise en évidence mais pas identifiée (Adhya et al., 1997). Nous ne pouvons pas exclure la possibilité que cette protéine soit en réalité un orthologue de TOM20 car aucune protéine du complexe TOM n'a été caractérisée à ce jour chez les protozoaires. De plus, aucune donnée n'existe quant au passage des ARNt à travers la membrane externe. Il est donc possible que la protéine VDAC soit également impliquée dans le passage à travers la membrane externe chez les protozoaires comme cela a été démontré pour les plantes.

D'autre part, dans le modèle de la levure, l'ARNt^{Lys} est acheminé jusqu'à la mitochondrie par l'énolase. Au niveau de la surface mitochondriale, l'ARNt^{Lys} est pris en charge par la lysyl-ARNt synthétase mitochondriale et l'énolase intègre alors un complexe protéique se trouvant sur la membrane externe (Figure 47A). Les travaux d'I. Brandina ont montré que parmi les protéines composant ce complexe protéique, on trouvait la protéine VDAC de levure (Brandina, 2006). Pour l'instant aucune étude n'a été effectuée afin de savoir si la protéine VDAC pouvait avoir un rôle dans le transport de l'ARNt^{Lys} mais il serait tout de même intéressant de l'étudier. Par ailleurs, les travaux de Rinehart et *col.*, ont récemment décrit l'importation *in vitro* de deux ARNt^{Gln} chez la levure. Or, contrairement à ce qui a été démontré pour l'ARNt^{Lys}, il semble que pour l'importation de ces deux ARNt^{Gln} aucun facteur cytosolique ne soit nécessaire *in vitro* (Rinehart et al., 2005). Ainsi, l'importation de ces deux isoaccepteurs ressemblerait d'avantage à ce qui a été décrit pour les plantes et les protozoaires qu'à ce qui a été décrit pour l'importation de l'ARNt^{Lys} de levure.

Il est intéressant de noter que ces trois organismes impliquent dans leur système d'importation des ARNt des protéines multifonctionnelles. Il s'agit de l'énolase, une protéine essentielle de la glycolyse et les protéines de la machinerie d'importation des protéines dans le cas de la levure (Tarassov et al., 1995a; Entelis et al., 2006). Chez les trypanosomes, le complexe RIC dans la membrane interne implique des protéines de la chaîne respiratoire (Chatterjee et al., 2006; Goswami and Adhya, 2006). Chez les plantes, la protéine VDAC connue pour être un transporteur de métabolites et des protéines du

complexe TOM sont également impliquées (Salinas et al., 2006). Il est donc possible que ces organismes aient développé différents systèmes d'importation en recrutant des protéines déjà connues pour avoir une autre fonction.

Dans le futur, une meilleure connaissance des différents complexes d'importation d'ARNt permettra de déterminer si les mécanismes d'importation sont similaires ou non entre les différentes espèces. Ceci permettra d'avoir une vision plus globale de l'évolution du mécanisme d'importation des ARNt.

4. Importation des ARNt et voies thérapeutiques humaines

La connaissance des mécanismes d'importation des ARNt est d'autant plus intéressante qu'elle ouvre des possibilités dans le traitement de maladies humaines. En effet, un grand nombre de maladies humaines liées à des dégénérescences musculaires sont associées à des mutations de gènes mitochondriaux soit codant pour des protéines, soit codant pour de ARNt (Naviaux, 2000). Pour palier à ces défauts, une possibilité serait d'importer les ARNt cytosoliques fonctionnels pour remplacer les ARNt mitochondriaux défectueux ou bien importer des ARNt supprimeurs pour compléter les mutations dans les gènes structuraux. Pour cela, une possibilité serait de détourner les machineries d'importation d'ARNt d'autres espèces pour permettre l'importation d'ARNt dans la mitochondrie humaine qui normalement n'en n'importe pas. Des expériences *in vitro* ont montré qu'il était possible non seulement d'importer l'ARNt^{Lys} dans les mitochondries humaines en présence d'un extrait cytosolique de levure mais aussi que cet ARNt importé était capable d'intervenir dans la traduction mitochondriale dans la cellule humaine (Kolesnikova et al., 2000). De plus, des expériences sur des cellules « cybrides » MERRF (pour « Myoclonique Epilepsy with Ragged Red Fibers » qui est une maladie génétique causée par une mutation dans le gène de l'ARNt^{Lys} mitochondrial) transformées avec l'ARNt^{Lys} de levure, ont montré que ce dernier pouvaient être importé dans la mitochondrie et que cette importation pouvait partiellement restaurer le fonctionnement de la mitochondrie (Kolesnikova et al., 2002). D'autre part, le groupe de S. Adhya, a montré que le complexe RIC incorporé dans les mitochondries humaines permettait d'importer des ARNt dans les mitochondries de ces cellules (Mahata et al., 2005). Plus récemment, des études ont montré que ce même complexe pouvait être incorporé dans les cellules

humaines par endocytose et une fois à l'intérieur, il pouvait être intégré dans les membranes mitochondriales pour induire l'importation d'ARNt (Mahata et al., 2006).

Ainsi l'exploitation de mécanismes d'importation d'ARNt d'autres organismes ouvre la voie à de nombreuses applications biomédicales.

BIBLIOGRAPHIE

- Abelson, J., Trotta, C.R., and Li, H. (1998). tRNA splicing. *J Biol Chem* **273**, 12685-12688.
- Adams, K.L., and Palmer, J.D. (2003). Evolution of mitochondrial gene content: gene loss and transfer to the nucleus. *Mol Phylogenet Evol* **29**, 380-395.
- Adams, K.L., Qiu, Y.L., Stoutemyer, M., and Palmer, J.D. (2002). Punctuated evolution of mitochondrial gene content: high and variable rates of mitochondrial gene loss and transfer to the nucleus during angiosperm evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 9905-9912.
- Adams, V., Griffin, L., Towbin, J., Gelb, B., Worley, K., and McCabe, E.R. (1991). Porin interaction with hexokinase and glycerol kinase: metabolic microcompartmentation at the outer mitochondrial membrane. *Biochem Med Metab Biol* **45**, 271-291.
- Adhya, S., Ghosh, T., Das, A., Bera, S.K., and Mahapatra, S. (1997). Role of an RNA-binding protein in import of tRNA into *Leishmania* mitochondria. *J Biol Chem* **272**, 21396-21402.
- Akashi, K., Takenaka, M., Yamaoka, S., Suyama, Y., Fukuzawa, H., and Ohyama, K. (1998). Coexistence of nuclear DNA-encoded tRNA^{Val}(AAC) and mitochondrial DNA-encoded tRNA^{Val}(UAC) in mitochondria of a liverwort *Marchantia polymorpha*. *Nucleic Acids Research* **26**, 2168-2172.
- Akashi, K., Hirayama, J., Takenaka, M., Yamaoka, S., Suyama, Y., Fukuzawa, H., and Ohyama, K. (1997). Accumulation of nuclear-encoded tRNA(Thr) (AGU) in mitochondria of the liverwort *Marchantia polymorpha*. *Biochim Biophys Acta* **1350**, 262-266.
- Al Bitar, F., Roosens, N., Smeyers, M., Vauterin, M., Van Boxtel, J., Jacobs, M., and Homble, F. (2003). Sequence analysis, transcriptional and posttranscriptional regulation of the rice *vdac* family. *Biochim Biophys Acta* **1625**, 43-51.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Watson, J.D. (1995). *Biologie moléculaire de la cellule*.
- Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., de Bruijn, M.H., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F., Schreier, P.H., Smith, A.J., Staden, R., and Young, I.G. (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* **290**, 457-465.
- Andersson, S.G., Zomorodipour, A., Andersson, J.O., Sicheritz-Ponten, T., Alsmark, U.C., Podowski, R.M., Naslund, A.K., Eriksson, A.S., Winkler, H.H., and Kurland, C.G. (1998a). The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature* **396**, 133-140.
- Andersson, S.G.E., Zomorodipour, A., Andersson, J.O., Sicherits-Ponten, T., Alsmark, U.C.M., Podowski, R.M., Näslund, A.K., Eriksson, A.-S., Winkler, H.H., and Kurland, C.G. (1998b). The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature* **396**, 133-140.
- Andre, C., Levy, A., and Walbot, V. (1992). Small Repeated Sequences and the Structure of Plant Mitochondrial Genomes. *Trends Genet* **8**, 128-132.
- Arco, A.D., and Satrustegui, J. (2005). New mitochondrial carriers: an overview. *Cell Mol Life Sci* **62**, 2204-2227.

- Backert, S., B.L., N., and Börner, T.** (1997). The mystery of the rings : structure and replication of mitochondrial genomes from higher plants. *Trends in Plant Sci.* **2**, 477-483.
- Balk, J., and Leaver, C.J.** (2001). The PET1-CMS mitochondrial mutation in sunflower is associated with premature programmed cell death and cytochrome c release. *Plant Cell* **13**, 1803-1818.
- Bartholomew, B., Kassavetis, G.A., Braun, B.R., and Geiduschek, E.P.** (1990). The subunit structure of *Saccharomyces cerevisiae* transcription factor IIIc probed with a novel photocrosslinking reagent. *Embo J* **9**, 2197-2205.
- Bay, D.C., and Court, D.A.** (2002). Origami in the outer membrane: the transmembrane arrangement of mitochondrial porins. *Biochem Cell Biol* **80**, 551-562.
- Beagley, C.T., Okimoto, R., and Wolstenholme, D.R.** (1998). The mitochondrial genome of the sea anemone *Metridium senile* (Cnidaria): introns, a paucity of tRNA genes, and a near-standard genetic code. *Genetics* **148**, 1091-1108.
- Bhattacharyya, A., and Adhya, S.** (2004a). The complexity of mitochondrial tRNA import. *RNA biology* **1**, 84-88.
- Bhattacharyya, S.N., and Adhya, S.** (2004b). tRNA-triggered ATP hydrolysis and generation of membrane potential by the leishmania mitochondrial tRNA import complex. *J Biol Chem* **279**, 11259-11263.
- Bhattacharyya, S.N., Mukherjee, S., and Adhya, S.** (2000). Mutations in a tRNA import signal define distinct receptors at the two membranes of *Leishmania* mitochondria. *Mol Cell Biol* **20**, 7410-7417.
- Bhattacharyya, S.N., Chatterjee, S., and Adhya, S.** (2002). Mitochondrial RNA import in *Leishmania tropica*: aptamers homologous to multiple tRNA domains that interact cooperatively or antagonistically at the inner membrane. *Mol Cell Biol* **22**, 4372-4382.
- Bhattacharyya, S.N., Chatterjee, S., Goswami, S., Tripathi, G., Dey, S.N., and Adhya, S.** (2003). "Ping-pong" interactions between mitochondrial tRNA import receptors within a multiprotein complex. *Mol Cell Biol* **23**, 5217-5224.
- Blachly-Dyson, E., Zambronicz, E.B., Yu, W.H., Adams, V., McCabe, E.R., Adelman, J., Colombini, M., and Forte, M.** (1993). Cloning and functional expression in yeast of two human isoforms of the outer mitochondrial membrane channel, the voltage-dependent anion channel. *J Biol Chem* **268**, 1835-1841.
- Bligny, R., and Douce, R.** (1980). A precise localization of cardiolipin in plant cells. *Biochim Biophys Acta* **617**, 254-263.
- Bonen, L., and Brown, G.G.** (1993). Genetic plasticity and its consequences: perspectives on gene organization and expression in plant mitochondria. *Can. J. Bot.* **71**, 645-660.
- Bonitz, S.G., Berlani, R., Coruzzi, G., Li, M., Macino, G., Nobrega, F.G., Nobrega, M.P., Thalenfeld, B.E., and Tzagoloff, A.** (1980). Codon recognition rules in yeast mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**, 3167-3170.
- 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.
- Brandina, I.** (2006). Identification et rôle de nouveaux facteurs protéiques cytosoliques impliqués dans l'import d'ARNt dans les mitochondries de levure. In *Université Louis Pasteur Strasbourg I (Strasbourg: Université Louis Pasteur)*, pp. 115.
- Braun, H.P., and Schmitz, U.K.** (1999). The protein-import apparatus of plant mitochondria. *Planta* **209**, 267-274.

- Brubacher-Kauffmann, S., Marechal-Drouard, L., Cosset, A., Dietrich, A., and Duchene, A.M.** (1999). Differential import of nuclear-encoded tRNAGly isoacceptors into solanum Tuberosum mitochondria. *Nucleic Acids Research* **27**, 2037-2042.
- Bullerwell, C.E., and Gray, M.W.** (2004). Evolution of the mitochondrial genome: protist connections to animals, fungi and plants. *Curr Opin Microbiol* **7**, 528-534.
- Burger, G., and Lang, B.F.** (2003). Parallels in genome evolution in mitochondria and bacterial symbionts. *IUBMB Life* **55**, 205-212.
- Carneiro, V., Dietrich, A., Maréchal-Drouard, L., Cosset, A., Pelletier, G., and Small, I.** (1994). Characterization of some major identity elements in plant alanine and phenylalanine transfer RNAs. *Plant Molecular Biology* **26**, 1843-1853.
- Cavalier-Smith, T.** (1987). Eukaryotes with no mitochondria. *Nature* **326**, 332-333.
- Chang, D.D., and Clayton, D.A.** (1989). Mouse RNAase MRP RNA is encoded by a nuclear gene and contains a decamer sequence complementary to a conserved region of mitochondrial RNA substrate. *Cell* **56**, 131-139.
- Chatterjee, S., Home, P., Mukherjee, S., Mahata, B., Goswami, S., Dhar, G., and Adhya, S.** (2006). An RNA-binding respiratory component mediates import of type II tRNAs into *Leishmania* mitochondria. *J Biol Chem.* **281**, 25270-25277.
- Chen, D.T., Shi, X., and Suyama, Y.** (1994). In vivo expression and mitochondrial import of normal and mutated tRNA^{thr} in *Leishmania*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **64**, 121-133.
- Chen, H.C., Viry-Moussaid, M., Dietrich, A., and Wintz, H.** (1997). Evolution of a mitochondrial tRNA PHE gene in *A. thaliana*: import of cytosolic tRNA PHE into mitochondria. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **237**, 432-437.
- Chevenet, F., Brun, C., Banuls, A.L., Jacq, B., and Christen, R.** (2006). TreeDyn: towards dynamic graphics and annotations for analyses of trees. *BMC Bioinformatics* **7**, 439.
- Chew, O., Lister, R., Qbadou, S., Heazlewood, J.L., Soll, J., Schleiff, E., Millar, A.H., and Whelan, J.** (2004). A plant outer mitochondrial membrane protein with high amino acid sequence identity to a chloroplast protein import receptor. *FEBS Lett* **557**, 109-114.
- Choisne, N., Martin-Canadell, A., and Small, I.** (1997). Transactivation of a target gene using a suppressor tRNA in transgenic tobacco plants. *Plant J* **11**, 597-604.
- Choisne, N., Carneiro, V.T., Pelletier, G., and Small, I.** (1998). Implication of 5'-flanking sequence elements in expression of a plant tRNA(Leu) gene. *Plant Molecular Biology* **36**, 113-123.
- Clifton, S.W., Minx, P., Fauron, C.M., Gibson, M., Allen, J.O., Sun, H., Thompson, M., Barbazuk, W.B., Kanuganti, S., Tayloe, C., Meyer, L., Wilson, R.K., and Newton, K.J.** (2004). Sequence and comparative analysis of the maize NB mitochondrial genome. *Plant Physiol* **136**, 3486-3503.
- Colombini, M.** (1989). Voltage gating in the mitochondrial channel, VDAC. *J Membr Biol* **111**, 103-111.
- Colombini, M., Blachly-Dyson, E., and Forte, M.** (1996). VDAC, a channel in the outer mitochondrial membrane. *Ion Channels* **4**, 169-202.
- Crausaz Esseiva, A., Marechal-Drouard, L., Cosset, A., and Schneider, A.** (2004). The T-stem determines the cytosolic or mitochondrial localization of trypanosomal tRNAs^{Met}. *Mol Biol Cell* **15**, 2750-2757.
- D'Andrea, L.D., and Regan, L.** (2003). TPR proteins: the versatile helix. *Trends Biochem Sci* **28**, 655-662.

- Dahlberg, J., and Lund, E.** (2005). tRNA turnaround. *Mol Cell* **19**, 292-294.
- Day, A., Millar, A.H., and Whelan, J.** (2004). *Plant mitochondria: From Genome to Function.* (Kluwer Academic Publishers).
- de Pinto, V., Prezioso, G., and Palmieri, F.** (1987). A simple and rapid method for the purification of the mitochondrial porin from mammalian tissues. *Biochim Biophys Acta* **905**, 499-502.
- De Pinto, V.D., and Palmieri, F.** (1992). Transmembrane arrangement of mitochondrial porin or voltage-dependent anion channel (VDAC). *J Bioenerg Biomembr* **24**, 21-26.
- Dekker, P.J., Martin, F., Maarse, A.C., Bomer, U., Muller, H., Guiard, B., Meijer, M., Rassow, J., and Pfanner, N.** (1997). The Tim core complex defines the number of mitochondrial translocation contact sites and can hold arrested preproteins in the absence of matrix Hsp70-Tim44. *Embo J* **16**, 5408-5419.
- Delage, L.** (2001). Etude du mécanisme d'importation des ARN de transfert dans les mitochondries de plante. In Université Louis Pasteur Strasbourg I (Strasbourg: Université Louis Pasteur).
- Delage, L., Duchene, A.M., Zaepfel, M., and Marechal-Drouard, L.** (2003a). The anticodon and the D-domain sequences are essential determinants for plant cytosolic tRNA(Val) import into mitochondria. *Plant J* **34**, 623-633.
- Delage, L., Dietrich, A., Cosset, A., and Marechal-Drouard, L.** (2003b). In vitro import of a nuclearly encoded tRNA into mitochondria of *Solanum tuberosum*. *Mol Cell Biol* **23**, 4000-4012.
- Dietrich, A., Marechal-Drouard, L., Carneiro, V., Cosset, A., and Small, I.** (1996a). A single base change prevents import of cytosolic tRNA(Ala) into mitochondria in transgenic plants. *Plant J* **10**, 913-918.
- Dietrich, A., Small, I., Cosset, A., Weil, J.H., and Marechal-Drouard, L.** (1996b). Editing and import: strategies for providing plant mitochondria with a complete set of functional transfer RNAs. *Biochimie* **78**, 518-529.
- Doersen, C.J., Guerrier-Takada, C., Altman, S., and Attardi, G.** (1985). Characterization of an RNase P activity from HeLa cell mitochondria. Comparison with the cytosol RNase P activity. *J Biol Chem* **260**, 5942-5949.
- Dolder, M., Zeth, K., Tittmann, P., Gross, H., Welte, W., and Wallimann, T.** (1999). Crystallization of the human, mitochondrial voltage-dependent anion-selective channel in the presence of phospholipids. *J Struct Biol* **127**, 64-71.
- Dorner, M., Altmann, M., Paabo, S., and Morl, M.** (2001). Evidence for import of a lysyl-tRNA into marsupial mitochondria. *Mol Biol Cell* **12**, 2688-2698.
- Duchêne, A.M., Giritch, A., Hoffmann, B., Cognat, V., Lancelin, D., Peeters, N.M., Zaepfel, M., Maréchal-Drouard, L., and Small, I.D.** (2005). Dual targeting is the rule for organellar aminoacyl-tRNA synthetases in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 16484-16489.
- Duchêne, A.M., and Maréchal-Drouard, L.** (2001). The chloroplast-derived *trnW* and *trnM-e* genes are not expressed in *Arabidopsis* mitochondria. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **285**, 1213-1216.
- Duchêne, A.M., Peeters, N., Dietrich, A., Cosset, A., D. Small, I., and Wintz, H.** (2001). Overlapping Destinations for Two Dual Targeted Glycyl-tRNA Synthetases in *Arabidopsis thaliana* and *Phaseolus vulgaris*. *The Journal of Biological Chemistry* **276**, 15275-15283.
- Dyall, S.D., Brown, M.T., and Johnson, P.J.** (2004). Ancient invasions: from endosymbionts to organelles. *Science* **304**, 253-257.

- Elkeles, A., Breiman, A., and Zizi, M.** (1997). Functional differences among wheat voltage-dependent anion channel (VDAC) isoforms expressed in yeast. Indication for the presence of a novel VDAC-modulating protein? *J Biol Chem* **272**, 6252-6260.
- Elkeles, A., Devos, K.M., Graur, D., Zizi, M., and Breiman, A.** (1995). Multiple cDNAs of wheat voltage-dependent anion channels (VDAC): isolation, differential expression, mapping and evolution. *Plant Molecular Biology* **29**, 109-124.
- Entelis, N., Brandina, I., Kamenski, P., Krasheninnikov, I.A., Martin, R.P., and Tarassov, I.** (2006). A glycolytic enzyme, enolase, is recruited as a cofactor of tRNA targeting toward mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* **20**, 1609-1620.
- Entelis, N., Kolesnikova, O., Kazakova, H., Brandina, I., Kamenski, P., Martin, R.P., and Tarassov, I.** (2002). Import of nuclear encoded RNAs into yeast and human mitochondria: experimental approaches and possible biomedical applications. *Genet Eng (N Y)* **24**, 191-213.
- Entelis, N.S., Krasheninnikov, I.A., Martin, R.P., and Tarassov, I.A.** (1996). Mitochondrial import of a yeast cytoplasmic tRNA (Lys): possible roles of aminoacylation and modified nucleosides in subcellular partitioning. *FEBS Lett* **384**, 38-42.
- Entelis, N.S., Kolesnikova, O.A., Martin, R.P., and Tarassov, I.A.** (2001a). RNA delivery into mitochondria. *Adv Drug Deliv Rev* **49**, 199-215.
- Entelis, N.S., Kieffer, S., Kolesnikova, O.A., Martin, R.P., and Tarassov, I.A.** (1998). Structural requirements of tRNA^{Lys} for its import into yeast mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 2838-2843.
- Entelis, N.S., Kolesnikova, O.A., Dogan, S., Martin, R.P., and Tarassov, I.A.** (2001b). 5 S rRNA and tRNA import into human mitochondria. Comparison of in vitro requirements. *J Biol Chem* **276**, 45642-45653.
- Escobar, M.A., Franklin, K.A., Svensson, A.S., Salter, M.G., Whitelam, G.C., and Rasmusson, A.G.** (2004). Light regulation of the Arabidopsis respiratory chain. Multiple discrete photoreceptor responses contribute to induction of type II NAD(P)H dehydrogenase genes. *Plant Physiol* **136**, 2710-2721.
- Evans, D., Marquez, S.M., and Pace, N.R.** (2006). RNase P: interface of the RNA and protein worlds. *Trends Biochem Sci* **31**, 333-341.
- Feagin, J.E.** (2000). Mitochondrial genome diversity in parasites. *Int J Parasitol* **30**, 371-390.
- Fey, J., Weil, J.H., Tomita, K., Cosset, A., Dietrich, A., Small, I., and Marechal-Drouard, L.** (2001). Editing of plant mitochondrial transfer RNAs. *Acta Biochimica Polonica* **48**, 383-389.
- Galli, G., Hofstetter, H., and Birnstiel, M.L.** (1981). Two conserved sequence blocks within eukaryotic tRNA genes are major promoter elements. *Nature* **294**, 626-631.
- Giegé, P., and Brennicke, A.** (1999). RNA editing in Arabidopsis mitochondria effects 441 C to U changes in ORFs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 15324-15329.
- Giegé, P., and Brennicke, A.** (2001). From gene to protein in higher plant mitochondria. *C R Acad Sci III* **324**, 209-217.
- Giegé, R., Sissler, M., and Florentz, C.** (1998). Universal rules and idiosyncratic features in tRNA identity. *Nucleic Acids Res.* **26**, 5017-5035.
- Gilkerson, R.W., Selker, J.M., and Capaldi, R.A.** (2003). The cristal membrane of mitochondria is the principal site of oxidative phosphorylation. *FEBS Lett* **546**, 355-358.

- Glover, K., and Gray, M.W.** (1994). The genetic origin of transfer RNAs in wheat mitochondria. In 4th International Society of Plant Molecular Biology Conference (Amsterdam).
- Glover, K.E., Spencer, D.F., and Gray, M.W.** (2001). Identification and structural characterization of nucleus-encoded transfer RNAs imported into wheat mitochondria. *J Biol Chem* **276**, 639-648.
- Goswami, S., and Adhya, S.** (2006). The alpha-subunit of Leishmania F1 ATP synthase hydrolyzes ATP in presence of tRNA. *J Biol Chem* **281**, 18914-18917.
- Goswami, S., Dhar, G., Mukherjee, S., Mahata, B., Chatterjee, S., Home, P., and Adhya, S.** (2006). A bifunctional tRNA import receptor from Leishmania mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 8354-8359.
- Gray, M.W.** (1999). Evolution of organellar genomes. *Curr Opin Genet Dev* **9**, 678-687.
- Gray, M.W., Burger, G., and Lang, B.F.** (1999). Mitochondrial evolution. *Science* **283**, 1476-1481.
- Gray, M.W., Burger, G., and Lang, B.F.** (2001). The origin and early evolution of mitochondria. *Genome Biol* **2**, REVIEWS1018.
- Grosshans, H., Simos, G., and Hurt, E.** (2000a). Review: transport of tRNA out of the nucleus-direct channeling to the ribosome? *J Struct Biol* **129**, 288-294.
- Grosshans, H., Hurt, E., and Simos, G.** (2000b). An aminoacylation-dependent nuclear tRNA export pathway in yeast. *Genes Dev* **14**, 830-840.
- Gualberto, J.M., Lamattina, L., Bonnard, G., Weil, J.H., and Grienenberger, J.M.** (1989). RNA editing in wheat mitochondria results in the conservation of protein sequences. *Nature* **341**, 660-662.
- Guindon, S., and Gascuel, O.** (2003). A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* **52**, 696-704.
- Guo, X.W., and Mannella, C.A.** (1993). Conformational change in the mitochondrial channel, VDAC, detected by electron cryo-microscopy. *Biophys J* **64**, 545-549.
- Hamel, P., Sakamoto, W., Wintz, H., and Dujardin, G.** (1997). Functional complementation of an oxal1- yeast mutation identifies an Arabidopsis thaliana cDNA involved in the assembly of respiratory complexes. *Plant J* **12**, 1319-1327.
- Handa, H.** (2003). The complete nucleotide sequence and RNA editing content of the mitochondrial genome of rapeseed (*Brassica napus* L.): comparative analysis of the mitochondrial genomes of rapeseed and *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Research* **31**, 5907-5916.
- Heazlewood, J.L., Whelan, J., and Millar, A.H.** (2003). The products of the mitochondrial orf25 and orfB genes are FO components in the plant F1FO ATP synthase. *FEBS Lett* **540**, 201-205.
- Hedtke, B., Legen, J., Weihe, A., Herrmann, R.G., and Borner, T.** (2002). Six active phage-type RNA polymerase genes in *Nicotiana tabacum*. *Plant J* **30**, 625-637.
- Heins, L., and Schmitz, U.K.** (1996). A receptor for protein import into potato mitochondria. *Plant J.* **9**, 829-839.
- Heins, L., Mentzel, H., Schmid, A., Benz, R., and Schmitz, U.K.** (1994). Biochemical, molecular, and functional characterization of porin isoforms from potato mitochondria. *J. Biol. Chem.* **269**, 26402-26410.
- Hiratsuka, J., Shimada, H., Whittier, R., Ishibashi, T., Sakamoto, M., Mori, M., Kondo, C., Honji, Y., Sun, C.R., Meng, B.Y., Li, Y.Q., Kanno, A., Nishikawa, Y., Hirai, A., Shinozaki, K., and Sugiura, M.** (1989). The complete sequence of the rice (*Oryza sativa*) chloroplast genome : Intermolecular recombination between distinct tRNA genes accounts for a major plastid DNA inversion during the evolution of cereals. *Mol. Gen. Genet.* **217**, 185-194.

- Hofstetter, H., Kressman, A., and Birnstiel, M.L.** (1981). A split promoter for a eucaryotic tRNA gene. *Cell* **24**, 573-585.
- Holden, M.J., and Colombini, M.** (1993). The outer mitochondrial membrane channel, VDAC, is modulated by a protein localized in the intermembrane space. *Biochim Biophys Acta* **1144**, 396-402.
- Holec, S., Lange, H., Kuhn, K., Alioua, M., Borner, T., and Gagliardi, D.** (2006). Relaxed transcription in Arabidopsis mitochondria is counterbalanced by RNA stability control mediated by polyadenylation and polynucleotide phosphorylase. *Mol Cell Biol* **26**, 2869-2876.
- Hopper, A.K., and Phizicky, E.M.** (2003). tRNA transfers to the limelight. *Genes Dev* **17**, 162-180.
- Janke, A., Xu, X., and Arnason, U.** (1997). The complete mitochondrial genome of the wallaroo (*Macropus robustus*) and the phylogenetic relationship among Monotremata, Marsupialia, and Eutheria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 1276-1281.
- Jansch, L., Krufft, V., Schmitz, U.K., and Braun, H.P.** (1998). Unique composition of the preprotein translocase of the outer mitochondrial membrane from plants. *J Biol Chem* **273**, 17251-17257.
- Jap, B.K., and Walian, P.J.** (1996). Structure and functional mechanism of porins. *Physiol Rev* **76**, 1073-1088.
- Kaneko, T., Suzuki, T., Kapushoc, S.T., Rubio, M.A., Ghazvini, J., Watanabe, K., and Simpson, L.** (2003). Wobble modification differences and subcellular localization of tRNAs in *Leishmania tarentolae*: implication for tRNA sorting mechanism. *Embo J* **22**, 657-667.
- Kapushoc, S.T., Alfonzo, J.D., and Simpson, L.** (2002). Differential localization of nuclear-encoded tRNAs between the cytosol and mitochondrion in *Leishmania tarentolae*. *RNA* **8**, 57-68.
- Kassavetis, G.A., Braun, B.R., Nguyen, L.H., and Geiduschek, E.P.** (1990). *S. cerevisiae* TFIIB is the transcription initiation factor proper of RNA polymerase III, while TFIIA and TFIIC are assembly factors. *Cell* **60**, 235-245.
- Kazakova, H.A., Entelis, N.S., Martin, R.P., and Tarassov, I.A.** (1999). The aminoacceptor stem of the yeast tRNA(Lys) contains determinants of mitochondrial import selectivity. *FEBS Lett* **442**, 193-197.
- Kiss, T., Marshallsay, C., and Filipowicz, W.** (1992). 7-2/MRP RNAs in plant and mammalian cells - association with higher order structures in the nucleolus. *EMBO J* **11**, 3737-3746.
- Klingenberg, M.** (1989). Molecular aspects of the adenine nucleotide carrier from mitochondria. *Arch Biochem Biophys* **270**, 1-14.
- Knoop, V., Unseld, M., Marienfeld, J., Brandt, P., Sunkel, S., Ullrich, H., and Brennicke, A.** (1996). Copia-, gypsy- and LINE-like retrotransposon fragments in the mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **142**, 579-585.
- Koebnik, R., Locher, K.P., and Van Gelder, P.** (2000). Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Mol Microbiol* **37**, 239-253.
- Kolesnikova, O., Entelis, N., Kazakova, H., Brandina, I., Martin, R.P., and Tarassov, I.** (2002). Targeting of tRNA into yeast and human mitochondria: the role of anticodon nucleotides. *Mitochondrion* **2**, 95-107.
- Kolesnikova, O.A., Entelis, N.S., Mireau, H., Fox, T.D., Martin, R.P., and Tarassov, I.A.** (2000). Suppression of mutations in mitochondrial DNA by tRNAs imported from the cytoplasm. *Science* **289**, 1931-1933.

- Koulintchenko, M., Konstantinov, Y., and Dietrich, A.** (2003). Plant mitochondria actively import DNA via the permeability transition pore complex. *EMBO J* **22**, 1245-1254.
- Kruszka, K., Barneche, F., Guyot, R., Ailhas, J., Meneau, I., Schiffer, S., Marchfelder, A., and Echeverria, M.** (2003). Plant dicistronic tRNA-snoRNA genes: a new mode of expression of the small nucleolar RNAs processed by RNase Z. *EMBO J* **22**, 621-632.
- Kubo, T., Nishizawa, S., Sugawara, A., Itchoda, N., Estiati, A., and Mikami, T.** (2000). The complete nucleotide sequence of the mitochondrial genome of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) reveals a novel gene for tRNA(Cys)(GCA). *Nucleic Acids Research* **28**, 2571-2576.
- Kuhn, K., Weihe, A., and Borner, T.** (2005). Multiple promoters are a common feature of mitochondrial genes in Arabidopsis. *Nucleic Acids Research* **33**, 337-346.
- Kumar, R., Maréchal-Drouard, L., Akama, K., and Small, I.** (1996). Striking differences in mitochondrial tRNA import between different plant species. *Mol. Gen. Genet.* **252**, 404-411.
- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Laforest, M.J., Roewer, I., and Lang, B.F.** (1997). Mitochondrial tRNAs in the lower fungus *Spizellomyces punctatus*: tRNA editing and UAG 'stop' codons recognized as leucine. *Nucleic Acids Research* **25**, 626-632.
- Laforest, M.J., Delage, L., and Marechal-Drouard, L.** (2005). The T-domain of cytosolic tRNA^{Val}, an essential determinant for mitochondrial import. *FEBS Lett* **579**, 1072-1078.
- Lagerkvist, U.** (1978). "Two out of three": an alternative method for codon reading. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**, 1759-1762.
- Lamattina, L., Gonzalez, D., Gualberto, J., and Grienenberger, J.M.** (1993). Higher plant mitochondria encode an homologue of the nuclear-encoded 30-kDa subunit of bovine mitochondrial complex I. *Eur J Biochem* **217**, 831-838.
- Lang, B.F., Burger, G., O'Kelly, C.J., Cedergren, R., Golding, G.B., Lemieux, C., Sankoff, D., Turmel, M., and Gray, M.W.** (1997). An ancestral mitochondrial DNA resembling a eubacterial genome in miniature. *Nature* **387**, 493-497.
- LeBlanc, A.J., YermovskyKammerer, A.E., and Hajduk, S.L.** (1999). A nuclear encoded and mitochondrial imported dicistronic tRNA precursor in *Trypanosoma brucei*. *J Biol Chem* **274**, 21071-21077.
- Lee, S.B., Kaittanis, C., Jansen, R.K., Hostetler, J.B., Tallon, L.J., Town, C.D., and Daniell, H.** (2006). The complete chloroplast genome sequence of *Gossypium hirsutum*: organization and phylogenetic relationships to other angiosperms. *BMC Genomics* **7**, 61.
- Li, K., Smagula, C.S., Parsons, W.J., Richardson, J.A., Gonzalez, M., Hagler, H.K., and Williams, R.S.** (1994). Subcellular partitioning of MRP RNA assessed by ultrastructural and biochemical analysis. *J. Cell Biol.* **124**, 871-882.
- Li-Pook-Than, J., and Bonen, L.** (2006). Multiple physical forms of excised group II intron RNAs in wheat mitochondria. *Nucleic Acids Research* **34**, 2782-2790.
- Likic, V.A., Perry, A., Hulett, J., Derby, M., Traven, A., Waller, R.F., Keeling, P.J., Koehler, C.M., Curran, S.P., Gooley, P.R., and Lithgow, T.** (2005). Patterns that define the four domains conserved in known and novel isoforms of the protein import receptor Tom20. *Journal of Molecular Biology* **347**, 81-93.
- Linden, M., and Karlsson, G.** (1996). Identification of porin as a binding site for MAP2. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **218**, 833-836.

- Lister, R., Hulett, J.M., Lithgow, T., and Whelan, J.** (2005). Protein import into mitochondria: origins and functions today (review). *Mol Membr Biol* **22**, 87-100.
- Liu, M.Y., and Colombini, M.** (1992). A soluble mitochondrial protein increases the voltage dependence of the mitochondrial channel, VDAC. *J Bioenerg Biomembr* **24**, 41-46.
- Liu, M.Y., Torgrimson, A., and Colombini, M.** (1994). Characterization and partial purification of the VDAC-channel-modulating protein from calf liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta* **1185**, 203-212.
- Lohan, A.J., and Wolfe, K.H.** (1998). A subset of conserved tRNA genes in plastid DNA of nongreen plants. *Genetics* **150**, 425-433.
- Lund, E., and Dahlberg, J.E.** (1998). Proofreading and aminoacylation of tRNAs before export from the nucleus. *Science* **282**, 2082-2085.
- Mackenzie, S., and McIntosh, L.** (1999). Higher plant mitochondria. *Plant Cell* **11**, 571-586.
- Magalhaes, P.J., Andreu, A.L., and Schon, E.A.** (1998). Evidence for the presence of 5S rRNA in mammalian mitochondria. *Mol Biol Cell* **9**, 2375-2382.
- Mahapatra, S., Ghosh, T., and Adhya, S.** (1994). Import of small RNAs into *Leishmania* mitochondria in vitro. *Nucleic Acids Research* **22**, 3381-3386.
- Mahata, B., Bhattacharyya, S.N., Mukherjee, S., and Adhya, S.** (2005). Correction of translational defects in patient-derived mutant mitochondria by complex-mediated import of a cytoplasmic tRNA. *J Biol Chem* **280**, 5141-5144.
- Mahata, B., Mukherjee, S., Mishra, S., Bandyopadhyay, A., and Adhya, S.** (2006). Functional delivery of a cytosolic tRNA into mutant mitochondria of human cells. *Science* **314**, 471-474.
- Maier, R.M., Neckermann, K., Igloi, G.L., and Kossel, H.** (1995). Complete sequence of the maize chloroplast genome: gene content, hotspots of divergence and fine tuning of genetic information by transcript editing. *Journal of Molecular Biology* **251**, 614-628.
- Main, E.R., Xiong, Y., Cocco, M.J., D'Andrea, L., and Regan, L.** (2003). Design of stable alpha-helical arrays from an idealized TPR motif. *Structure* **11**, 497-508.
- Mannella, C.A., Forte, M., and Colombini, M.** (1992). Toward the molecular structure of the mitochondrial channel, VDAC. *J Bioenerg Biomembr* **24**, 7-19.
- Mao, M., Fu, G., Wu, J.S., Zhang, Q.H., Zhou, J., Kan, L.X., Huang, Q.H., He, K.L., Gu, B.W., Han, Z.G., Shen, Y., Gu, J., Yu, Y.P., Xu, S.H., Wang, Y.X., Chen, S.J., and Chen, Z.** (1998). Identification of genes expressed in human CD34(+) hematopoietic stem/progenitor cells by expressed sequence tags and efficient full-length cDNA cloning. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 8175-8180.
- Maréchal-Drouard, L., Small, I., Weil, J.H., and Dietrich, A.** (1995). Transfer RNA import into plant mitochondria. *Methods Enzymol* **260**, 310-327.
- Maréchal-Drouard, L., Guillemaut, P., Cosset, A., Arbogast, M., Weber, F., Weil, J.H., and Dietrich, A.** (1990). Transfer RNAs of potato (*Solanum tuberosum*) mitochondria have different genetic origins. *Nucleic Acids Research* **18**, 3689-3696.
- Maréchal-Drouard, L., Khamiss, O., and Dietrich, A.** (1993). The potato mitochondrial initiator methionine transfer RNA gene and its flanking regions - an illustration of the diversity of mitochondrial genome rearrangements among plant species. *Plant Molecular Biology* **22**, 1157-1161.
- Marienfild, J., Unseld, M., and Brennicke, A.** (1999). The mitochondrial genome of *Arabidopsis* is composed of both native and immigrant information. *Trends Plant Sci* **4**, 495-502.

- Martin, J., Guryev, V., and Blinov, A.** (2002). Population variability in *Chironomus* (*Camptochironomus*) species (Diptera, Nematocera) with a Holarctic distribution: evidence of mitochondrial gene flow. *Insect Mol Biol* **11**, 387-397.
- Martin, R.P., Schneller, J.M., Stahl, A.J., and Dirheimer, G.** (1979). Import of nuclear deoxyribonucleic acid coded lysine-accepting transfer ribonucleic acid (anticodon C-U-U) into yeast mitochondria. *Biochemistry* **18**, 4600-4605.
- Martin, R.P., Sibley, A.P., Gehrke, C.W., Kuo, K., Edmonds, C.G., McCloskey, J.A., and Dirheimer, G.** (1990). 5-[[[carboxymethyl]amino]methyl]uridine is found in the anticodon of yeast mitochondrial tRNAs recognizing two-codon families ending in a purine. *Biochemistry* **29**, 956-959.
- Martin, W., Rotte, C., Hoffmeister, M., Theissen, U., Gelius-Dietrich, G., Ahr, S., and Henze, K.** (2003). Early cell evolution, eukaryotes, anoxia, sulfide, oxygen, fungi first (?), and a tree of genomes revisited. *IUBMB Life* **55**, 193-204.
- Millar, A.H., Heazlewood, J.L., Kristensen, B.K., Braun, H.P., and Moller, I.M.** (2005). The plant mitochondrial proteome. *Trends Plant Sci* **10**, 36-43.
- Mireau, H., Cosset, A., Marechal-Drouard, L., Fox, T.D., Small, I.D., and Dietrich, A.** (2000). Expression of *Arabidopsis thaliana* mitochondrial alanyl-tRNA synthetase is not sufficient to trigger mitochondrial import of tRNA^{Ala} in yeast. *J Biol Chem* **275**, 13291-13296.
- Moberg, P., Nilsson, S., Stahl, A., Eriksson, A.C., Glaser, E., and Maler, L.** (2004). NMR solution structure of the mitochondrial F1beta presequence from *Nicotiana plumbaginifolia*. *Journal of Molecular Biology* **336**, 1129-1140.
- Morden, C.W., Wolfe, K.H., dePamphilis, C.W., and Palmer, J.D.** (1991). Plastid translation and transcription genes in a non-photosynthetic plant: intact, missing and pseudo genes. *EMBO J* **10**, 3281-3288.
- Morl, M., and Marchfelder, A.** (2001). The final cut. The importance of tRNA 3'-processing. *EMBO Rep* **2**, 17-20.
- Mukherjee, S., Bhattacharyya, S.N., and Adhya, S.** (1999). Stepwise transfer of tRNA through the double membrane of *Leishmania* mitochondria. *J Biol Chem* **274**, 31249-31255.
- Muramatsu, T., Yokohama, S., Hirose, N., Matsuda, A., Ueda, T., Yamaizumi, Z., Kuchino, Y., Nishimura, S., and Miyasawa, T.** (1988). A novel lysine-substituted nucleoside in the first position of the anticodon of minor isoleucine tRNA from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **263**, 9261-9267.
- Nabholz, C.E., Horn, E.K., and Schneider, A.** (1999). tRNAs and proteins are imported into mitochondria of *Trypanosoma brucei* by two distinct mechanisms. *Mol Biol Cell* **10**, 2547-2557.
- Nakazono, M., and Hirai, A.** (1993). Identification of the entire set of transferred chloroplast DNA sequences in the mitochondrial genome of rice. *Mol. Gen. Genet.* **236**, 698-702.
- Naviaux, R.K.** (2000). Mitochondrial DNA disorders. *Eur J Pediatr* **159 Suppl 3**, S219-226.
- Negrutskii, B.S., and Deutscher, M.P.** (1991). Channeling of aminoacyl-tRNA for protein synthesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 4991-4995.
- Negrutskii, B.S., and El'skaia, A.V.** (2001). [Functional compartmentation of the translation apparatus and channeling of tRNA/aminoacyl-tRNA in cells of higher eukaryotes]. *Mol Biol (Mosk)* **35**, 702-707.
- Neuburger, M., Journet, E.P., Bligny, R., Carde, J.P., and Douce, R.** (1982). Purification of plant mitochondria by isopycnic centrifugation in density gradients of Percoll. *Arch Biochem Biophys* **217**, 312-323.

- Nishikura, K., and De Robertis, E.M.** (1981). RNA processing in microinjected *Xenopus* oocytes. Sequential addition of base modifications in the spliced transfer RNA. *Journal of Molecular Biology* **145**, 405-420.
- Nollert, P.** (2005). Membrane protein crystallization in amphiphile phases: practical and theoretical considerations. *Prog Biophys Mol Biol* **88**, 339-357.
- Notsu, Y., Masood, S., Nishikawa, T., Kubo, N., Akiduki, G., Nakazono, M., Hirai, A., and Kadowaki, K.** (2002). The complete sequence of the rice (*Oryza sativa* L.) mitochondrial genome: frequent DNA sequence acquisition and loss during the evolution of flowering plants. *Mol Genet Genomics* **268**, 434-445.
- Nugent, J.M., and Palmer, J.D.** (1991). RNA-mediated transfer of the gene *coxII* from the mitochondrion to the nucleus during flowering plant evolution. *Cell* **66**, 473-481.
- Obrdlik, P., El-Bakkoury, M., Hamacher, T., Cappellaro, C., Vilarino, C., Fleischer, C., Ellerbrok, H., Kamuzinzi, R., Ledent, V., Blaudez, D., Sanders, D., Revuelta, J.L., Boles, E., Andre, B., and Frommer, W.B.** (2004). K⁺ channel interactions detected by a genetic system optimized for systematic studies of membrane protein interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 12242-12247.
- Oda, K., Yamato, K., Ohta, E., Nakamura, Y., Takemura, M., Nozato, N., Akashi, K., and Ohyama, K.** (1992). Transfer RNA genes in the mitochondrial genome from a liverwort, *Marchantia polymorpha*: the absence of chloroplast-like tRNAs. *Nucleic Acids Research* **20**, 3773-3777.
- Ogihara, Y., Yamazaki, Y., Murai, K., Kanno, A., Terachi, T., Shiina, T., Miyashita, N., Nasuda, S., Nakamura, C., Mori, N., Takumi, S., Murata, M., Futo, S., and Tsunewaki, K.** (2005). Structural dynamics of cereal mitochondrial genomes as revealed by complete nucleotide sequencing of the wheat mitochondrial genome. *Nucleic Acids Research* **33**, 6235-6250.
- Palmer, J.D., Adams, K.L., Cho, Y., Parkinson, C.L., Qiu, Y.L., and Song, K.** (2000). Dynamic evolution of plant mitochondrial genomes: mobile genes and introns and highly variable mutation rates. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 6960-6966.
- Papa, S., Zanotti, F., and Gaballo, A.** (2000). The structural and functional connection between the catalytic and proton translocating sectors of the mitochondrial F1F0-ATP synthase. *J Bioenerg Biomembr* **32**, 401-411.
- Perrin, R., Meyer, E.H., Zaepfel, M., Kim, Y.J., Mache, R., Grienberger, J.M., Gualberto, J.M., and Gagliardi, D.** (2004). Two exoribonucleases act sequentially to process mature 3'-ends of *atp9* mRNAs in *Arabidopsis* mitochondria. *J Biol Chem* **279**, 25440-25446.
- Perry, A.J., Hulett, J.M., Likic, V.A., Lithgow, T., and Gooley, P.R.** (2006). Convergent evolution of receptors for protein import into mitochondria. *Curr Biol* **16**, 221-229.
- Perryman, R.A., Mooney, B., and Harmey, M.A.** (1995). Identification of a 42-kDa plant mitochondrial outer membrane protein, MOM42, involved in the import of precursor proteins into plant mitochondria. *Arch Biochem Biophys* **316**, 659-664.
- Pfützinger, H., Guillemaut, P., Weil, J.H., and Pillay, D.T.** (1987). Adjustment of the tRNA population to the codon usage in chloroplasts. *Nucleic Acids Research* **15**, 1377-1386.
- Picault, N., Hodges, M., Palmieri, L., and Palmieri, F.** (2004). The growing family of mitochondrial carriers in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci* **9**, 138-146.
- Placido, A., Gagliardi, D., Gallerani, R., Grienberger, J.M., and Marechal-Drouard, L.** (2005). Fate of a larch unedited tRNA precursor expressed in potato mitochondria. *J Biol Chem* **280**, 33573-33579.

- Raczynska, K.D., Le Ret, M., Rurek, M., Bonnard, G., Augustyniak, H., and Gualberto, J.M.** (2006). Plant mitochondrial genes can be expressed from mRNAs lacking stop codons. *FEBS Lett* **580**, 5641-5646.
- Rasmusson, A.G., Soole, K.L., and Elthon, T.E.** (2004). Alternative NAD(P)H dehydrogenases of plant mitochondria. *Annu Rev Plant Biol* **55**, 23-39.
- Rehling, P., Brandner, K., and Pfanner, N.** (2004). Mitochondrial import and the twin-pore translocase. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 519-530.
- Rinehart, J., Krett, B., Rubio, M.A., Alfonzo, J.D., and Soll, D.** (2005). *Saccharomyces cerevisiae* imports the cytosolic pathway for Gln-tRNA synthesis into the mitochondrion. *Genes Dev* **19**, 583-592.
- Rivera, M.C., and Lake, J.A.** (2004). The ring of life provides evidence for a genome fusion origin of eukaryotes. *Nature* **431**, 152-155.
- Rostovtseva, T., and Colombini, M.** (1996). ATP flux is controlled by a voltage-gated channel from the mitochondrial outer membrane. *J Biol Chem* **271**, 28006-28008.
- Rostovtseva, T.K., Antonsson, B., Suzuki, M., Youle, R.J., Colombini, M., and Bezrukov, S.M.** (2004). Bid, but not Bax, regulates VDAC channels. *J Biol Chem* **279**, 13575-13583.
- Rubio, M.A., Liu, X., Yuzawa, H., Alfonzo, J.D., and Simpson, L.** (2000). Selective importation of RNA into isolated mitochondria from *Leishmania tarentolae*. *RNA* **6**, 988-1003.
- Rudhe, C., Chew, O., Whelan, J., and Glaser, E.** (2002). A novel in vitro system for simultaneous import of precursor proteins into mitochondria and chloroplasts. *Plant J* **30**, 213-220.
- Rusconi, C.P., and Cech, T.R.** (1996a). The anticodon is the signal sequence for mitochondrial import of glutamine tRNA in *Tetrahymena*. *Genes and Dev* **10**, 2870-2880.
- Rusconi, C.P., and Cech, T.R.** (1996b). Mitochondrial import of only one of three nuclear-encoded glutamine tRNAs in *Tetrahymena thermophila*. *EMBO J.* **15**, 3286-3295.
- Sakamoto, W., Spielwoy, N., Bonnard, G., Murata, M., and Wintz, H.** (2000). Mitochondrial localization of AtOXA1, an arabidopsis homologue of yeast Oxa1p involved in the insertion and assembly of protein complexes in mitochondrial inner membrane. *Plant and Cell Physiology* **41**, 1157-1163.
- Salinas, T., Duchêne, A.-M., Delage, L., Nilsson, E., Glaser, E., Zaepfel, M., and Marechal-Drouard, L.** (2006). The Voltage-Dependent Anion Channel, a major component of the tRNA import machinery in plant mitochondria. *Proc Acad Natl Sci sous presse*.
- Sampson, M.J., Lovell, R.S., and Craigen, W.J.** (1996). Isolation, characterization, and mapping of two mouse mitochondrial voltage-dependent anion channel isoforms. *Genomics* **33**, 283-288.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
- Sarkar, S., Azad, A.K., and Hopper, A.K.** (1999). Nuclear tRNA aminoacylation and its role in nuclear export of endogenous tRNAs in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 14366-14371.
- Sbicego, S., Nabholz, C.E., Hauser, R., Blum, B., and Schneider, A.** (1998). In vivo import of unspliced tRNA^{Tyr} containing synthetic introns of variable length into mitochondria of *Leishmania tarentolae*. *Nucleic Acids Research* **26**, 5251-5255.

- Schagger, H., and von Jagow, G.** (1991). Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Analytical Biochemistry* **199**, 223-231.
- Scheffler, I.E.** (1999). *Mitochondria*. (John Wiley & Sons).
- Schlame, M., and Greenberg, M.L.** (1997). Cardiolipin synthase from yeast. *Biochim Biophys Acta* **1348**, 201-206.
- Schneider, A., and Marechal-Drouard, L.** (2000). Mitochondrial tRNA import: are there distinct mechanisms? *Trends Cell Biol* **10**, 509-513.
- Schneider, A., Martin, J., and Agabian, N.** (1994). A nuclear-encoded tRNA of *Trypanosoma brucei* is imported into mitochondria. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 2317-2322.
- Shaheen, H.H., and Hopper, A.K.** (2005). Retrograde movement of tRNAs from the cytoplasm to the nucleus in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 11290-11295.
- Sherrer, R.L., Yermovsky-Kammerer, A.E., and Hajduk, S.L.** (2003). A sequence motif within trypanosome precursor tRNAs influences abundance and mitochondrial localization. *Mol Cell Biol* **23**, 9061-9072.
- Sickmann, A., Reinders, J., Wagner, Y., Joppich, C., Zahedi, R., Meyer, H.E., Schonfisch, B., Perschil, I., Chacinska, A., Guiard, B., Rehling, P., Pfanner, N., and Meisinger, C.** (2003). The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 13207-13212.
- Sissler, M., Helm, M., Frugier, M., Giegé, R., and Florentz, C.** (2004). Aminoacylation properties of pathology-related human mitochondrial tRNA(Lys) variants. *Rna* **10**, 841-853.
- Small, I., Marechal-Drouard, L., Masson, J., Pelletier, G., Cosset, A., Weil, J.H., and Dietrich, A.** (1992). In vivo import of a normal or mutagenized heterologous transfer RNA into the mitochondria of transgenic plants: towards novel ways of influencing mitochondrial gene expression? *Embo J* **11**, 1291-1296.
- Soidla, T.R.** (1983). [Possible role of tRNA^{Lys} in the splicing of mitochondrial transcripts in yeasts]. *Mol Biol (Mosk)* **17**, 1154-1161.
- Söll, D., and RajBhandary, U.** (1995). *tRNA : Structure, Biosynthesis and Function*. (Washington, D.C.: ASM Press).
- Somasundaran, M., Zapp, M.L., Beattie, L.K., Pang, L., Byron, K.S., Bassell, G.J., Sullivan, J.L., and Singer, R.H.** (1994). Localization of HIV RNA in mitochondria of infected cells: potential role in cytopathogenicity. *J. Cell Biol.* **126**, 1353-1360.
- Souciet, G., Dietrich, A., Colas, B., Razafimahatratra, P., and Weil, J.H.** (1982). Purification and properties of chloroplast leucyl-tRNA synthetase from a higher plant: *Phaseolus vulgaris*. *J Biol Chem* **257**, 9598-9604.
- Sprinzl, M., Horn, C., Brown, M., Ioudovitch, A., and Steinberg, S.** (1998). Compilation of tRNA sequences and sequences of tRNA genes. *Nucleic Acids Research* **26**, 148-153.
- Stern, D.B., Dyer, T.A., and Lonsdale, D.M.** (1982). Organization of the mitochondrial ribosomal RNA genes of maize. *Nucleic Acids Res.* **10**, 3333-3340.
- Sugiyama, Y., Watase, Y., Nagase, M., Makita, N., Yagura, S., Hirai, A., and Sugiura, M.** (2005). The complete nucleotide sequence and multipartite organization of the tobacco mitochondrial genome: comparative analysis of mitochondrial genomes in higher plants. *Mol Genet Genomics* **272**, 603-615.
- Suyama, Y.** (1967). The origins of mitochondrial ribonucleic acids in *Tetrahymena pyriformis*. *Biochemistry* **6**, 2829-2839.

- Suyama, Y., Wong, S., and Campbell, D.A.** (1998). Regulated tRNA import in *Leishmania* mitochondria. *Biochim Biophys Acta* **1396**, 138-142.
- Sylvestre, J., Vialette, S., Corral Debrinski, M., and Jacq, C.** (2003). Long mRNAs coding for yeast mitochondrial proteins of prokaryotic origin preferentially localize to the vicinity of mitochondria. *Genome Biol* **4**, R44.
- Szabo, I., Bathori, G., Tombola, F., Coppola, A., Schmehl, I., Brini, M., Ghazi, A., De Pinto, V., and Zoratti, M.** (1998). Double-stranded DNA can be translocated across a planar membrane containing purified mitochondrial porin. *FASEB Journal* **12**, 495-502.
- Takano, A., Endo, T., and Yoshihisa, T.** (2005). tRNA actively shuttles between the nucleus and cytosol in yeast. *Science* **309**, 140-142.
- Tan, T.H., Pach, R., Crausaz, A., Ivens, A., and Schneider, A.** (2002). tRNAs in *Trypanosoma brucei*: genomic organization, expression, and mitochondrial import. *Mol Cell Biol* **22**, 3707-3717.
- Tarassov, I., Entelis, N., and Martin, R.P.** (1995a). An intact protein translocating machinery is required for mitochondrial import of a yeast cytoplasmic tRNA. *JMB* **245**, 315-323.
- Tarassov, I.A., and Entelis, N.S.** (1992). Mitochondrially-imported cytoplasmic tRNA(Lys)(CUU) of *Saccharomyces cerevisiae*: in vivo and in vitro targeting systems. *Nucleic Acids Research* **20**, 1277-1281.
- Tarassov, I.A., Entelis, N., and Martin, R.** (1995b). Mitochondrial import of a cytoplasmic lysine-tRNA in yeast is mediated by cooperation of cytoplasmic and mitochondrial lysyl-tRNA synthetases. *EMBO J.* **14**, 3461-3471.
- Taylor, S.W., Fahy, E., and Ghosh, S.S.** (2003). Global organellar proteomics. *Trends Biotechnol* **21**, 82-88.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., and Higgins, D.G.** (1997). The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* **25**, 4876-4882.
- Trotta, C.R., Miao, F., Arn, E.A., Stevens, S.W., Ho, C.K., Rauhut, R., and Abelson, J.N.** (1997). The yeast tRNA splicing endonuclease: a tetrameric enzyme with two active site subunits homologous to the archaeal tRNA endonucleases. *Cell* **89**, 849-858.
- Ulmasov, B., Topin, A., Chen, Z., He, S.H., and Folk, W.R.** (1998). Identity elements and aminoacylation of plant tRNA^{Trp}. *Nucleic Acids Research* **26**, 5139-5141.
- Ulmasov, B., and Folk, W.** (1995). Analysis of the role of 5' and 3' flanking sequence elements upon *in vivo* expression of the plant tRNA^{Trp} genes. *Plant Cell* **7**, 1723-1734.
- Unseld, M., Marienfeld, J.R., Brandt, P., and Brennicke, A.** (1997). The mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana* contains 57 genes in 366,924 nucleotides. *Nature Genet.* **15**, 57-61.
- Voet, D., and Voet, J.G.** (1990). *Biochemistry*. (New York).
- Ward, B.L., Anderson, R.S., and Bendich, A.J.** (1981). Mitochondrial genome is large and variable in a family of plants (cucurbitaceae). *Cell* **26**, 793-803.
- Werhahn, W., Niemeyer, A., Jansch, L., Kruff, V., Schmitz, U.K., and Braun, H.** (2001). Purification and characterization of the preprotein translocase of the outer mitochondrial membrane from *Arabidopsis*. Identification of multiple forms of TOM20. *Plant Physiol* **125**, 943-954.

- Yermovsky-Kammerer, A.E., and Hajduk, S.L.** (1999). In vitro import of a nuclearly encoded tRNA into the mitochondrion of *Trypanosoma brucei*. *Mol Cell Biol* **19**, 6253-6259.
- Yoshihisa, T.** (2006). tRNA, new aspects in intracellular dynamics. *Cell Mol Life Sci* **63**, 1813-1818.
- Yoshihisa, T., Yunoki-Esaki, K., Ohshima, C., Tanaka, N., and Endo, T.** (2003). Possibility of cytoplasmic pre-tRNA splicing: the yeast tRNA splicing endonuclease mainly localizes on the mitochondria. *Mol Biol Cell* **14**, 3266-3279.
- Yoshionari, S., Koike, T., Yokogawa, T., Nishikawa, K., Ueda, T., Miura, K., and Watanabe, K.** (1994). Existence of nuclear-encoded 5S-rRNA in bovine mitochondria. *FEBS Lett* **338**, 137-142.
- Yukawa, Y., Sugita, M., Choise, N., Small, I., and Sugiura, M.** (2000). The TATA motif, the CAA motif and the poly(T) transcription termination motif are all important for transcription re-initiation on plant tRNA genes. *Plant J* **22**, 439-447.
- Zalman, L.S., Nikaido, H., and Kagawa, Y.** (1980). Mitochondrial outer membrane contains a protein producing nonspecific diffusion channels. *J Biol Chem* **255**, 1771-1774.
- Zamzami, N., and Kroemer, G.** (2001). The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 67-71.
- Zhang, X.P., and Glaser, E.** (2002). Interaction of plant mitochondrial and chloroplast signal peptides with the Hsp70 molecular chaperone. *Trends Plant Sci* **7**, 14-21.
- Zizi, M., Forte, M., Blachly-Dyson, E., and Colombini, M.** (1994). NADH regulates the gating of VDAC, the mitochondrial outer membrane channel. *J Biol Chem* **269**, 1614-1616.