

**UNIVERSITE LOUIS PASTEUR
STRASBOURG**

2008

THÈSE

présentée à

LA FACULTE DES SCIENCES DE LA VIE

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE LOUIS PASTEUR

Domaine : Biologie Moléculaire Végétale

par

Jérémie HAGENMULLER

**Étude des interactions fonctionnelles des protéines mitochondriales
impliquées dans la maturation des cytochromes de type *c* chez
*Arabidopsis thaliana***

Soutenue le **28 Novembre 2008**, devant la commission d'examen

P. Giegé	(CNRS, Strasbourg)	Examineur
F. Vignols	(CNRS, Perpignan)	Examinatrice
C. de Vitry	(CNRS, Paris)	Rapporteur externe
E. Martinoia	(UZ, Zurich)	Rapporteur externe
M. Keller	(CNRS, Strasbourg)	Rapporteur interne
J.M. Grienberger	(CNRS, Strasbourg)	Directeur de thèse

**Institut de Biologie Moléculaire des Plantes (IBMP)
UPR-CNRS 2357**

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier le Dr de Vitry, le Dr Vignols, le Professeur Martinoia et le Dr Keller pour avoir accepté de juger mon travail.

Ma gratitude va bien évidemment à tous les membres de l'équipe du labo 306 pour m'avoir accompagné pendant ces années de thèse et qui ont énormément contribué à faire de ces quelques années une vraie « success story ».

Un très grand merci à Philippe qui a souvent trouvé les mots justes pour me redonner le moral dans les périodes de grand stress et également à Géraldine qui a su, à sa manière, me motiver quand les expériences n'allaient pas assez vite. Je remercie bien sûr Jean-Michel pour ses conseils et ses encouragements.

Je salue les collègues du département mito qui ont rendu agréable ces années de paillasse et de rédaction. Je remercie tout particulièrement Heike qui m'a redonné goût à l'escalade et m'a initié aux joies du roller. Merci aussi à Claire pour ses visites pendant la rédaction de ma thèse afin de vérifier si je vivais encore dans mes remparts d'articles à lire et de corrections à faire. Merci à Romain pour sa compagnie pendant le Biovision 2008 au pays des pharaons.

Je remercie bien sûr mes parents pour m'avoir soutenu pendant ces (longues... longues) années d'étude.

Un remerciement très spécial, enfin, à la charmante demoiselle qui partage mon quotidien et qui, malgré ses sarcasmes sur ma condition de doctorant, a toujours su me soutenir tout au long de cette thèse.

ABRÉVIATIONS

2,4 D : acide 2,4-dichloro-phenoxyacétique
3-AT : 3-aminotriazole
ABC : ATP binding cassette
acétyl-CoA : acétyl coenzyme A
AD : Activation domain, domaine d'activation
ADN : acide désoxyribonucléique
ADNc : ADN complémentaire
ADN-T : ADN de transfert
APS : persulfate d'ammonium
ARN : acide ribonucléique
ATP, ADP, AMP : adénosine triphosphate, adénosine diphosphate, adénosine monophosphate
BD : Binding domain, domaine de liaison à l'ADN
bp, kb : paire de bases, kilo paire de bases
BisTris : Bis(2-hydroxyéthyl)imino-tris(hydroxyméthyl)méthane
BSA : sérum-albumine bovine
ccdB : "control of cell death"
CCM : "cytochrome c maturation"
CHAPS : 3-[(3-cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propanesulfonate
CNBr : bromure de cyanogène
Cub : Partie C-terminale de l'ubiquitine
kDa : kiloDalton
DNase : désoxyribonucléase
dNTP : désoxyribonucléoside-5'-triphosphate
DO - x : Milieu « drop out », milieu ou le(s) acide(s) aminé(s) « x » n'ont pas été ajoutés
DO_x : densité optique à x nm
DTT : dithiothréitol
EDTA : acide éthylène diamine tétraacétique
EST : "expressed sequence tag"
FADH₂ : flavin Adenine Dinucleotide
FMN : flavine mononucléotide
g : unité de gravitation
GFP : "green fluorescent protein"
HA : étiquette hémagglutinine
HEPES : N-(2-hydroxyéthyl)piperazine-N'-(2-éthanesulfonate) de sodium; 4-(2-hydroxyéthyl)piperazine-1-(2-éthanesulfonate) de sodium
Hsp : "Heat-shock protein"
IPTG : isopentényl-β-D-thiogalactopyranoside
λ_{max} : longueur d'onde d'absorption maximum
LB : Luria broth
LB : "left border" (bordure gauche d'un ADN-T)
MES : acide 2-(N-morpholino) éthanesulfonique
Met : méthionine
MOPS : acide 3-N-morpholino-propanesulfonique
mt : mitochondrial
NP40 : Nonidet P-40
o-NPG : 2-Nitrophenyl β-D-galacto pyranoside

Nub : partie N-terminale de l'ubiquitine
(p/v) : poids/volume
PCR : réaction de polymérisation en chaîne
PEG : polyéthylène glycol
PLV : Facteur de transcription composé de VP16 et LexA
PM : poids moléculaire
PMSF : phényl méthyl sulfonyl fluoride
PVDF : difluorure de polyvinylidène
qsp : quantité suffisante pour
RB : "right border" (bordure droite d'un ADN-T)
RNase : ribonucléase
Rpm : révolutions par minutes
RT-PCR : Transcription inverse puis PCR
SDS : dodécylsulfate de sodium
SDS-PAGE : SDS-polyacrilamide gel electrophoresis
SSC : Standard sodium citrate
ssDNA : ADN porteur, « salmon sperm DNA »
TCA : acide trichloroacétique
TEMED : N, N, N',N'-tétraméthyléthylène diamine
Triton X100 : polyéthylène glycol tert-orthophényl éther; t-octylphénoxy polyéthoxyéthanol;
4-(1,1,3,3-tétraméthylbutyl)phényl-polyéthylène glycol
Tween-20 : polyéthylène glycol sorbitane monolaurate
Tris : N-tris(hydroxyméthyl)aminométhane
U : unité enzymatique
UV : ultraviolet
(v/v) : volume/volume
WT : Wild type (sauvage)
YPD : Milieu pour levure
X-gal : 5-bromo 4-chloro 3-indole 1-D-galactopyranoside

Table des matières

Introduction	11
1. La mitochondrie	11
1.1. Définitions et généralités	11
1.1.1. Fonctions	11
1.1.2. Origine	12
1.1.3. Génome	12
1.1.4. Import de molécules	13
1.2. La respiration cellulaire	14
1.2.1. La glycolyse	15
1.2.2. Le cycle de Krebs	15
1.2.3. Le transfert d'électrons et la phosphorylation oxydative	16
2. Les cytochromes	18
2.1.1. Définition	18
2.1.2. Les cytochromes de type c bactériens	20
2.1.3. Les cytochromes de type c chez les plantes	22
3. Les systèmes de maturation des cytochromes de type c	23
3.1. Le système IV : CCB	25
3.2. Le système III : CCHL	26
3.3. Le système II : CCS	27
3.4. Le système I chez les bactéries	28
3.4.1. Le transporteur ABC : CcmA, CcmB et CcmC	28
3.4.2. Le système de livraison d'hème : CcmC et CcmD	29
3.4.3. Le chaperon d'hème : CcmE	30
3.4.4. La voie de réduction : CcmG, CcmH	30
3.4.5. L'hème lyase : CcmF	31
3.5. Le système I dans les mitochondries de plantes : Les gènes <i>ccm</i>	31
3.5.1. Les gènes <i>ccm</i> codés par le génome mitochondrial de plantes	31
3.5.2. Les gènes <i>ccm</i> codés par le génome nucléaire de plantes	32
3.5.3. Certains gènes <i>ccm</i> bactériens n'ont pas d'orthologues chez les plantes	33

3.6. Le système I dans les mitochondries de plantes : Fonctions des protéines ccm	34
3.6.1. CCMA, CcmB et CcmC, composants potentiels d'un transporteur ABC	34
3.6.2. CCME, composant principal de la voie de livraison de l'hème	36
3.6.3. Les protéines CcmF, une fonction potentielle d'hème lyase	37
3.6.4. Rôles de CCMH dans les mitochondries de plantes	37
4. Les transporteurs ABC	39
4.1. Fonctions	39
4.2. Structures	40
4.2.1. Les domaines de liaison à l'ATP (NBD)	40
4.2.2. Les domaines transmembranaires (TMD)	41
4.2.3. La coopération entre les TMD et NBD	41
4.3. Import et export	42
4.4. Mécanisme de transport	42
4.5. Les transporteurs ABC de plantes	43
4.5.1. Inventaire des transporteurs ABC de plantes	43
4.5.2. Les transporteurs ABC chloroplastiques et mitochondriaux	44
Présentation du travail de thèse	46
Matériels et méthodes	48
1. Matériels et outils informatiques	48
1.1. Matériel végétal	48
1.2. Souches de bactéries et de levures	48
1.3. Vecteurs de clonage	49
1.4. Banque d'ADNc	51
1.5. Oligonucléotides	51
1.6. Outils informatiques	51
2. Méthodes	52
2.1. Méthodes de biologie moléculaire	52
2.1.1. Transcription inverse: obtention d'ADNc total	52
2.1.2. Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR)	53
2.1.3. Électrophorèse sur gel d'agarose	53
2.1.4. Purification des fragments d'ADN issus de gels d'agarose	54
2.1.5. Digestion de l'ADN par des enzymes de restriction	54

2.1.6.	Ligation de deux fragments d'ADN	54
2.1.7.	Clonage « Gateway »	55
2.1.8.	Transformation d'ADN plasmidique dans E.coli	56
2.1.9.	Préparation d'ADN plasmidique de bactéries	57
2.1.10.	« Plasmid rescue » dans la levure	57
2.1.11.	Séquençage d'ADN	58
2.1.12.	Analyse d'ADN par hybridation de type Southern Blot	59
2.1.13.	Préparation d'ARN	61
2.2.	Méthodes de biochimie	63
2.2.1.	Fractionnement sous-cellulaire d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	63
2.2.2.	Purification de mitochondries de tubercules de pomme de terre ou de têtes de chou-fleur	64
2.2.3.	Purification de mitoplastes	65
2.2.4.	Fractionnement des mitoplastes d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	65
2.2.5.	Quantification des protéines	65
2.2.6.	Concentration des protéines	66
2.2.7.	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide	66
2.2.8.	Détection des protéines	68
2.2.9.	Purification des anticorps	68
2.2.10.	Transfert des protéines sur membrane	69
2.2.11.	Immunodétection	70
2.3.	Méthodes génétiques d'étude des interactions protéiques	70
2.3.1.	Interaction de type double hybride Gal4 dans la levure	70
2.3.2.	Interaction de type double hybride « Split-ubiquitin » dans la levure	71
2.3.3.	Préparation de levures compétentes à la transformation par choc thermique	71
2.3.4.	Transformation des levures par choc thermique	71
2.3.5.	Obtention des constructions pour le double hybride split-ubiquitin	72
2.3.6.	Lyse des cellules de levures	73
2.3.7.	Test d'interaction double hybride	73
2.3.8.	Mesure de la force de l'interaction par la quantification de l'activité du gène rapporteur LacZ	74
2.3.9.	Criblage d'une banque d'ADNc par le système double hybride « split-ubiquitin »	74
2.4.	Méthodes d'études génétiques chez <i>Arabidopsis</i>	76
2.4.1.	Extraction d'ADN de plantes	76
2.4.2.	Transformation d' <i>Arabidopsis</i> par la méthode du « floral dip »	76
2.4.3.	Stérilisation des graines	77
2.4.4.	Observation de graines décolorées	77

Résultats	79
1. Le transporteur ABC du système I	79
1.1. Étude de la composition du transporteur ABC par double hybride « split-ubiquitin »	79
1.1.1. Conception des constructions	79
1.1.2. Contrôles du test split-ubiquitin	80
1.1.3. Test d'interaction AtCCMA, AtCcmB et AtCcmC	80
1.2. Étude de la composition du transporteur ABC par double hybride classique	81
1.2.1. Conception des constructions	81
1.2.2. Construction des plasmides de destination	83
1.2.3. Contrôles du test d'interaction en double hybride classique	84
1.2.4. Test d'interaction entre AtCCMA et AtCcmB	85
1.2.5. Test d'interaction entre AtCCMA et AtCcmC	86
1.2.6. Conclusions	86
1.3. Étude du complexe protéique comprenant AtCCMA par électrophorèse de type bleu natif	87
1.3.1. Détection d'AtCCMA	87
1.3.2. Détection d'AtCcmB	87
1.3.3. Caractérisation du complexe protéique de 480 kDa	88
1.4. Étude <i>in vivo</i> de AtCCMA	89
1.4.1. Identifications des mutants <i>Atccma</i>	89
1.4.2. Analyse des locus d'insertion	90
1.4.3. Analyse de la ségrégation	91
1.4.4. Analyse du nombre d'insertion par Southern blot	93
1.4.5. Observation des siliques des plantes hétérozygotes	94
1.4.6. Complémentation des mutants <i>Atccma</i>	95
1.5. Conclusions	96
2. Les interactions entre protéines <i>AtCcmC</i> et <i>AtCCME</i> impliquées dans la voie de livraison de l'hème	97
2.1. Conception des constructions	97
2.2. Contrôles du test d'interaction	98
2.3. Résultats	99
2.4. Conclusions	100

3. Test d'interaction entre les protéines AtCcmFs et AtCCMH impliquées dans l'assemblage du cytochrome c	101
3.1. Conception des constructions	101
3.2. Contrôles du test d'interaction	103
3.3. Résultats	103
4. Recherche des partenaires d'AtCCMH	105
4.1. Criblage par la méthode du split-ubiquitin dans la levure	106
4.1.1. Construction de l'appât AtCCMH	106
4.1.2. Contrôles	106
4.1.3. Criblage pilote	107
4.1.4. Criblage de la banque d'ADNc	107
4.2. Analyse des clones positifs	108
4.2.1. Identification des candidats	109
4.2.2. Les principaux candidats	109
Discussion et perspectives	113
Annexes	124

Introduction

1. La mitochondrie

1.1. Définitions et généralités

1.1.1. Fonctions

Les mitochondries sont retrouvées chez pratiquement tous les organismes eucaryotes. Ces organelles essentielles fournissent une grande partie de l'énergie nécessaire à la cellule sous forme d'ATP via le cycle de Krebs et la phosphorylation oxydative. La mitochondrie synthétise également des composants variés tels des acides aminés et des acides organiques utilisés dans d'autres voies de synthèse de la cellule.

La base de l'architecture de la mitochondrie est sensiblement la même chez les plantes et les animaux. Leur structure, une double membrane dont la membrane interne est invaginée, est commune à toutes les mitochondries, ce qui suggère l'origine ancienne de cette organelle (Buchanan *et al.*, 2000; Gray et Doolittle, 1982) qui provient de l'endosymbiose d'une α -protéobactérie dans une cellule « hôte » ancestrale. Ces deux membranes ont par ailleurs des propriétés très différentes. La membrane externe est très perméable aux petites molécules tandis que la membrane interne a une très faible perméabilité. L'espace entre ces deux membranes, appelé espace intermembranaire, est un compartiment où s'opèrent certaines réactions de transport, d'oxydoréduction et de transfert d'électrons. L'intérieur de la mitochondrie, appelé matrice, contient un système génétique complet avec des ribosomes, des ADNr et plusieurs copies du génome mitochondrial. Il existe entre la matrice et l'espace intermembranaire un gradient électrochimique essentiel à la chaîne respiratoire.

	<i>Ara th</i>	<i>Mar po</i>	<i>Pro wi</i>	<i>Cho cr</i>	<i>Rec am</i>	<i>Sac ce</i>	<i>Hom sa</i>
Taille du génome (en kb)	367	187	55	26	69	86	16
Complexe I	9	8	9	7	12	0	7
Complexe II	1 pseudo	2	0	3	3	0	0
Complexe III	1	1	1	1	1	1	1
Complexe IV	3	3	3	3	3	3	3
ATPase (Complexe V)	5	4	4	3	5	3	2
Maturation des cytochromes <i>c</i>	5	5	0	0	4	0	0
Protéines ribosomales	7	16	13	4	27	1	0
ARNr	3	3	3	2	3	2	2
ARNt	22	29	26	23	26	24	22

Ara th : *Arabidopsis thaliana* *Mar po* : *Marchantia polymorpha* *Pro wi* : *Prototheca wickerhamii*
Cho cr : *Chondrus crispus* *Rec am* : *Reclinomonas americana* *Sac ce* : *Saccharomyces cerevisiae*
Hom sa : *Homo sapiens*

Figure 1 : Comparaison chez différentes espèces de la taille des génomes mitochondriaux et du nombre de gènes impliqués dans différents mécanismes biologiques (chaîne respiratoire, maturation, traduction).

1.1.2. Origine

Au cours de l'évolution, les mitochondries puis les plastes ont été les résultats de différentes symbioses ancestrales des ancêtres des cellules eucaryotes avec les cellules procaryotes. Ces endosymbiontes sont devenues des composants essentiels de la cellule au cours de l'évolution. Comme les plastes, les mitochondries sont capables de synthétiser une partie de leurs protéines, mais la plupart des gènes codant pour ces protéines ont été transférés vers le noyau. Ce processus de transfert de gènes passe par une étape où le noyau et la mitochondrie expriment un même gène avant que celui-ci ne soit perdu par l'organelle (Gellissen et Michaelis, 1987). La perte de ces gènes résulte en une dépendance de l'expression des gènes nucléaires pour la survie de la mitochondrie.

1.1.3. Génome

Dans les cellules animales, le transfert de gènes du génome mitochondrial vers le noyau a mené à la rétention d'approximativement 13 protéines codées par des gènes mitochondriaux. Dans les cellules de plantes, la plupart des génomes mitochondriaux comportent 54 à 57 gènes connus avec un nombre variable de phase ouverte de lecture (Adams et Palmer, 2003). Les différences entre mitochondries animales et végétales se retrouvent aussi dans la taille du génome de cette organelle. La taille du génome mitochondrial dans les cellules animales est d'environ 16 kb à quelques exceptions près (Brown, 1985). La taille du génome de la mitochondrie de plantes est beaucoup plus élevée (Fig. 1). Cette-ci est généralement de l'ordre de quelques centaines de kb (ex. : *Brassica napus* : 222 kb (Handa, 2003) *Oryza sativa* : 490 kb (Notsu *et al.*, 2002)). Cette variabilité est due à l'accumulation de séquences d'ADN non codantes dans les régions intergéniques. Dans les mitochondries d'*Arabidopsis*, seul 10% du génome de 367 kb code pour des protéines et 60% de ce génome contient des informations encore non caractérisées (Unsel *et al.*, 1997). Chez les plantes, les séquences non codantes mitochondriales ne sont pas constituées de séquences nucléotidiques répétitives contrairement aux séquences d'ADN non codantes retrouvées dans le génome nucléaire.

Toutefois, malgré la diversité de la taille du génome mitochondrial, tous ces génomes contiennent essentiellement les mêmes informations génétiques. Le génome mitochondrial ne code pas pour un nombre important de gènes étant donné que la plupart des enzymes

nécessaires pour la réplication de l'ADN mitochondrial, sa transcription et sa traduction sont codées par le génome nucléaire (Gray, 1992). Le produit des gènes codés par le génome mitochondrial participe essentiellement à la phosphorylation oxydative, la synthèse de l'ATP, la mise en place de la chaîne respiratoire et à la traduction mitochondriale.

Les génomes mitochondriaux de plantes se distinguent des génomes mitochondriaux d'animaux par la présence de gènes codant pour des protéines impliquées dans la maturation des cytochromes *c* et pour des protéines ribosomales (Fig. 1).

1.1.4. Import de molécules

Transport des petits métabolites

Le mécanisme de transport utilisé par les ions et les petits métabolites est différent de celui utilisé par les protéines. Comme mentionné précédemment, la perméabilité des deux membranes est très différente l'une de l'autre. La diffusion des petites molécules (ex. : ATP/ADP, NADP...) à travers la membrane externe est prise en charge par des protéines appelées porines mitochondriales ou VDAC (Voltage Dependent Anion Channel) qui ressemblent aux porines bactériennes (Colombini, 2004). Chaque porine crée un canal aqueux à travers lequel les ions et les petites molécules peuvent diffuser.

Pour les composés solubles (nucléotides, co-facteurs, intermédiaires métaboliques etc...), le transport à travers la membrane interne est contrôlé par des membres de la famille des « carriers » mitochondriaux (Kunji et Robinson, 2006).

Transport des protéines

La plupart des études du mécanisme d'importation des protéines mitochondriales ont été faites chez la levure *Saccharomyces 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 (Lister *et al.*, 2005).

Le canal d'importation des protéines dans les mitochondries est composé de deux complexes : le complexe TOM localisé au niveau de la membrane externe et le complexe TIM localisé au niveau de la membrane interne. Le mécanisme d'importation des protéines va dépendre de la destination finale de celles-ci. Pour une question de simplicité, nous avons séparé 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 (Braun et Schmitz, 1999; Lister *et al.*, 2005; Werhahn *et al.*, 2001; Zhang et Glaser, 2002).

Les protéines matures sont assemblées avec leur partenaire protéique spontanément ou par l'action de chaperons moléculaires. Le peptide signal clivé, qui pourrait être potentiellement délétère pour les membranes biologiques, est dégradé dans l'organelle par une métalloprotéase PreP (presequence protéase) (Stahl *et al.*, 2002).

Transport des acides nucléiques

Des données expérimentales suggèrent l'existence d'un processus *in vitro* d'importation d'ADN double brin dans les mitochondries végétales (Koulintchenko *et al.*, 2003).

Concernant les ARN, la mitochondrie végétale code pour un certain nombre d'ARNt (Fig. 1 pour plus de détails). Cependant, l'ensemble de ces ARNt n'est pas suffisant pour permettre la traduction mitochondriale. Les ARNt manquants sont donc codés par le génome nucléaire et importés du cytosol vers les mitochondries (Salinas *et al.*, 2008; Schneider et Marechal-Drouard, 2000).

1.2.La respiration cellulaire

La respiration aérobie, un processus commun à presque tous les organismes eucaryotes, implique une oxydation et une réduction contrôlées de substrats organiques en CO₂ e H₂O. De nombreux composés peuvent servir de substrats pour la respiration, comme les hydrates de carbone, les lipides, les protéines, les acides aminés et les acides organiques.

La respiration crée une grande quantité d'énergie qui est conservée dans les liaisons anhydrides acides des molécules d'ATP. L'énergie contenue dans cette liaison chimique peut être utilisée dans de multiples processus métaboliques tels la croissance, le développement et le maintien de la plante. De plus, les étapes primaires de la respiration fournissent des intermédiaires métaboliques qui servent de substrats à la synthèse d'acides nucléiques, d'acides aminés, d'acides gras et de nombreux métabolites secondaires.

Bien que le processus général de la respiration soit le même chez les autres eucaryotes, il existe certaines particularités chez les plantes. Ces particularités sont apparues au cours de

l'évolution pour répondre au besoin des plantes de s'adapter à de multiples environnements. Les mitochondries végétales existent dans des cellules qui contiennent des chloroplastes produisant de l'ATP ainsi que de nombreux substrats de la respiration, nécessitent une grande quantité de précurseurs pour la synthèse de métabolites primaires et secondaires et sont capables d'effectuer la photorespiration (Mackenzie et McIntosh, 1999).

Les parties suivantes vont décrire succinctement les trois principales étapes de la respiration : la glycolyse, le cycle de Krebs et la phosphorylation oxydative.

1.2.1. La glycolyse

La glycolyse implique une série d'enzymes du cytosol pouvant oxyder les sucres en acides organiques. L'ensemble de ces enzymes se trouve dans le cytosol, mais est aussi fonctionnellement associé à la surface externe des mitochondries de plantes (Giegé *et al.*, 2003b; Graham *et al.*, 2007) et de levures (Brandina *et al.*, 2006). La réaction redox de la respiration décompose une molécule de sucrose en deux hexoses qui sont convertis à leur tour par glycolyse en quatre molécules de pyruvate (tricarbone, C3) destinées à être transférées vers la matrice mitochondriale. Cette oxydation partielle du sucrose produit le cofacteur réduit NADH ainsi que de l'ATP.

Bien que de nombreuses études utilisant des stratégies de génétique inverse aient analysé l'importance du contrôle métabolique de la glycolyse, aucune d'entre elle n'a pu cerner précisément les éléments clés de ce contrôle (Ferne *et al.*, 2001; Ferne *et al.*, 2002; Veramendi *et al.*, 2002).

1.2.2. Le cycle de Krebs

Aussi connu sous le nom de cycle de l'acide citrique ou cycle des acides tricarboxyliques, le cycle de Krebs se déroule dans la matrice de la mitochondrie et transfère les électrons des acides organiques aux cofacteurs redox NAD^+ et FAD, formant ainsi du NADH du FADH_2 et du CO_2 . Ce cycle fait intervenir huit enzymes. Avant d'entrer dans le cycle de l'acide citrique, le pyruvate est oxydé et décarboxylé par la pyruvate déshydrogénase pour former du CO_2 , de l'acétyl-CoA et du NADH.

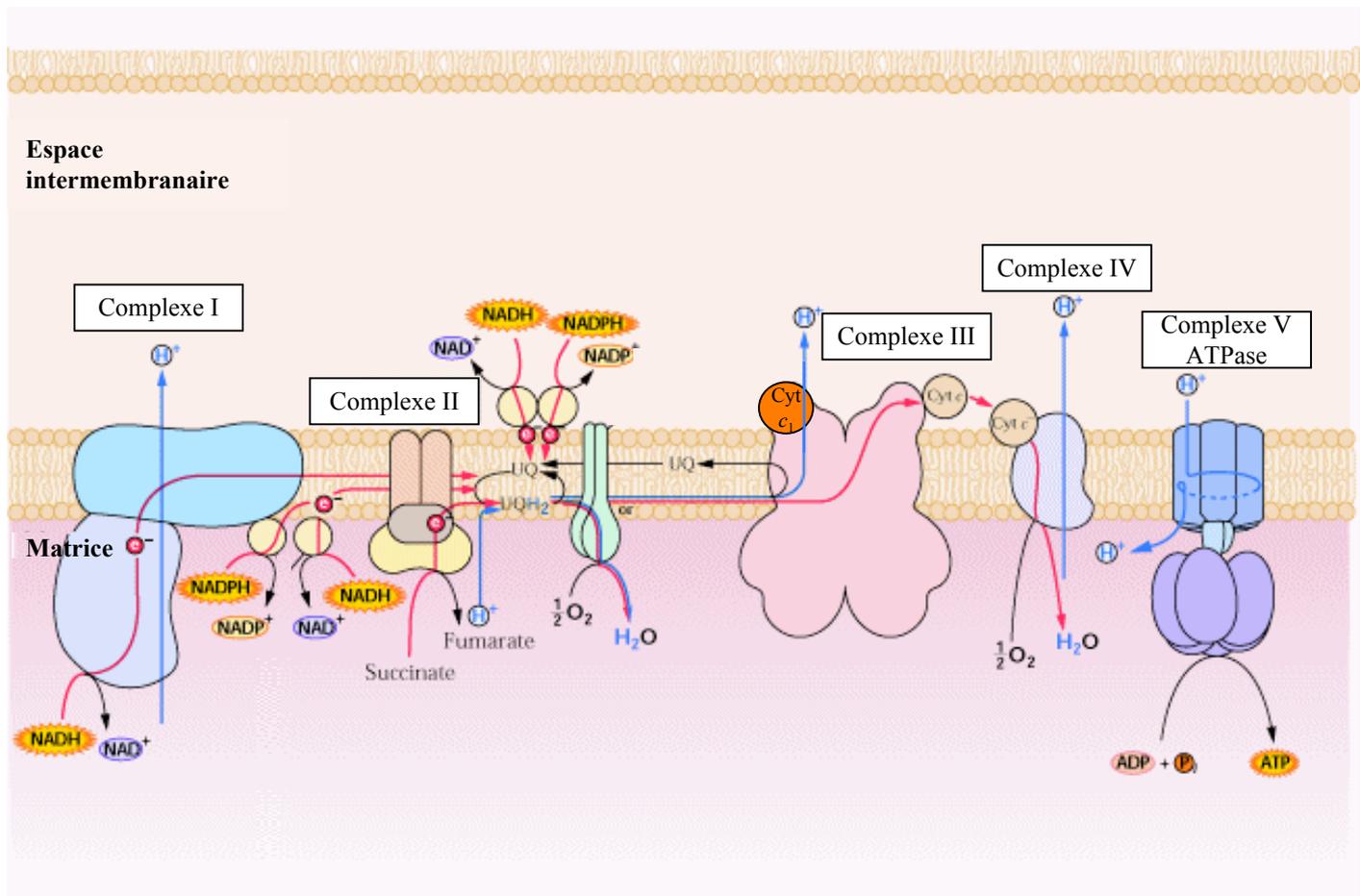


Figure 2 : Représentation schématique de la chaîne respiratoire de la membrane mitochondriale interne (Buchanan *et al.*, 2000). Les électrons sont transférés d'un complexe à l'autre en générant un gradient de protons de part et d'autre de la membrane interne. Le cytochrome *c* (soluble) et le cytochrome *c*₁ (intégré dans le complexe III) transfèrent les électrons du complexe III vers le complexe IV.

Parmi ces enzymes, la pyruvate déshydrogénase, catalysant la formation du CO₂, de l'acétyl-CoA et du NADH à partir du pyruvate, a été l'objet de nombreuses études visant à définir son organisation, sa régulation et sa structure (Mooney *et al.*, 2002; Tovar-Mendez *et al.*, 2003).

L'acétyl-CoA entre dans le cycle par l'intermédiaire de l'acide citrique synthase qui transfère le groupement acétyl sur l'acide oxaloacétique pour synthétiser l'acide citrique. Il s'en suit une série de déshydratations, oxydations, décarboxylations qui conduisent à la régénération d'acide oxaloacétique.

1.2.3. Le transfert d'électrons et la phosphorylation oxydative

La phosphorylation oxydative représente la dernière étape de la respiration pour permettre la production d'ATP par la mitochondrie. Cette voie enzymatique est constituée de cinq complexes protéiques localisés dans la membrane interne des mitochondries (Hatefi, 1985). Son fonctionnement implique le transport d'électrons du complexe I au complexe IV, et la synthèse d'ATP au niveau de l'ATP synthase (Fig. 2). Des études sont en cours afin d'établir la composition et le mécanisme de fonctionnement de ces complexes respiratoires (Heazlewood *et al.*, 2003a), dont une organisation en « super-complexe » est une possibilité (Eubel *et al.*, 2003).

Les substrats de la chaîne respiratoire sont le NADH et le FADH₂ produits respectivement au niveau du complexe I et II. Les électrons entrent dans la chaîne respiratoire par le complexe I (NADH : ubiquinone oxydoréductase). Ils sont ensuite transférés au complexe III (ubiquinol : cytochrome *c* oxydoréductase) via le groupe d'ubiquinols, puis via le cytochrome *c* vers le complexe IV (cytochrome *c* : oxygène oxydoréductase), où finalement ils réduisent l'oxygène en molécules d'eau. Les trois complexes (I, III et IV) couplent le transfert d'électrons à l'exportation de protons de la matrice vers l'espace intermembranaire. Cette exportation de protons de la matrice vers l'espace intermembranaire produit un gradient électrochimique nécessaire à la condensation d'ADP et Pi en ATP par l'ATP synthase (Boyer, 1997; Douce et Neuburger, 1989).

- Le complexe I : Ce complexe, aussi appelé NADH-ubiquinone oxydoréductase, est le plus grand complexe de la chaîne respiratoire transportant des protons et représente le point d'entrée principal des électrons (Friedrich et Bottcher, 2004). Le complexe I

a un poids moléculaire de plus de 900 kDa. 40 sous-unités différentes sont connues dans sa composition (Abdrakhmanova *et al.*, 2004). Les études de microscopie électronique sur des particules isolées ont révélé une structure en L du complexe I avec deux domaines majeurs séparés par un fin collier (Guenebaut *et al.*, 1998).

- Le complexe II : Ce petit complexe, aussi appelé succinate déshydrogénase, est le second point d'entrée des électrons dans la chaîne respiratoire (Horsefield *et al.*, 2004; Yankovskaya *et al.*, 2003). Il est composé de deux sous-unités solubles orientées vers la matrice qui sont attachées à deux protéines membranaires hydrophobes. Il représente un composant du cycle de Krebs et participe au transfert d'électrons du succinate vers le groupe d'ubiquinones. Le complexe II ne transporte pas de protons et de ce fait nourrit uniquement la chaîne respiratoire en électrons.
- Le complexe III : Ce complexe, aussi appelé complexe *bc1* ou cytochrome *c* réductase est le composant central de la chaîne respiratoire (Berry *et al.*, 2000; Hunte *et al.*, 2000). Ayant une structure en dimère d'une taille d'environ 480 kDa composé de 2x10 ou 11 sous-unités distinctes, ce complexe possède deux cytochromes, un cytochrome contenant deux hèmes de type *b* (toujours codés par le génome mitochondrial) et le cytochrome *c*₁ membranaire ainsi qu'une protéine Fe-S de type Rieske. Environ un quart du complexe est intégré à la membrane interne de la mitochondrie, seule une petite portion est exposée à l'espace intermembranaire tandis que l'essentiel du complexe est exposé à la matrice. Sa fonction est de livrer les électrons des ubiquinols au cytochrome *c* et de coupler cette réaction redox à la production d'un gradient de protons à travers la membrane par le mécanisme nommé cycle des quinols (Crofts *et al.*, 2006).
- Le complexe IV : Ce complexe, aussi appelé cytochrome *c* oxydase, représente le complexe terminal de la chaîne respiratoire (Michel *et al.*, 1998; Tsukihara *et al.*, 1996). Il est composé de 12 à 13 sous-unités regroupées en un monomère d'environ 220 kDa. Les trois sous-unités majeures (COX1, COX2 et COX3) sont codées par le génome mitochondrial et forment le cœur fonctionnel de l'enzyme. Ce cœur est entouré de 10 petites sous-unités codées par le noyau. Existant sous forme monomérique ou dimérique dans la membrane, ce complexe produit un gradient transmembranaire de protons. Son substrat, le cytochrome *c*, est une hémoprotéine

soluble qui lui donne des électrons sur la face externe de la membrane interne mitochondriale afin de réduire l'oxygène en eau. La cytochrome *c* oxydase contient deux hèmes *a* et deux atomes de cuivre.

- L'ATP synthase : Parfois appelée complexe V, ce complexe se compose de deux parties, une partie F_1 exposée à la matrice mitochondriale et une partie F_0 ancrée dans la membrane interne (Stock *et al.*, 2000). Il est composé d'environ 15 sous-unités distinctes dont certaines sont présentes plusieurs fois dans l'holoenzyme. La composition de ce complexe chez *Arabidopsis* a été caractérisée par spectrométrie de masse (Heazlewood *et al.*, 2003b). Sa masse moléculaire se situe entre 500 et 600 kDa. L'ATP synthase est une enzyme fonctionnellement réversible. Elle peut synthétiser l'ATP en utilisant la force motrice des protons à travers la membrane et elle peut hydrolyser l'ATP pour pomper des protons contre le gradient électrochimique. Bien qu'il ne transfère pas d'électrons, ce complexe est parfois considéré comme un composant de la chaîne respiratoire.

2. Les cytochromes

2.1.1. Définition

Les cytochromes sont définis comme des hémoprotéines constituées d'une partie protéique (l'apocytochrome) et d'un groupement prosthétique (l'hème). Leur mode d'action caractéristique implique le transfert d'un équivalent réducteur associé à un changement réversible dans l'état d'oxydation de leur groupement prosthétique. Lors de réductions, ce groupe révèle une forte absorbance entre 510 et 615 nm. Keilin a classé les différents cytochromes, *a*, *b* et *c* en fonction de leur absorbance (Keilin, 1925). De nouveaux groupes de cytochromes, les cytochromes *d* et *o*, ont été découverts par la suite.

Parce que l'hème peut facilement être détecté par spectrométrie d'absorption, les cytochromes sont des protéines idéales pour étudier la maturation post-transcriptionnelle, post-traductionnelle et l'insertion de cofacteurs dans les polypeptides. Dans ce cas, une protéine est maturée par la conversion du produit d'un gène (l'apo-protéine) en sa forme mature (l'holo-protéine) par l'insertion d'un cofacteur. Le processus de maturation est plus

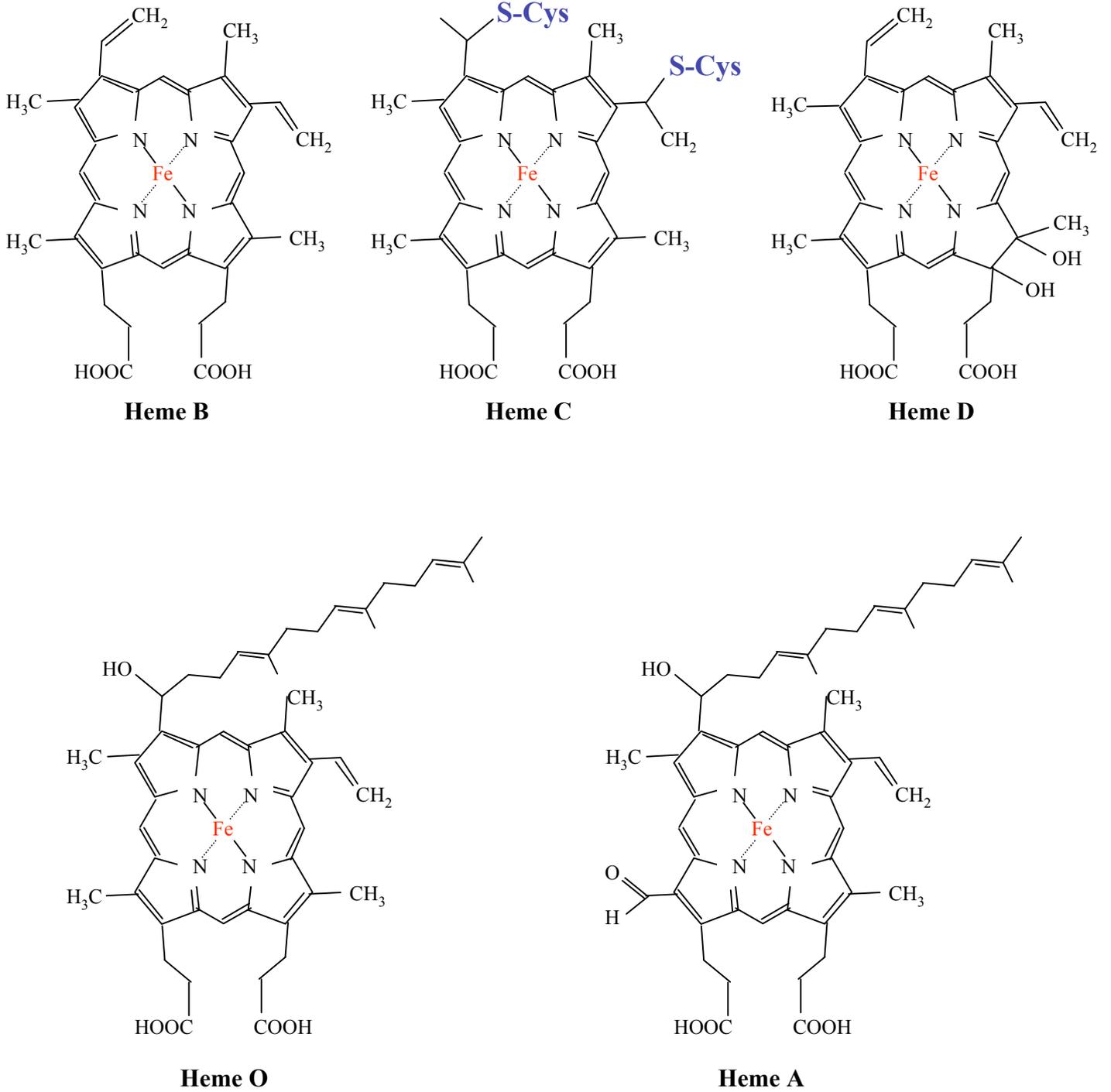


Figure 3 : Les différents types d'hèmes retrouvés chez les plantes. A noter que seul l'hème C lie l'apocytochrome de manière covalente via ses résidus cystéines (indiqués en bleu).

complexe quand la synthèse d'une apo-protéine et d'un cofacteur a lieu dans des compartiments différents de celui de leur assemblage. Ainsi, le transport du polypeptide et de son cofacteur dans ou à travers la membrane est nécessaire. Enfin, le clivage protéolytique et la modification du polypeptide peuvent avoir lieu avant ou après l'insertion du cofacteur.

Les cytochromes présentent des caractéristiques spectrales particulières dépendantes du type d'hème (Fig. 3) et de sa liaison avec l'hème. La forme réduite d'un cytochrome donne lieu à trois types d'absorptions maximales dans les spectres visible et UV, définis par les pics α , β et γ . Le pic α peut-être utilisé pour classifier les cytochromes:

- Les cytochromes de type *a* possèdent un pic α d'absorption vers 600 nm. Le groupement prosthétique (hème A) est lié à l'apoprotéine de manière non-covalente. Il possède un groupement formyl en position 8 de l'anneau tétrapyrrole ainsi qu'une chaîne latérale farnésylhydroxyéthyle en position 2.
- Les cytochromes de type *b* ont un maximum d'absorption entre 555 et 565 nm. Ils possèdent un protohème IX (hème B) attaché de manière non-covalente.
- Les cytochromes de type *c* absorbent au maximum entre 550 et 557 nm. Leur groupement prosthétique, le protohème IX (hème B) est lié de manière covalente sur l'apoprotéine par l'intermédiaire de deux liaisons thioéthers entre les chaînes latérales vinyles de l'hème et les deux thiols des deux cystéines du motif conservé CXXCH. L'atome de fer des cytochromes de type *c* possède en plus un ou deux ligands dont l'un est toujours une histidine. Ce type de cytochromes est ubiquitaire, il est retrouvé chez les bactéries, les archaebactéries et les eucaryotes et peut lier un seul hème (cas des eucaryotes) ou plusieurs (cas des bactéries) (Allen *et al.*, 2002; Hamel *et al.*, 2008).
- Les cytochromes de type *d* possèdent un pic d'absorption vers 630 nm. Ils possèdent un groupement prosthétique (hème D) qui n'est pas lié de manière covalente à l'apoprotéine. L'anneau C du tétrapyrrole est saturé.
- Les cytochromes de type *o* ont un maximum d'absorption entre 555 et 565 nm. Ils possèdent un hème contenant une chaîne latérale farnésylhydroxyéthyl (hème O).

Cet hème n'est pas attaché de manière covalente.

- D'autres types de cytochromes, les cytochromes p450, ont un pic d'absorbance à 450 nm. Ils ont en commun un thiolate comme ligand axial du fer au centre de l'hème. Le cytochrome p450 (CYP) a une implication particulière en médecine. En effet, cette enzyme, associée à la face interne du réticulum endoplasmique, est très impliquée dans la dégradation des molécules exogènes, en particulier des médicaments. Plus le cytochrome p450 est actif, et plus les médicaments sont rapidement détruits. De plus, le cytochrome p450 peut aussi hydrolyser le cholestérol en pregnenolone qui est une hormone stéroïde (Baston et Leroux, 2007). Ce type de cytochromes est impliqué dans de multiples réactions biosynthétiques conduisant à la synthèse de différentes hormones, de dérivés d'acides gras et de composés médicaux importants (Durst et O'Keefe, 1995). Les terpenoïdes, qui représentent l'une des classes les plus importantes de composés caractérisés chez la plante, sont souvent utilisés comme substrat par les cytochromes P450 de plantes (Durst et Nelson, 1995; Schuler et Werck-Reichhart, 2003).

2.1.2. Les cytochromes de type *c* bactériens

Typiquement chez les bactéries, la partie d'oxydation des quinols de la chaîne de transport d'électrons est riche en cytochromes. Souvent, il existe un autre médiateur entre la quinol oxydase et l'oxydoréductase terminale, généralement un cytochrome de type *c*.

Les cytochromes de type *c* sont des protéines qui possèdent un ou plusieurs hèmes liés de manière covalente à l'apoprotéine et qui sont impliqués dans des réactions de transfert d'électrons dans le périplasma des bactéries. Il existe chez les bactéries une grande diversité de respirations. Un grand nombre de cytochromes de type *c*, possédant souvent de multiples hèmes, sont présents chez ces organismes. Une analyse génomique basée sur la fréquence du motif CXXCH (le motif sur lequel l'hème sera fixé) montre que les bactéries pourraient contenir plus de trente cytochromes de type *c* (Ferguson, 2001).

Les cytochromes de type *c* jouent un rôle dans la chaîne respiratoire en transférant les électrons du complexe bc_1 vers des oxydases terminales et participent aux réactions redox, sans lien avec la respiration, des bactéries (Ferguson, 2001). Ils existent sous deux formes :

soit sous la forme de protéines périplasmiques solubles soit sous forme membranaire avec une partie N-terminale hydrophobe.

La forme soluble est généralement petite, d'une taille de 8 à 14 kDa, et est aussi appelée cytochrome *c* de classe I et représente l'homologue du cytochrome *c* mitochondrial (Moore et Pettigrew, 1990). Une grande variété de petits cytochromes *c* solubles a été isolée chez différentes bactéries et leurs structures ainsi que leurs fonctions dans le transport d'électrons a fait l'objet de multiples études (Lund et DeMoss, 1976; Meyer, 1996; Pettigrew et Moore, 1987).

Les cytochromes *c* solubles ont une fonction importante au niveau de la respiration bactérienne en transportant les électrons du complexe III vers le complexe IV.

Mais ils remplissent aussi des fonctions dans d'autres voies métaboliques. Par exemple, dans les bactéries Gram négatives métylotrophiques, le méthanol est oxydé en formaldéhyde par une méthanol déshydrogénase (MOX) et les électrons sont transférés par un cytochrome *c* aux oxydases terminales (Anthony, 1992; Goodwin et Anthony, 1995). Un autre exemple est le cytochrome *c*₃, un cytochrome *c* tétra-hémique identifié dans une bactérie anaérobie réduisant les sulfates, qui transfère les électrons entre une hydrogénase et une thiosulfate réductase (Barrett et Clark, 1987). On peut mentionner également l'hémoprotéine cytochrome *c*₆, présent dans le lumen des thylacoïdes des chloroplastes de nombreuses cyanobactéries et algues photosynthétiques, qui transfère les électrons entre le complexe *b₆f* et le photosystème I (PSI) (Kato, 1960; Kato et Takamiya, 1961; Kerfeld et Krogmann, 1998).

Des exemples de cytochromes *c* liés aux membranes et possédant un domaine hydrophile périplasmique sont le cytochrome *c*₅₀₀ de *Bacillus subtilis* (von Wachenfeldt et Hederstedt, 1990) possédant une fonction actuellement inconnue, CycM de *Bradyrhizobium japonicum*, *Paracoccus denitrificans* et *Rhizobium leguminosarum* qui transfère les électrons du complexe *bc*₁ vers la cytochrome *aa*₃ oxydase terminale (Bott *et al.*, 1991; Turba *et al.*, 1995; Wu *et al.*, 1996), le cytochrome *c_y* de *Rhodobacter capsulatus* qui fournit des électrons au centre réactionnel photosynthétique (Jenney et Daldal, 1993) ou au complexe *bc*₁ (Hochkoeppler *et al.*, 1995). Le produit du gène *cycG* de *Rhodobacter sphaeroides* est un cytochrome *c* di-hémique, mais son rôle dans la respiration n'a pas été démontré (Flory et Donohue, 1995).

La présence d'un très grand nombre de cytochromes de type *c* dans les bactéries ainsi

que leurs fonctions dans le transfert d'électrons associé à la respiration (aérobie ou anaérobie), à la photosynthèse ainsi que leurs fonctions dans d'autres voies métaboliques en font d'excellents modèles expérimentaux pour l'étude de leur maturation.

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

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

Le cytochrome c

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

Chez les animaux et les plantes, cette protéine est le sujet de nombreuses études en raison de son rôle dans l'induction de l'apoptose.

Le cytochrome c₁

Le cytochrome *c*₁ est une protéine de 31 kDa possédant une région C-terminale hydrophobe qui lui permet de s'associer à la membrane mitochondriale interne et une région N-terminale hydrophile orientée vers l'espace intermembranaire comportant l'hème. Sous-unité du centre catalytique du complexe III de la chaîne respiratoire, le cytochrome *c*₁, tout comme le cytochrome *c*, dispose d'un motif conservé CXXCH permettant de lier l'hème. Son rôle au sein de la chaîne respiratoire est de transférer ses électrons au cytochrome *c* qui les transférera *in fine* au complexe IV. Ses domaines extrinsèques partagent plusieurs propriétés électrochimiques et structurales avec des cytochromes *c* auxquelles s'ajoutent quelques particularités au niveau de sa structure et de sa fonction (Berry *et al.*, 2004; Iwata *et al.*, 1998; Xia *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1998).

Le cytochrome f

Le cytochrome f diffère des autres cytochromes de type c par sa taille et sa structure. C'est une protéine de 32 kDa qui possède une structure en feuillet β (Sabahi et Wittung-Stafshede, 2002). Elle est le principal composant du complexe photosynthétique b_6f localisé au niveau de la membrane des thylacoïdes des chloroplastes avec son domaine hydrophile orienté vers le lumen. Le cytochrome f participe au transfert des électrons entre les centres réactionnels photosynthétiques et les translocases de protons qui créent un potentiel électrochimique utilisé lors de la synthèse d'ATP (Hope, 2000). Le complexe chloroplastique b_6f est l'analogue fonctionnel du complexe bc_1 de la chaîne respiratoire mitochondriale (Soriano *et al.*, 1999).

Le cytochrome b_6

Le cytochrome b_6 compose, avec le cytochrome f , le cytochrome b_6f retrouvé dans les membranes photosynthétiques des cyanobactéries, des algues et des plantes vasculaires. Contrairement au cytochrome f qui est lié à un hème c , le cytochrome b_6 est lié par son site de liaison à la quinone à un type d'hème récemment découvert : l'hème c_1' (Kurisu *et al.*, 2003; Stroebel *et al.*, 2003). Ce cytochrome diffère des autres types de cytochromes de type c par un attachement à un seul résidu cystéine entre l'apocytochrome et l'hème (de Vitry *et al.*, 2004).

3. Les systèmes de maturation des cytochromes de type c

Tous les cytochromes de type c , à l'exception notable du cytochrome b_6 précédemment décrit, sont caractérisés par leur structure. Les hèmes sont attachés covalamment aux apoprotéines par deux liaisons thioethers entre les chaînes vinyloxyde de l'hème et les deux cystéines du motif conservé CXXCH de l'apocytochrome. Ce domaine fonctionnel est orienté du côté positif de la membrane cytoplasmique des bactéries, de l'espace intermembranaire des mitochondries et du lumen des thylacoïdes. Les étapes nécessaires à cet attachement covalent ont lieu dans ces mêmes compartiments.

Le terme « maturation des cytochromes c » correspond à l'ensemble des mécanismes menant à l'attachement entre les apocytochromes c et l'hème. Le transport de l'apocytochrome et de l'hème depuis leurs sites de synthèse respectif jusqu'à leur site d'assemblage est nécessaire pour leur attachement par liaison thioether. Trois systèmes de maturation, nommés système I, II et III, ont été initialement identifiés par des approches

génétiques et des études biochimiques effectuées chez des organismes modèles ainsi que par des recherches génomiques (Kranz *et al.*, 1998). Le système I a été décrit pour la première fois chez les α et γ protéobactéries, le système II chez les chloroplastes (Xie et Merchant, 1998) et les bactéries Gram positives (Beckett *et al.*, 2000), le système III chez les mitochondries de levures. À ces trois systèmes s'ajoute un quatrième système récemment identifié, utilisé pour l'assemblage du cytochrome b_6 (Kuras *et al.*, 1997).

Les levures ont évolué vers un mécanisme de maturation relativement simple comparé au système bactérien, se basant sur les protéines CCHL (cytochrome c hème lysase) (Dumont *et al.*, 1987) et CC₁HL (Nicholson *et al.*, 1989) ainsi que sur la protéine redox Cyc2p (Bernard *et al.*, 2005). Les orthologues des gènes CCHL sont trouvés dans le génome nucléaire des vertébrés, invertébrés et de certaines algues vertes (*Chlamydomonas reinhardtii*) ce qui suggère que leurs cytochromes c mitochondriaux sont assemblés selon le système III.

Curieusement, les mitochondries de plantes utilisent le système I, hérité de leur ancêtre α protéobactérien endosymbiotique, pour la maturation de leurs cytochromes de type c . Le système I est également retrouvé chez certaines β et chez la plupart des γ protéobactéries, chez *Deinococcus*, chez les archaeobactéries et dans les mitochondries de certains protistes et algues rouges primitives (Allen *et al.*, 2006; Burger *et al.*, 2000; Kranz *et al.*, 1998; Lang *et al.*, 1997; Ohta *et al.*, 1998; Page *et al.*, 1998; Turmel *et al.*, 2003).

Le système I implique huit à neuf gènes *ccm* (Cytochrome c Maturation) : *ccmA* à *ccmI* (Thöny-Meyer *et al.*, 1995). Bien que les systèmes I et II partagent certaines fonctions communes et certains motifs conservés, le système III semble complètement différent et son origine n'a pu être trouvé chez les procaryotes. S'ajoute à ces voies de maturation pour l'assemblage des cytochromes de type c :

- un quatrième système de maturation qui concerne l'assemblage des cytochromes b_6 avec l'hème c_1' et qui retrouvés dans les membranes photosynthétiques des cyanobactéries, des algues et des plantes. Ce système est décrit plus en détail dans la partie 3.1 de l'introduction.

- un cinquième, certainement requis pour l'assemblage d'un cytochrome c mitochondrial disposant d'un motif d'attachement inhabituel à une seule cystéine (XXXCH) retrouvé chez les euglènes et les trypanosomes (Allen *et al.*, 2004).

Dans ces deux derniers cas, l'hème est attaché à l'apoprotéine par un résidu unique et, dans le cas du cytochrome b_6 , l'hème c_1' est orienté vers le stroma, ce qui, comparé aux autres systèmes, correspond à un compartiment différent.

3.1. Le système IV : CCB

Le cytochrome b_6f , composé d'un dimère fonctionnel, contient deux groupements prosthétiques d'hème : l'hème c du cytochrome f et un nouveau type d'hème, l'hème c_i' , lié covalamment au cytochrome b_6 au niveau du site de liaison à la quinone Q_i dont l'assemblage a été caractérisé chez *Chlamydomonas* (Kuras *et al.*, 2007) et *Arabidopsis* (Lezhneva *et al.*, 2008). Comme mentionné précédemment, ce système de maturation diffère des systèmes I, II et III par l'attachement via un seul résidu cystéine entre l'apocytochrome b_6 et l'hème c_i' réalisé du côté négatif de la membrane (stroma des tylacoïdes ou cytosol des cyanobactéries).

Des études biochimiques ont démontré que ce processus de maturation n'est pas spontané et qu'au moins quatre facteurs protéiques, codés par le génome nucléaire, sont nécessaires à l'attachement de l'hème au cytochrome b_6 . Les gènes codant pour ces protéines ont été appelés gènes *CCB* (cofactor assembly of complex C targeting subunit B) (Kuras *et al.*, 1997). Récemment, quatre gènes *CCB* ont été caractérisés chez *Chlamydomonas* et leur analyse révèle l'existence d'un nouveau système de maturation situé du côté chargé négatif de la membrane et que celui-ci pourrait être conservé chez tous les organismes photosynthétiques (Kuras *et al.*, 2007). Des études de mutants touchant les orthologues de ces gènes chez *Arabidopsis* ont démontré l'ubiquité des protéines *CCB* dans les chloroplastes pour la liaison de l'hème c_i' (Lezhneva *et al.*, 2008).

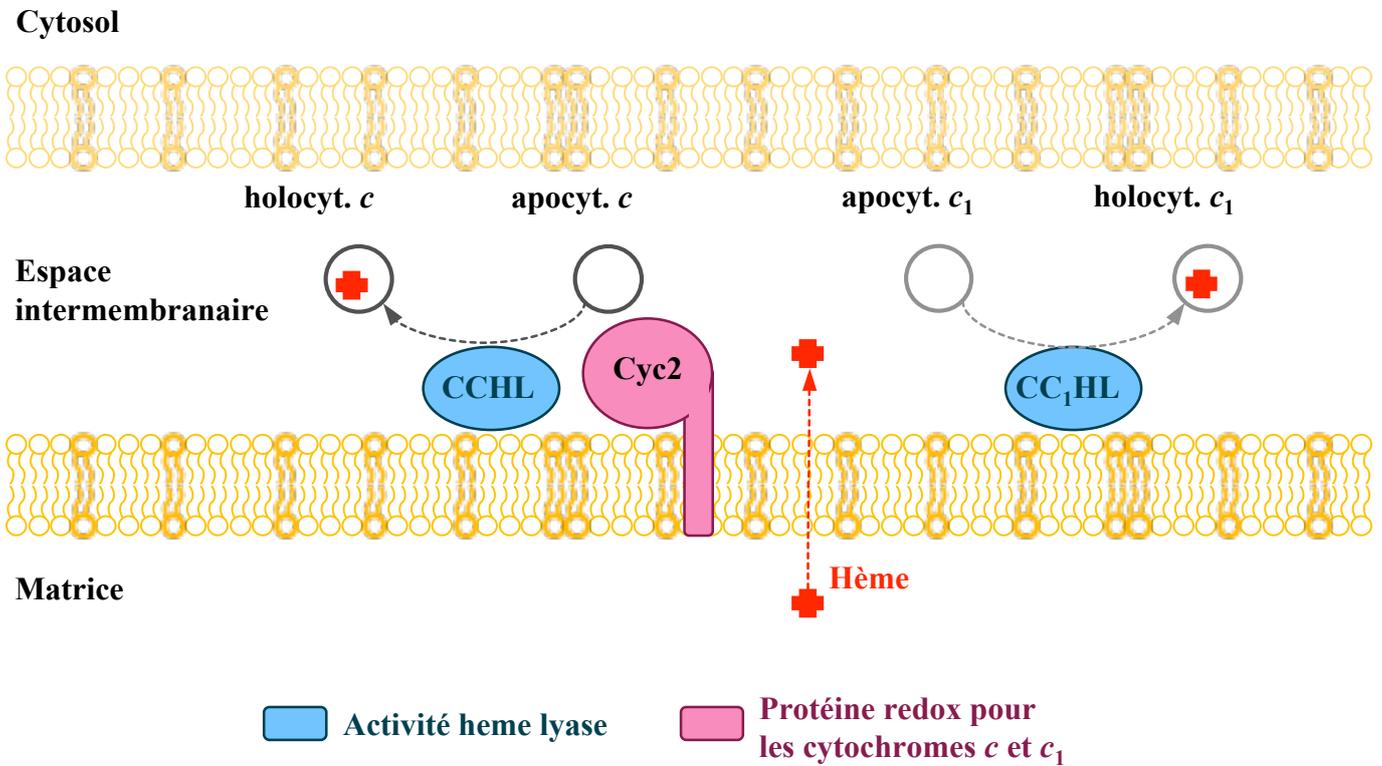


Figure 4 : Représentation schématique du système III de maturation des cytochromes de type *c* retrouvé dans les mitochondries de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. La protéine Cyc2 est une flavoprotéine NADPH dépendante requise pour l'assemblage des cytochromes de type *c*. Les protéines CCHL et CC₁HL (cytochrome *c* et *c*₁ heme lyase) sont capables à elles seules de lier l'hème aux apocytochromes *c* et *c*₁ respectivement.

3.2. Le système III : CCHL

Le composant clé de ce système est la protéine CCHL (Cytochrome c hème lyase) (Fig. 4). Les premières CCHL ont été découvertes par l'analyse génétique de la biogenèse des cytochromes de type *c* et *c*₁ dans les mitochondries de champignon, tout particulièrement *Saccharomyces cerevisiae* et *Neurospora crassa* (Cervera *et al.*, 1998; Drygas *et al.*, 1989; Dumont *et al.*, 1987; Zollner *et al.*, 1992).

À en juger par l'analyse des génomes, la voie des CCHL est retrouvée dans les mitochondries de champignons, d'animaux, de certains parasites, des diatomées et d'algues vertes (Bernard *et al.*, 2003). Deux protéines, CCHL et CC₁HL, sont requises pour l'assemblage des cytochromes *c* et *c*₁ respectivement, mais leur activité au cours de l'assemblage reste incompris (Stuart et Neupert, 1990; Tong et Margoliash, 1998). Les génomes des eucaryotes multicellulaires, dont l'homme, révèlent que seule une hème lyase (HCCS, pour HoloCytochrome c Synthétase) possède les activités combinées de CCHL et CC₁HL (Bernard *et al.*, 2003; Steiner *et al.*, 1996).

Le système III apparaît comme extrêmement simple en termes de composition comparé à la complexité des systèmes I et II. De nombreux criblages génétiques effectués chez les champignons n'ont pas réussi à identifier d'autres composants impliqués dans la livraison de l'hème ou des réductants au niveau du site d'assemblage (Kranz *et al.*, 1998; Sherman, 1990). Il y a des données biochimiques concernant l'implication de certains nucléotides comme NADH et FMN dans l'assemblage des cytochromes de type *c* et *c*₁ *in organello* (Nicholson et Neupert, 1989; Nicholson *et al.*, 1989) mais l'identité des composants redox impliqués dans ce processus sont inconnus. Une hypothèse avance que Cyc2p (présente dans les mitochondries de levures mais absente dans les mitochondries animales) maintient les résidus sulfhydriques au niveau du motif CXXCH et/ou maintient le co-facteur de l'hème en un état réduit avant la réaction de ligation catalysée par CCHL (Bernard *et al.*, 2003; Bernard *et al.*, 2005).

Comme les cytochromes *c* et *c*₁ sont assemblés dans l'espace intermembranaire alors que l'apocytochrome et les substrats de l'hème proviennent de compartiments différents, le processus de maturation des cytochromes *c* requière chronologiquement : 1) la synthèse de l'apocytochrome et des substrats de l'hème, 2) la livraison de ces substrats dans l'espace intermembranaire dans un état réduit 3) la catalyse de la réaction de ligation.

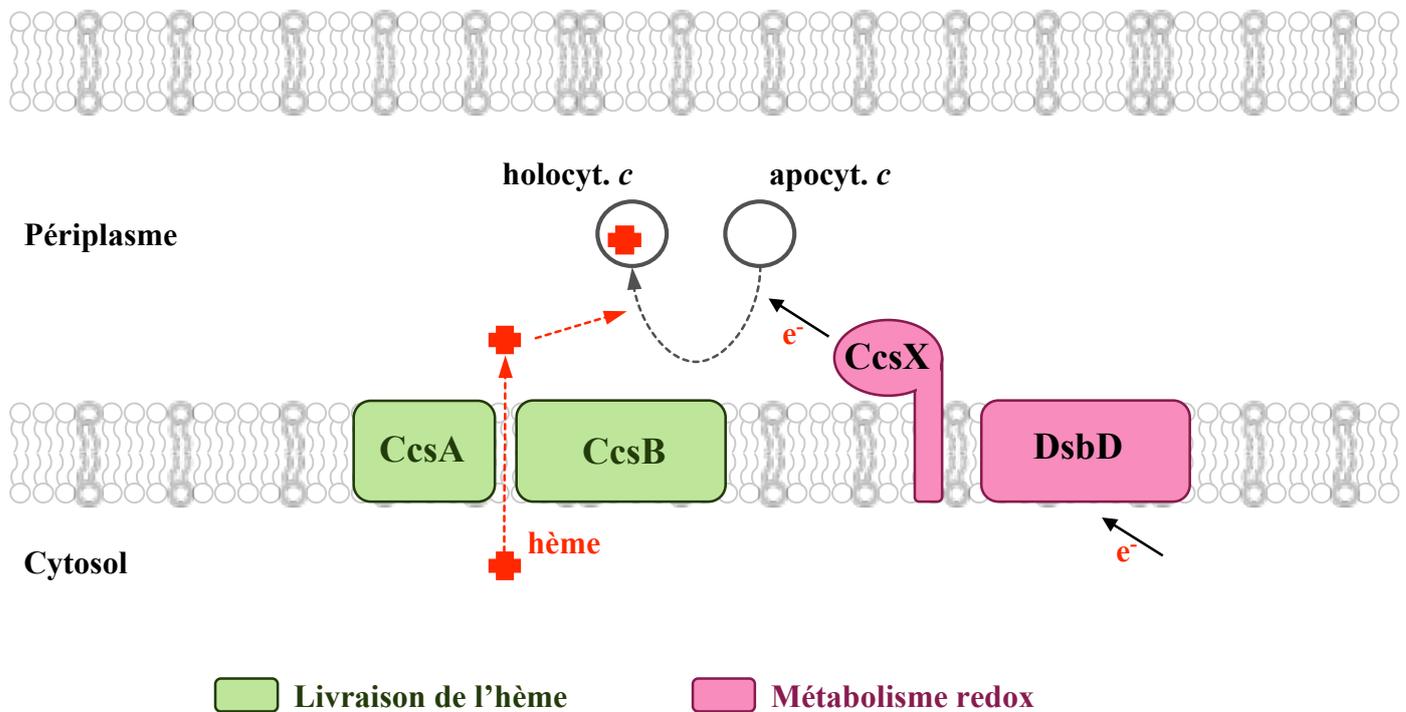


Figure 5 : Représentation schématique du système II de maturation des cytochromes de type *c* retrouvé chez la bactérie Gram négative *Bordetella pertussis* (Beckett *et al*, 2000). Dans ce modèle, les protéines CcsA et CcsB (Cytochrome c synthesis) forment un système de livraison de l'hème. CcsX et DsbD sont des protéines transmembranaires impliquées dans la biogenèse des cytochromes de type *c* par leur fonction réductrice.

3.3. Le système II : CCS

Le système II, aussi appelé voie CCS (pour « Cytochrome c Synthesis »), a été originellement découvert dans les chloroplastes de l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii* par des études portant sur l'assemblage du complexe *b₆f* (Page *et al.*, 2004; Xie *et al.*, 1998) (Fig. 5). CcA et Ccs1/CcsB, qui sont définis comme des composants de ce système (Inoue *et al.*, 1997; Le Brun *et al.*, 2000; Tichy et Vermaas, 1999; Xie et Merchant, 1996), sont retrouvées dans les génomes des cyanobactéries, des β , δ , ϵ -protéobactéries et dans la plupart des bactéries Gram positives (Le Brun *et al.*, 2000; Tichy et Vermaas, 1999).

Bien que seulement quatre facteurs soient retrouvés dans les modèles bactériens (Feissner *et al.*, 2005; Le Brun *et al.*, 2000; Tichy et Vermaas, 1999), des expériences effectuées chez *Chlamydomonas* et *Arabidopsis* ont démontré qu'au moins sept composants participent au processus de maturation des cytochromes de type *c* plastidiques (Page *et al.*, 2004; Xie *et al.*, 1998). Il est possible que les particularités propres aux compartiments des thylacoïdes ont rendu le processus d'assemblage des cytochromes *c* plastiques plus complexe que chez les bactéries. Le modèle le plus répandu est que CcsA et Ccs1/CcsB forment ensemble une plateforme de livraison de l'hème depuis le stroma/cytosol vers le lumen/périplasme des thylacoïdes/cellules, prélude nécessaire à la réaction de ligation (Beckett *et al.*, 2000; Dreyfuss *et al.*, 2003; Feissner *et al.*, 2006a; Goldman *et al.*, 1998; Hamel *et al.*, 2003).

Les éléments requis pour la voie de réduction des thiols du système II ont été établis par des approches classiques de génétique inverse dans les systèmes plastidiques et bactériens. Les composants de cette voie incluent un composant membranaire thiol/disulfide de la famille de CcdA/DsbD dont l'implication dans la maturation des cytochrome *c* a été démontré pour la première fois dans les bactéries *Bacillus subtilis* et *Bordetella pertussis* (Bardischewsky et Friedrich, 2001; Deshmukh *et al.*, 2000; Erlendsson et Hederstedt, 2002) et plus récemment chez la plante *Arabidopsis* (Page *et al.*, 2004). Un autre composant de la voie des thio-réductions du système II sont les protéines Hcf164, semblable à une thioredoxine, ancrée dans la membrane et orientée du côté positif retrouvée dans les chloroplastes et ResA/CcsX retrouvée chez les bactéries. Toutes deux sont requises pour l'accumulation du complexe *b₆f* chloroplastique chez *Arabidopsis* d'une part et pour l'accumulation du cytochrome *c* chez de

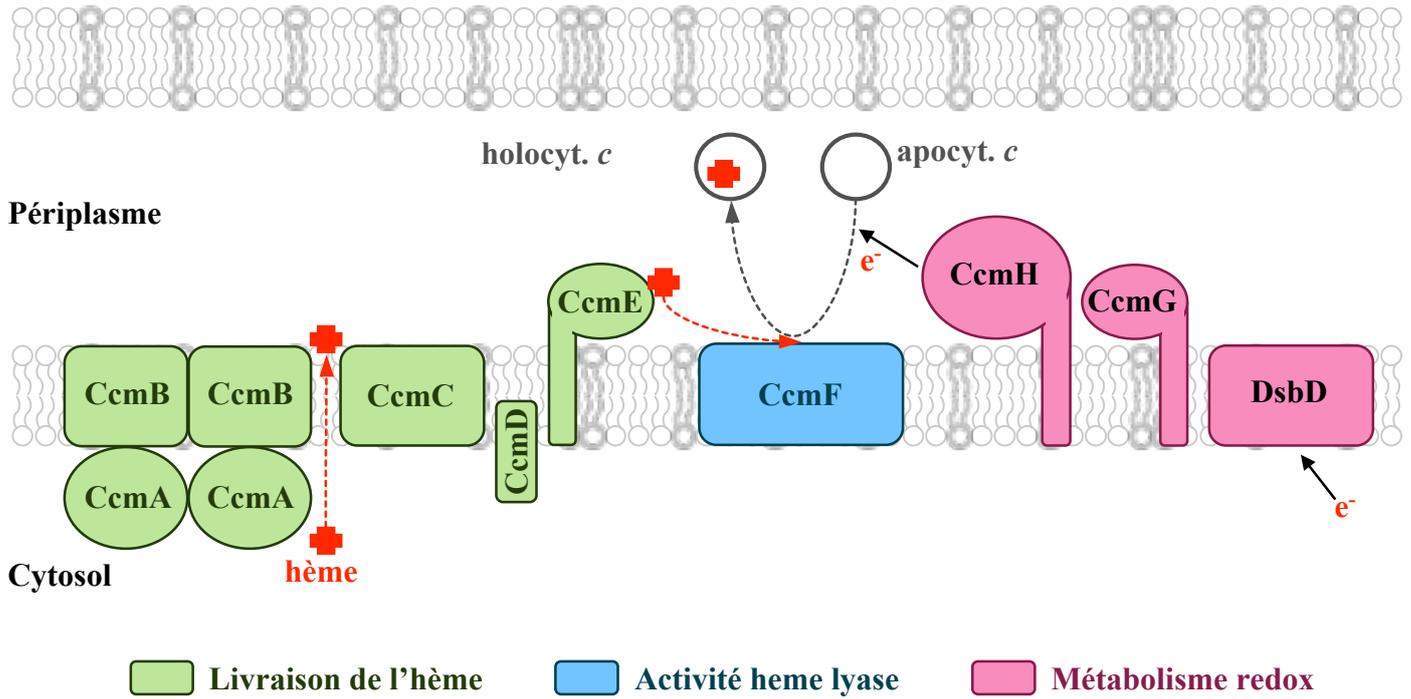


Figure 6 : Représentation schématique du système I de maturation des cytochromes de type *c* retrouvé chez la bactérie *Escherichia coli*. Dans ce système, cinq protéines sont impliquées dans la livraison de l'hème (en vert), une est impliquée dans la liaison de l'hème à l'apocytochrome (en bleu) et trois sont impliquées dans le métabolisme redox (en rose).

nombreuses bactéries d'autre part (Beckett *et al.*, 2000; Erlendsson *et al.*, 2003; Lennartz *et al.*, 2001).

3.4. Le système I chez les bactéries

Les gènes bactériens impliqués dans la maturation des cytochromes *c* ont été identifiés par l'analyse génétique. Chez la bactérie Gram négative *Escherichia coli*, huit gènes (*ccmABCDEFGH*) sont essentiels pour la maturation des cytochromes *c* (Thöny-Meyer *et al.*, 1995). Une délétion de ces huit gènes chez *E. coli* peut être complétée par l'expression des quatre gènes du système II de *Bordetella pertussis* (CcsB, CcsA, DsbD et CcsX), indiquant que le système I et II remplissent les mêmes fonctions (Feissner *et al.*, 2006b).

Les gènes du système I codent pour un transporteur ABC (ATP Binding Cassette, voir partie 4 de l'introduction) (CcmA, CcmB et potentiellement CcmC), deux protéines (CcmC et CcmD) nécessaires à la livraison de l'hème à CcmE, le chaperon d'hème, et une hème lyase putative (CcmF) qui pourrait être associée à des composants de la voie des thioréductions (CcmG et CcmH). Viennent s'ajouter trois gènes *dsb* (disulfide bond formation) nécessaires à la production de l'holocytochrome *c* (Fig. 6). Il est généralement accepté que la maturation des cytochromes *c* se divise en trois étapes : 1) La thioréduction et la livraison de l'apocytochrome *c* 2) La livraison de l'hème 3) L'assemblage de ces deux éléments pour former l'holocytochrome *c*.

3.4.1. Le transporteur ABC : CcmA, CcmB et CcmC

Des expériences menées chez la bactérie *Rhodobacter capsulatus* ont démontré l'existence d'un transporteur de type ABC composé de protéines *ccm* (Goldman *et al.*, 1998). Le premier modèle proposé supposait une fonction de transport de l'hème effectuée par un transporteur de stœchiométrie CcmA₂BCD avec CcmA étant la partie de liaison aux nucléotides, CcmB et CcmC étant les deux domaines transmembranaires et CcmD étant une protéine accessoire du transporteur. Un second modèle proposait une structure différente, de type CcmA₂B₂, ayant une fonction dans le transport d'un substrat autre que l'hème (Goldman et Kranz, 2001).

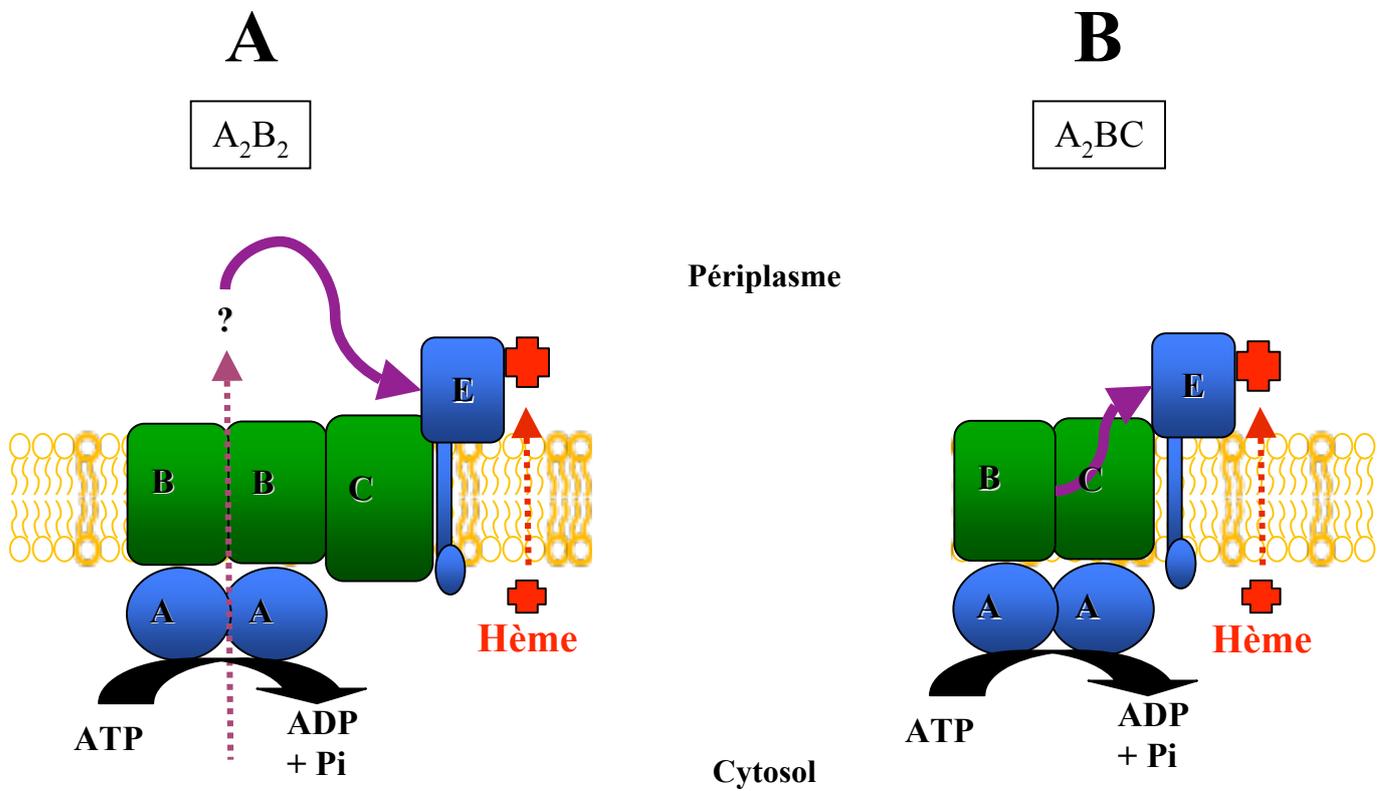


Figure 7 : Les différents modèles proposés pour la structure et la fonction du transporteur ABC impliqué dans la maturation des cytochromes de type *c* chez les bactéries utilisant le système I.
 A, Le transporteur ABC de structure A_2B_2 transporte un réductant nécessaire au transfert de l'hème de CcmE à l'apocytochrome (Modèle d'étude : *E. coli*. Christensen *et al*, 2007)
 B, Le transporteur ABC de structure A_2BC utilise l'énergie issue de l'hydrolyse de l'ATP pour le relargage du chaperon d'hème CcmE de CcmC (Modèle d'étude : *E. coli*. Feissner *et al*, 2006)

En effet, le rôle d'exporteur d'hème rempli par ce transporteur semble improbable selon des études effectuées sur des mutants $\Delta ccmA$ d'*E. coli*, qui ont démontré que cette mutation n'empêchait pas la formation des cytochromes de type *b* dans le périplasma (Throne-Holst *et al.*, 1997) ou le transfert de l'hème à CcmE (Schulz *et al.*, 1999). Deux autres études, l'une mesurant le transport de l'hème chez *E. coli* (Cook et Poole, 2000), et l'autre analysant des mutants des protéines orthologues de CcmA et CcmB chez *Paracoccus denitrificans* (Page *et al.*, 1997), ont également conclu que ce transporteur ABC ne transporte pas l'hème à travers la membrane.

D'autres modèles proposent des structures différentes où le transporteur n'a aucun rôle dans le transport de l'hème et où CcmC a une fonction distincte des protéines CcmA et CcmB (Cianciotto *et al.*, 2005; Schulz *et al.*, 1999). Dans ce cas de figure, la livraison de l'hème serait prise en charge par CcmC, CcmD et le chaperon d'hème CcmE. Deux fonctions et structures différentes de ce transporteur ABC ont été supposées (Fig. 7). L'une propose une structure en A_2B_2 capable de transporter un composé (par exemple un réductant) essentiel au relargage de l'hème à l'apocytochrome *c* (Christensen *et al.*, 2007). Un second modèle propose que ce transporteur, de structure A_2BC , utilise l'hydrolyse de l'ATP pour procéder à un changement de conformation qui permet la libération du chaperon d'hème CcmE (Feissner *et al.*, 2006a).

3.4.2. Le système de livraison d'hème : CcmC et CcmD

Chez *E. coli*, l'hème est transféré vers le chaperon d'hème CcmE avec l'aide de CcmC et CcmD. Une surproduction de CcmC est capable à elle seule de transférer l'hème en l'absence de CcmD, tandis que CcmD est capable d'augmenter l'efficacité de l'attachement de l'hème (Schulz *et al.*, 1999). CcmC comporte un domaine conservé riche en tryptophane WWD (WGx φ WxWDxRLT avec φ étant acide aminé avec un noyau aromatique). Ce motif partage une forte homologie de séquence avec le domaine riche en tryptophane retrouvé chez CcmF, NrfE et l'homologue CcsA du système II (Thöny-Meyer, 2000). Il a été supposé que ce motif serve de plateforme pour l'interaction entre l'hème et CcmE avec les deux histidines servant de ligand axial pour l'hème (Goldman *et al.*, 1997; Schulz *et al.*, 2000). Toutefois, il a été démontré que ce motif riche en tryptophane, retrouvé aussi sur la protéine AtCcmF, est fonctionnellement requis pour la liaison de l'hème avec CcmE (Ren et Thony-Meyer, 2001).

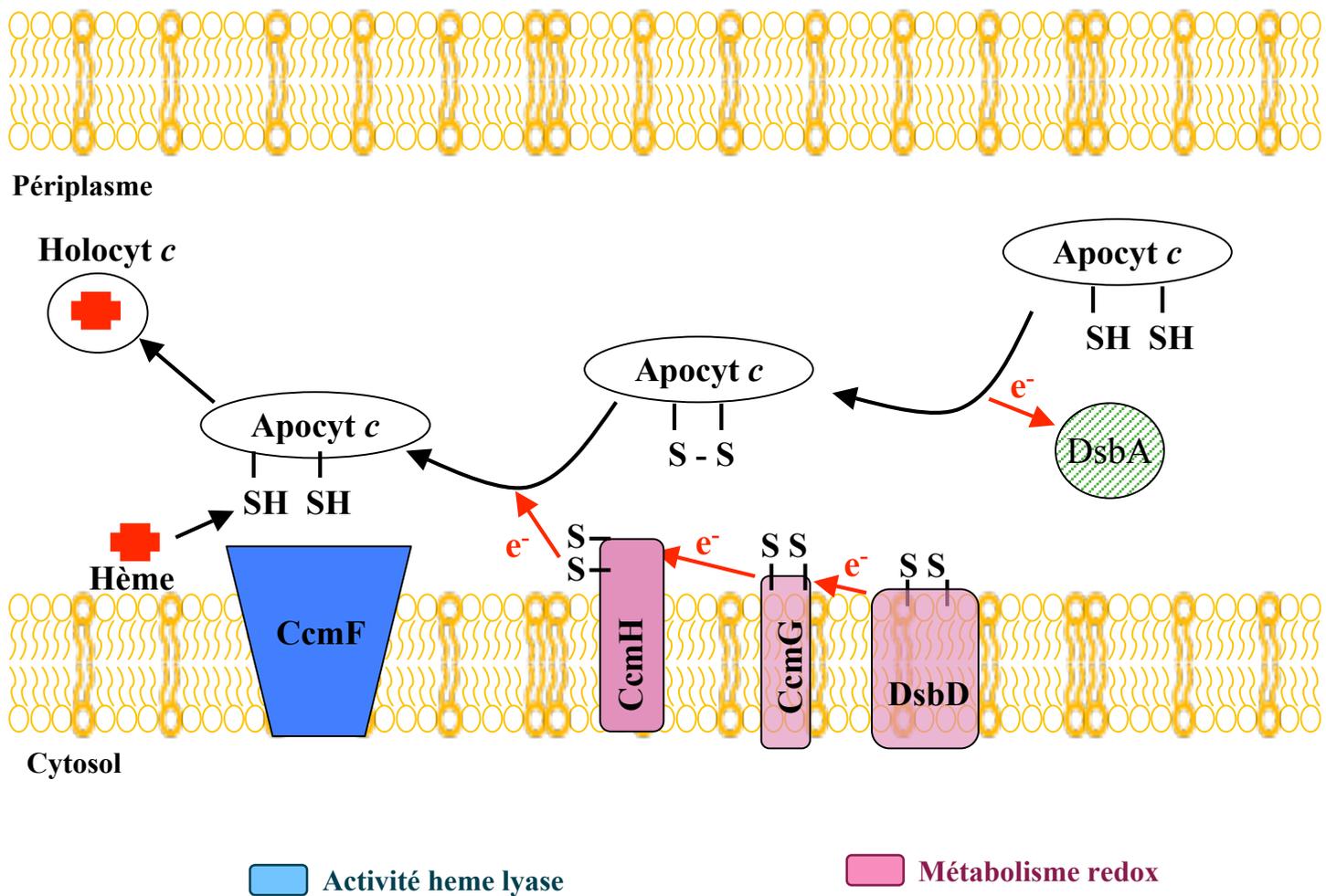


Figure 8 : Voie de réduction de l'apocytochrome *c* chez les bactéries utilisant le système I. Les cystéines du motif CXXCH de l'apocytochrome *c* sont réduites par la voie de réduction prise en charge par les protéines CcmH, CcmG et DsbD. Dans les mitochondries d'*Arabidopsis*, seul l'homologue de CcmH a été retrouvé.

CcmD est une protéine essentielle pour la maturation des cytochromes *c* et est impliquée dans la livraison de l'hème à CcmE. Il a été démontré que CcmD peut interagir avec CcmC et CcmE (Ren et Thony-Meyer, 2001).

3.4.3. Le chaperon d'hème : CcmE

La voie de livraison de l'hème n'est pas encore complètement comprise. Le composant clé de cette voie est le chaperon d'hème CcmE qui lie l'hème covalamment au niveau d'un résidu histidine conservé (Schulz *et al.*, 1998). CcmC est la seule protéine Ccm strictement requise pour le transfert de l'hème à CcmE (Schulz *et al.*, 1999) tandis que CcmD est impliquée dans la formation d'un complexe entre CcmC et CcmE (Ahuja et Thony-Meyer, 2005). La capacité de CcmE à lier covalamment l'hème via un motif autre que CXXCH est un cas unique dans les trois systèmes de maturation des cytochromes de type *c*. CcmE est capable de se lier à l'hème si elle est exprimée en tant que protéine soluble dans le périplasme. Par contre, CcmE ne peut lier l'hème si elle est exprimée dans le cytoplasme, indiquant ainsi que l'attachement a lieu dans le périplasme (Schulz *et al.*, 1998).

3.4.4. La voie de réduction : CcmG, CcmH

Les apocytochromes *c* sont exportés par la voie de sécrétion vers le périplasme où la protéine oxydante DsbA forme un pont disulfide entre les cystéines du motifs d'attachement de l'hème (Thöny-Meyer et Kunzler, 1997). En cas d'attachement de plusieurs hèmes à un seul cytochrome, ce mécanisme permettrait d'éviter un nombre illégitime de paires cysteinyles.

Différentes protéines prennent en charge la voie de réduction de l'apocytochrome (Fig. 8) : Un des modèles de cette voie propose que CcmG, une thioredoxine ancrée dans la membrane, et CcmH, une oxidoréductase thiol-disulfide, réduisent le pont disulfide intramoléculaire avant l'attachement de l'hème en transférant les électrons de la thioredoxine cytosolique à l'oxidoréductase disulfide transmembranaire DsbD (Fabianek *et al.*, 2000; Reid *et al.*, 2001; Setterdahl *et al.*, 2000). Toutefois, l'étude de mutants $\Delta ccmG$ chez *Rhodobacter capsulatus* indique que CcmG, ainsi que les autres protéines DsbA et CcdA impliquées dans

la voie de réduction, ne sont pas essentielles pour la production des cytochromes *c* (Turkarlan *et al.*, 2008).

3.4.5. L'hème lyase : *CcmF*

CcmF, une grande protéine ayant 11 domaines transmembranaires, est certainement la moins bien comprise des protéines *ccm*. Elle possède un motif riche en tryptophane WWD, comme *CcmC*, ainsi que des histidines conservées, tous étant fonctionnellement requis pour la maturation des cytochromes de type *c* (Ren *et al.*, 2002). Cette protéine est supposée être le point de convergence des voies de livraison de l'hème et de l'apocytochrome, et d'agir comme l'équivalent de la « cytochrome *c* hème lyase » (CCHL) conjointement avec *CcmH*. Des expériences de co-immunoprécipitation démontrant que *CcmF* interagit avec *CcmE* et *CcmH* chez *E. coli* (Ren *et al.*, 2002) ainsi que la caractérisation d'un complexe comprenant *CcmFHI* chez *Rhodobacter capsulatus* (Sanders *et al.*, 2008) vont dans le sens d'un complexe d'assemblage.

Chez certaines bactéries, une nitrite réductase périplasmique, *Nrf1*, contient le motif inhabituel CXXCK destiné à lier l'hème. *NrfE*, un paralogue spécifique de *CcmF*, est requis pour permettre la ligature avec un orthologue de *CcmH* (Grove *et al.*, 1996). La spécificité de substrat de la machinerie *ccm* pour l'apocytochrome est apparemment limitée au motif de liaison à l'hème contenant les deux cystéines et l'histidine (Allen et Ferguson, 2006).

3.5. Le système I dans les mitochondries de plantes : Les gènes *ccm*

Chez *E. coli*, les gènes *ccm* sont codés au niveau d'un locus par un seul opéron. Par contre, chez les plantes, les gènes *ccm* sont répartis entre différents loci dans le génome nucléaire et le génome mitochondrial.

3.5.1. Les gènes *ccm* codés par le génome mitochondrial de plantes

Chez *Arabidopsis*, cinq gènes *ccm* ont été identifiés dans le génome mitochondrial : *ccmB*, *C*, *F_{N1}*, *F_{N2}* et *F_C*. Tous se situent à des loci différents (Unselde *et al.*, 1997). Le cas de

CcmF est particulier chez les plantes, car il n'est pas codé par un seul gène comme cela est le cas chez les bactéries, mais par deux à trois gènes, chacun étant l'orthologue d'un domaine différent du *ccmF* bactérien. Cette séparation diffère selon les espèces. *ccmF* semble séparé en deux parties chez la plupart des plantes (Giegé *et al.*, 2004; Gonzalez *et al.*, 1993). Toutefois, chez *Brassica napus* et *Arabidopsis*, *ccmF_N* est codé par deux gènes *ccmF_{N1}* et *ccmF_{N2}* (Handa, 2003). Chez *Marchantia polymorpha*, c'est le gène *ccmF_C* qui est séparé en deux (Oda *et al.*, 1992). Cette division de *ccmF* chez les plantes est probablement due à des événements de recombinaisons qui sont fréquents dans les génomes mitochondriaux de plantes (Klein *et al.*, 1994).

Le niveau de transcription des gènes *ccm* a été établi dans les mitochondries d'*Arabidopsis* (Giegé et Brennicke, 1999). Le niveau de transcription de ces gènes est en moyenne trois fois inférieur au niveau global des mRNA dans les mitochondries d'*Arabidopsis* (Giegé *et al.*, 2000). Bien qu'étant faiblement exprimés, les transcrits des gènes *ccm* sont fortement édités, avec en moyenne 26 sites d'édition par kb contre 15 sites d'édition par kb en moyenne sur l'ensemble des mRNAs mitochondriaux (Giegé et Brennicke, 1999).

3.5.2. Les gènes *ccm* codés par le génome nucléaire de plantes

L'analyse de multiples génomes mitochondriaux de plantes nous a ainsi montré que la mitochondrie ne contient jamais toutes les séquences orthologues des gènes bactériens *ccm* du système I. Ainsi, il a été prédit que les autres gènes du système I ont été perdus par la mitochondrie pour être transférés au cours de l'évolution dans le génome nucléaire. Ce transfert est facilité par le fait que les mitochondries et le noyau partagent le même code génétique chez les plantes contrairement aux animaux. Toutefois, afin de transférer des séquences fonctionnelles vers le noyau, les séquences doivent provenir de la transcription reverse de transcrits mitochondriaux matures, comme cela a été observé pour le gène *cox2* du soja (Covello et Gray, 1993).

Les gènes *ccm* ont bien été transférés dans le noyau des plantes. *AtCCME* fut identifié (Spielewoy *et al.*, 2001) puis, une fois que la séquence du génome nucléaire d'*Arabidopsis* a été rendue disponible, fut suivi de *AtCCMH* sur le chromosome 1 (Meyer *et al.*, 2005) et de *AtCCMA* également sur le chromosome 1 (Rayapuram *et al.*, 2007). Chez *Arabidopsis*, les trois gènes sont présents en une seule copie chacun et *CCMH* code pour une protéine correspond à la moitié N-terminale de la protéine CcmH d'*E. coli*. L'identification a été

effectuée principalement par similarité de séquence, mais dans le cas de *AtCCMA*, l'identification a été facilitée par l'inventaire complet des transporteurs ABC chez *Arabidopsis* (Sanchez-Fernandez *et al.*, 2001a). D'autres séquences *ccm* (celles codées par la mitochondrie) sont également retrouvées sur le chromosome 2 faisant partie d'un fragment de 620 kb d'ADN mitochondrial intégré dans le génome nucléaire (Stupar *et al.*, 2001). Néanmoins, il est supposé que ces séquences ne sont pas exprimées, précisément parce que leur origine provient de l'insertion d'ADN et non d'ADNc obtenu à partir de transcrits matures et édités.

Les transcrits des trois gènes *ccm* du noyau des cellules d'*Arabidopsis* sont exprimés faiblement car ils ne sont détectables que par RT-PCR (Meyer *et al.*, 2005; Rayapuram *et al.*, 2007; Spielewoy *et al.*, 2001). Cette expression est retrouvée dans tous les organes de la plante.

3.5.3. Certains gènes *ccm* bactériens n'ont pas d'orthologues chez les plantes

Après l'analyse de toutes les séquences génomiques nucléaires et mitochondriales, il est apparu que des séquences similaires à seulement six gènes *ccm* de bactéries ont été retrouvés chez les plantes. Ainsi, l'ensemble des huit ou neuf gènes *ccm* bactériens n'a pas été clairement identifiés chez les plantes. Les gènes qui n'ont pas été retrouvés sont *ccmD*, *ccmI* et *ccmG*. Trois hypothèses pourraient expliquer cette situation :

1) Il est possible que les séquences de ces gènes aient divergé chez les plantes à un point où la reconnaissance par alignement de séquence ne soit plus possible. Si ces gènes existaient chez les plantes, les protéines exprimées pourraient être similaires aux trois protéines Ccm bactériennes d'un point de vue tridimensionnel plutôt qu'en termes de séquences primaires.

2) Il est aussi possible que les fonctions remplies par les gènes *ccmD*, *ccmI* et *ccmG* chez les bactéries soient devenues redondantes et que leurs fonctions aient été reprises par d'autres protéines chez la plante. C'est une des hypothèses avancées concernant *ccmG* qui pourrait avoir été remplacé par une des nombreuses thiorédoxines qui ont évolué chez les plantes (Meyer *et al.*, 2005).

3) Il n'est pas non plus impossible que les fonctions de ces trois gènes ne soient pas essentielles chez les plantes. En effet, le périplasme bactérien et l'espace intermembranaire

Cytosol

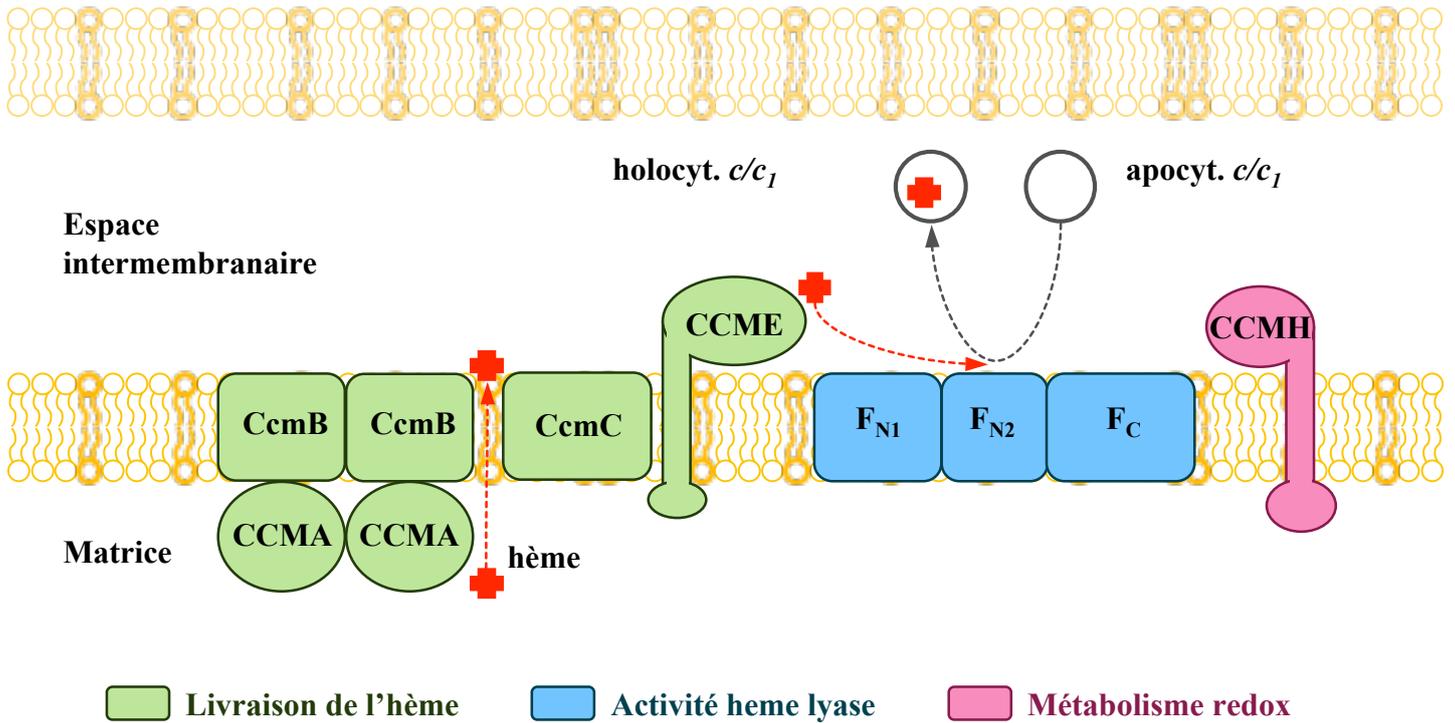


Figure 9 : Représentation schématique du système I de maturation des cytochromes de type c retrouvé chez *Arabidopsis thaliana*. Dans ce système, quatre protéines sont impliquées dans la livraison de l'hème (en vert), trois sont impliquées dans la liaison de l'hème à l'apocytochrome (en bleu) et une est impliquée dans le métabolisme redox (en rose).

mitochondrial, tous deux étant les compartiments où ont lieu les processus de maturation, représentent des environnements différents, par exemple en termes d'état redox.

3.6. Le système I dans les mitochondries de plantes :

Fonctions des protéines ccm

Le système I retrouvé dans les mitochondries de plantes (Fig. 9) ressemble en beaucoup de points à celui retrouvé chez les bactéries. Les protéines composant ce système et leurs différences avec leurs homologues bactériens sont décrites ci-dessous.

3.6.1. CCMA, CcmB et CcmC, composants potentiels d'un transporteur ABC

Un transporteur ABC de type bactérien dans les mitochondries de plantes

Contrairement aux transporteurs ABC mitochondriaux décrits à ce jour, qui appartiennent tous à la famille des demi-transporteurs ou transporteurs entiers (Lill et Kispal, 2001), le transporteur ABC des ccm est de type bactérien : ses domaines transmembranaires et de liaison à l'ATP sont codés sur des protéines séparées. Les études effectuées chez les bactéries sur ce transporteur sont donc précieuses afin de comprendre son équivalent dans les mitochondries d'*Arabidopsis*.

Les mitochondries de plantes terrestres utilisant le système I de maturation (à l'exception des mitochondries de l'algue *Chlamydomonas reinhardtii* qui utilise le système III (Allen *et al.*, 2008)), nous pouvons supposer que l'un ou l'autre des modèles bactériens concernant le transporteur ABC des ccm se vérifie dans les mitochondries d'*Arabidopsis thaliana*.

Recherche de l'orthologue de CcmA dans les mitochondries de plantes

L'analyse du génome mitochondrial de plantes a permis de trouver des gènes codant pour des protéines présentant des similarités avec les protéines CcmB (Favre-Nitschke *et al.*, 2001) et CcmC (Bonnard et Grienenberger, 1995), protéines candidates pour la constitution de la partie transmembranaire du transporteur ABC. Tous les transporteurs ABC sont organisés en quatre modules, deux modules composant la partie transmembranaire et deux modules composant la partie de liaison à l'ATP. Certaines protéines formant la partie

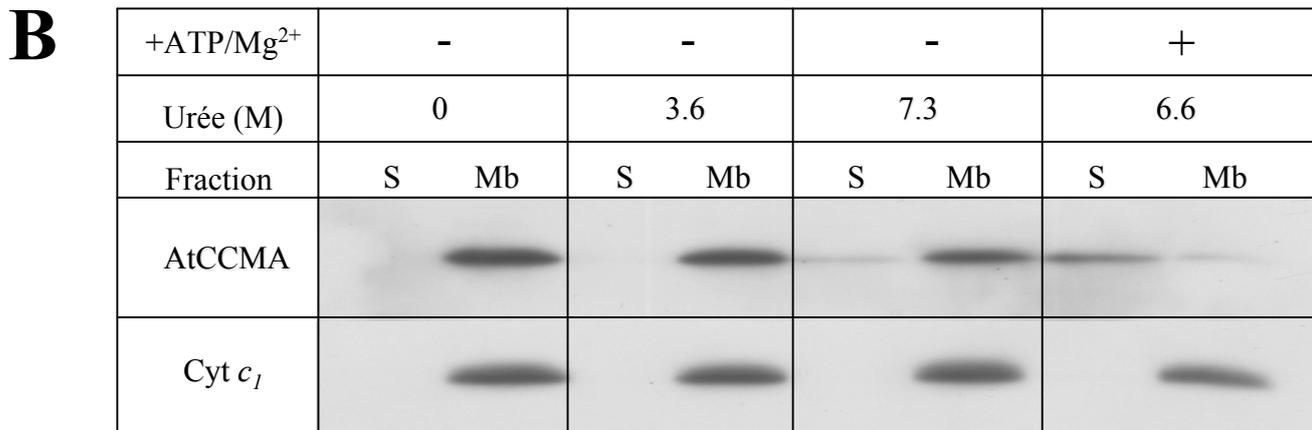
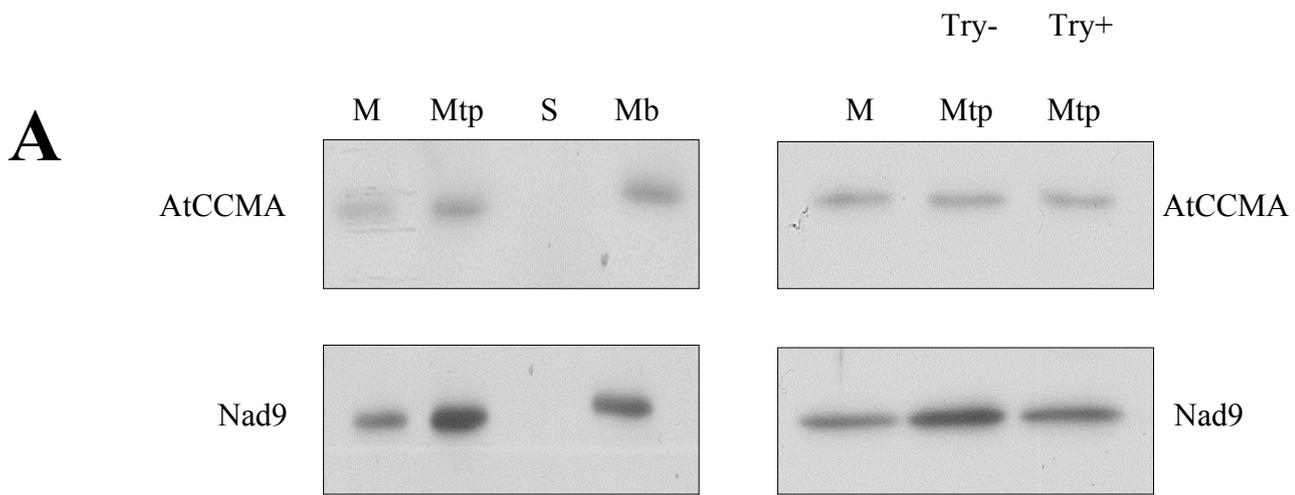


Figure 10 : AtCCMA a des propriétés typiques d'un domaine de liaison à l'ADN des transporteurs ABC. *A*, Immunodétection des protéines AtCCMA et Nad9 effectuée sur différentes fractions mitochondriales (Fraction M : mitochondriale totale, Mtp : Mitoplaste, S : Soluble, Mb : Membranaire), avec ou sans traitement à la trypsine (Try - et +). Nad9 est une protéine extrinsèque de la membrane interne utilisée ici comme contrôle.

B, Immunodétection d'AtCCMA dans les fractions solubles (S) et membranaires (Mb) de mitochondries d'*Arabidopsis*. La présence d'ATP/Mg²⁺ combinée avec l'urée facilite la solubilisation d'AtCCMA.

transmembranaire des transporteurs ABC possèdent des motifs conservés (Locher *et al.*, 2002), la plupart ont une topologie typique de 6 domaines transmembranaires (Higgins, 1992).

Toutefois, le gène codant pour la partie de liaison aux nucléotides, CcmA, n'a pu être trouvé dans le génome mitochondrial. Il fut alors supposé que la protéine orthologue de CcmA soit codée par le génome nucléaire. Une analyse *in silico* fut menée sur les 129 gènes codant les protéines de transporteurs ABC identifiés dans le génome nucléaire d'*Arabidopsis* (Sanchez-Fernandez *et al.*, 2001a). Un gène en particulier, At1g63270, code pour la protéine AtNAP10 (Non-intrinsic ABC Protein), les protéines NAP étant définies par la présence dans leurs séquences protéiques des motifs Walker A et Walker B nécessaires à l'hydrolyse de l'ATP (Walker *et al.*, 1982) et du motif signature des transporteurs ABC. Cette protéine, localisée dans les mitochondries selon les programmes de prédiction, a une séquence similaire au gène *ccmA* des bactéries.

Des expériences d'immunodétections effectuées sur des fractions de membranes mitochondriales ont permis de déterminer plus précisément les caractéristiques biochimiques de ce candidat. Une immunodétection effectuée sur différentes fractions de mitochondries d'*Arabidopsis* et sur la solubilisation des protéines membranaires a permis de déterminer le comportement de protéine intrinsèque de la membrane interne d'AtNAP10 bien que celle-ci n'ai pas de domaines transmembranaires prédits (Fig. 10 A) (Rayapuram, 2003; Rayapuram *et al.*, 2007). Une autre expérience, inspirée par des manipulations réalisées sur l'histidine perméase (Liu et Ames, 1998) a été effectuée sur des fractions solubles et membranaires de mitochondries d'*Arabidopsis*. Ces fractions ont subi des traitements dénaturant à l'urée afin de solubiliser AtNAP10. L'ajout d'ATP/Mg²⁺ et d'urée a permis un meilleur décrochage d'AtNAP10 que l'urée seule (Fig. 10 B). Le domaine NBD des transporteurs ABC est connu pour changer de conformation lors de la lyse de l'ATP. Il est supposé que c'est ce changement de conformation qui affecte son interaction avec les domaines membranaires et donc facilite la solubilisation de la protéine.

Un nouveau type de transporteur ABC

De plus, la partie transmembranaire constituée d'AtCcmB (et peut être d'AtCcmC selon certains modèles chez les bactéries (Feissner *et al.*, 2006a)) et la partie de liaison à l'ATP constitué d'AtCCMA proviennent de deux génomes différents, ce qui représente un cas unique à ce jour pour les transporteurs ABC eucaryotiques. La composition de ce transporteur

est encore sujette à discussion chez les bactéries où deux modèles, l'un de stœchiométrie $CcmA_2B_2$ et l'autre de stœchiométrie $CcmA_2BC$, ont été proposés.

Comme mentionné précédemment, la structure et la fonction de ce transporteur sont encore débattu. Les travaux effectués dans le cadre de cette thèse ont apporté des éléments de réponses.

3.6.2. *CCME, composant principal de la voie de livraison de l'hème*

Excepté pour la petite protéine CcmD, tous les composants de la voie de livraison de l'hème ont des orthologues chez les mitochondries de plantes (Fig. 9).

Le gène codant pour le chaperon d'hème CCME a été identifié dans les génomes nucléaires de plantes. La structure de CCME, comparée à celle du CcmE bactérien, est conservée. Cette protéine présente un domaine hydrophobe et deux motifs hautement conservés dont l'un en particulier (VLAKHDExYxP) contient l'histidine qui, chez les bactéries, lie covalamment l'hème (Schulz et Thony-Meyer, 2000). AtCCME présente également une extension N-terminale d'environ 70 à 80 résidus, absente chez la protéine bactérienne. Seule une partie de cette extension correspond au peptide signal N-terminal clivé au moment de l'import. Le rôle de cette partie N-terminale spécifique des plantes orientée du côté de la matrice est inconnu.

AtCCME est une protéine périphérique de la membrane interne, ce qui suggère qu'elle pourrait interagir avec d'autres protéines. L'étude des domaines conservés et de la topologie de CcmC et de CCME indique que leurs domaines conservés sont orientés du côté de l'espace intermembranaire. Des programmes de prédiction estiment que le motif WWD de CcmC se trouve entre les transmembranes 3 et 4 et que deux histidines conservées ainsi que d'autres résidus important pour l'interaction avec CcmE et la formation de l'holocytocrome *c* ont eux aussi une orientation prédite vers l'espace intermembranaire (Ahuja et Thöny-Meyer, 2003; Ren et Thony-Meyer, 2001; Schulz *et al.*, 2000). Concernant CcmE, des données expérimentales ont confirmé les prédictions en démontrant que le domaine hydrophile comportant le domaine conservé est bien orienté vers l'espace intermembranaire (Spielewoy *et al.*, 2001).

3.6.3. Les protéines CcmF, une fonction potentielle d'hème lyase

Il existe trois protéines CcmF dans les mitochondries d'*Arabidopsis* : AtCcmF_{N1}, F_{N2} et F_C. AtCcmF_{N2}, comme AtCcmC, a un domaine riche en tryptophane WWD. Chez les bactéries, il a été proposé que ce motif serve de plateforme hydrophobe pour la liaison à l'hème (Goldman *et al.*, 1998) mais d'autres études chez les bactéries suggèrent que ce motif est nécessaire pour l'interaction entre CcmC et CcmE (Ren *et al.*, 2002; Schulz *et al.*, 2000). Dans les mitochondries de plantes et dans les bactéries, CcmF est prédit pour être le dernier acteur de la maturation des cytochromes *c*. Il est supposé que les protéines CcmF composent le site de liaison entre l'apocytochrome et l'hème. Cette supposition est rendue d'autant plus probable qu'une interaction entre AtCcmF_{N2} et le cytochrome *c*₁ a été récemment détectée (Rayapuram *et al.*, 2008).

3.6.4. Rôles de CCMH dans les mitochondries de plantes

AtCCMH est l'orthologue chez *Arabidopsis* des protéines CycL retrouvées chez les bactéries. Bien qu'AtCCMH n'ait pas de séquence d'adressage typique dans sa partie N-terminale, cette protéine est localisée exclusivement dans la mitochondrie. Les protéines CCMH de plantes partagent le motif strictement conservé VRCTECG tandis que le motif LRCXXCQ est retrouvé dans presque toutes les protéines CcmH bactériennes. AtCCMH est une protéine membranaire monotypique de type I : sa partie N-terminale comportant le motif conservé RCXXC est orientée du côté de l'espace intermembranaire où l'assemblage du cytochrome *c* a lieu. Quel que soit son rôle, CCMH est une protéine essentielle. Chez *Arabidopsis*, les mutants d'insertion homozygotes *ccmH* arrêtent leur développement durant l'embryogenèse (Meyer *et al.*, 2005).

Existence d'une voie de réduction dans les mitochondries de plantes ?

Alors que les composants de livraison de l'hème semblent conservés chez les mitochondries de plantes, ce n'est pas le cas de la voie de thioréduction du système I. CcmH est le seul membre de cette voie identifié chez les plantes (Fig. 8). En effet, aucune protéine homologue de CcmG ou DsbD n'a pu être identifiée. De plus, contrairement au périplasma, l'espace intermembranaire des mitochondries est un milieu réducteur où les cystéines des apocytochromes devraient être préservées de l'oxydation après leur importation dans la

mitochondrie. En l'absence de protéines oxydantes, on peut se poser la question sur la nécessité d'une voie de réduction chez les mitochondries de plantes. Il est possible que CCMH soit impliqué dans la réduction des cystéines de l'apocytochrome (en collaboration avec d'autres partenaires non identifiés) ou dans son importation (Meyer *et al.*, 2005). L'identification de ces partenaires potentiels a été initiée au cours de cette thèse.

AtCCMH, un composant potentiel de l'hème lyase avec les protéines AtCcmF

La fonction de CCMH a été étudiée par des expériences de complémentation chez les bactéries. AtCCMH exprimée dans *E. coli* ne peut compléter la protéine EcCcmH pour la formation de l'holocytochrome *c*, malgré le fait qu'AtCCMH soit exprimée dans le périplasme. Toutefois, AtCCMH co-immunoprécipite avec la protéine CcmF bactérienne. Des gels de type bleu native PAGE de membranes mitochondriales révèlent une co-localisation d'AtCCMH et d'AtCcmF_{N2} dans un complexe de 500 kDa. Des tests d'interaction double hybride effectués au cours de cette thèse ont également confirmé cette interaction (Rayapuram *et al.*, 2008). Ces résultats soutiennent l'hypothèse d'un complexe hème lyase composé d'AtCCMH et d'au moins une protéine AtCcmF dans les mitochondries d'*Arabidopsis*.

AtCCMH, un composant potentiel pour l'import de l'apocytochrome c

L'interaction détectée entre AtCCMH et l'apocytochrome *c* (Meyer *et al.*, 2005) pourrait avoir un rôle dans l'import de l'apocytochrome *c*. Dans les mitochondries de plantes, la longue préséquence caractéristique d'un ciblage dans l'IMS est trouvée dans la séquence protéique du cytochrome *c*₁ (Braun *et al.*, 1992), mais est absente de la séquence des cytochromes *c*.

Dans le système III, les étapes de l'import et de la maturation de l'holocytochrome *c* sont fortement liés. Dans les mitochondries de plantes, on ignore s'il existe des protéines reprenant les fonctions de la protéine CCHL des mitochondries de levures, mais AtCCMH est potentiellement un bon candidat.

4. Les transporteurs ABC

Les transporteurs ABC (pour ATP Binding Cassette) couplent l'hydrolyse de l'ATP avec le transport d'une grande variété de substrats à travers les membranes biologiques. Ces transporteurs correspondent à une des plus vastes familles de protéines, ils sont ubiquitaires et retrouvés chez toutes les espèces, des bactéries à l'homme, en nombre variable suivant les organismes. Environ 5% du génome d'*E. coli* code pour des transporteurs ABC (Linton et Higgins, 1998), 29 composants de transporteurs ABC ont été identifiés chez la levure (Decottignies et Goffeau, 1997) et 48 chez l'homme (Dean *et al.*, 2001).

Chez *Arabidopsis*, 129 cadres de lectures codent pour ce type de transporteur (Sanchez-Fernandez *et al.*, 2001a). Les plantes comportent généralement un nombre important de protéines ABC, reflétant peut-être ainsi l'effet de leur grand nombre de métabolites secondaires. Certaines mutations de transporteurs ABC sont connus pour être la cause de maladies humaines comme la mucoviscidose, l'hyperinsulémie et la dystrophie maculaire de Stargardt (Gottesman et Ambudkar, 2001; Grimberg *et al.*, 2001; Stefkova *et al.*, 2004; Sun et Nathans, 2001).

4.1. Fonctions

De façon générale, chaque transporteur ABC est spécifique de son propre substrat ou du groupe chimique de ces substrats. Il est intéressant de noter qu'il existe un type de transporteur ABC pour chaque classe de molécule : petite, grande, chargée, hydrophobe, ionique, protéique etc... Ainsi, bien que les transporteurs ABC soient hautement spécifiques vis-à-vis de leur substrat, certains sont connus pour être multispécifiques comme le transporteur d'oligopeptide OppA (Tame *et al.*, 1994), tandis que d'autres, comme la protéine LmrA, ont une spécificité très large de substrats hydrophobes (van Veen *et al.*, 1998).

La diversité des spécificités de substrat est reflétée par la diversité des rôles physiologiques joués par les transporteurs ABC au sein de la cellule. Beaucoup d'entre eux ont un rôle dans l'élimination des déchets et des toxines cellulaires, tandis que d'autres confèrent chez les champignons une résistance à certains agents anti-fongiques (Wolfger *et al.*, 2001). D'autres transporteurs ABC sont essentiels dans l'export de composants cellulaires

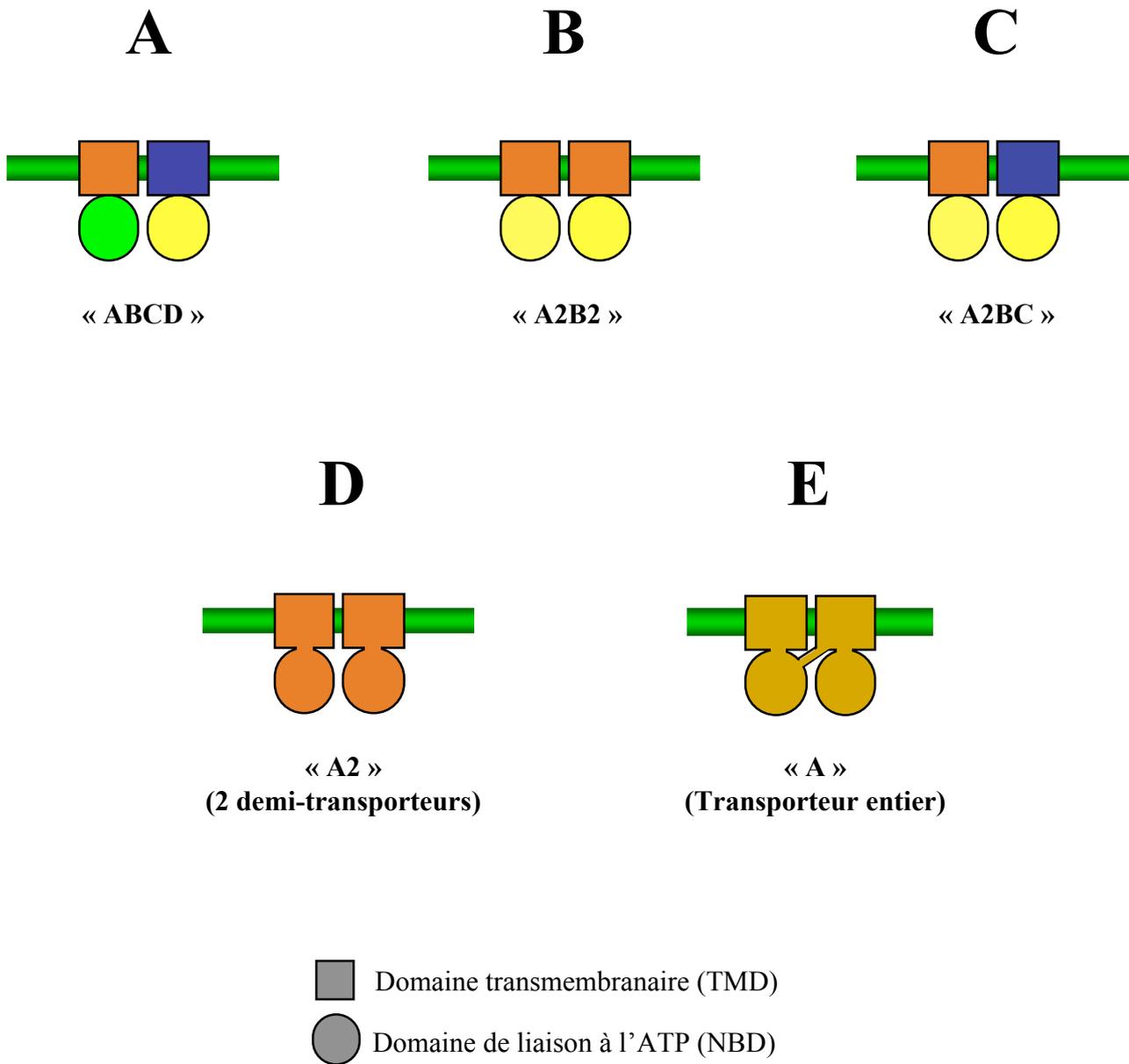


Figure 11 : Différentes organisations possibles de transporteurs ABC.

La plupart des transporteurs ABC de procaryotes sont codés par 4 protéines séparées (*A*, *B* et *C*) et peuvent être des importeurs ou des exporteurs.

Les transporteurs ABC eucaryotiques peuvent avoir toutes les organisations représentées (*A*, *B*, *C*, *D* et *E*) mais se limitent à une fonction d'exporteur.

L'organisation attendue pour le transporteur ABC des *ccm* correspondrait à *B* ou *C*.

qui fonctionnent en dehors de la membrane plasmique, par exemple pour l'export de polysaccharides de la paroi cellulaire (Silver *et al.*, 2001) ou le transporteur ABC HasDE pour l'export de l'hémophore HasA (Letoffe *et al.*, 1994).

De plus, certains de ces transporteurs semblent avoir une diversité de fonction. La protéine dont la défaillance cause la mucoviscidose chez l'homme a une structure typique d'un transporteur ABC mais est en réalité un canal à chlore (Higgins, 1995). De même, certains transporteurs ont plus une fonction dans la régulation que dans le transport. Le meilleur exemple est le système Sap/trk de *S. typhimurium* qui régule un canal potassium indépendamment de toute activité de transport (Parra-Lopez *et al.*, 1994).

4.2. Structures

Un transporteur ABC typique est composé de quatre sous-unités ou domaines : deux domaines, dit de liaison à l'ATP (NBD pour Nucleotide Binding Domain) sont exposés au cytoplasme (chez les bactéries) ou à la matrice (dans les mitochondries) (Fig. 11). Les deux autres domaines, dit transmembranaires (TMD pour TransMembrane Domain), hydrophobes et ayant de multiples domaines transmembranaires (généralement 6 par sous-unités (Higgins, 1992)) en conformation d'hélices alpha. Pour beaucoup de systèmes d'import et d'export, tout particulièrement chez les bactéries, les domaines transmembranaires et de liaison à l'ATP sont composés d'au moins deux polypeptides, ces derniers étant souvent codé par un seul opéron (Higgins, 1992).

Des études cristallographiques effectuées sur quatre transporteurs ABC de type « transporteur entier » (cas présenté Fig. 11 E) ont apporté des informations précieuses sur la structure générale de ces transporteurs. Trois de ces transporteurs sont des importeurs (le transporteur BtuCD d'*E. coli* (Locher *et al.*, 2002), HI1470/1 de *H. influenzae* (Pinkett *et al.*, 2007) et ModBC d'*A. fulgidus* (Hollenstein *et al.*, 2007b)) et un seul est un exporteur (Sav1866 de *S. aureus* (Dawson et Locher, 2007)).

4.2.1. Les domaines de liaison à l'ATP (NBD)

Le NBD constitue le « moteur » du transporteur en fournissant l'énergie issue de l'hydrolyse de l'ATP pour le transport des substrats à travers la membrane. Ce domaine est

défini par la présence de différents motifs conservés, comme les motifs caractéristiques Walker A (GxxGxGKxT) et Walker B (xWxLDE), essentiels à l'hydrolyse de l'ATP (Schneider et Hunke, 1998; Walker *et al.*, 1982). Il comporte aussi un autre motif, propre aux transporteurs ABC, appelé motif signature des transporteurs ABC (LSGGQ) (Bairoch, 1992) qui entre en contact avec le nucléotide lors du lien avec l'ATP. Ou encore la boucle Q (Q-loop), impliquée dans l'interaction avec les TMD (Hollenstein *et al.*, 2007a).

4.2.2. Les domaines transmembranaires (TMD)

Contrairement aux NBD, les TMD varient considérablement au niveau de leur séquence primaire, de leur longueur et de leur architecture. Pour certains transporteurs ABC, essentiellement eucaryotiques, le domaine transmembranaire ou perméase est fusionné avec le domaine de liaison à l'ATP, produisant une unité TMD-NBD qui s'assemble sous forme dimère (cas des « demi-transporteurs » Fig. 11 D) (Davidson et Chen, 2004; Higgins, 2001). Le TMD est déterminant pour la spécificité du substrat par son site de liaison au substrat.

4.2.3. La coopération entre les TMD et NBD

La liaison et l'hydrolyse de l'ATP causent des changements de conformation au niveau des NBD qui sont transmis aux TMD par des interactions non covalentes (Hollenstein *et al.*, 2007a). Dans les quatre transporteurs ABC étudiés par cristallographie, les NBD transmettent leur changement de conformation par les acides aminés voisins de leurs Q-loop. Curieusement, les TMD de ces transporteurs, malgré leurs grandes différences topologiques, possèdent tous des hélices alpha similaires permettant un ensemble de contacts avec les NBD. Des mutations touchant cette interface entre les NBD et les TMD peuvent affecter drastiquement les fonctions du transporteur. C'est le cas par exemple de la délétion de phénylalanine 508 de la protéine CFTR humaine, localisée dans le NBD, qui est responsable de 70% des cas de mucoviscidose. Cette mutation cause une incapacité de la protéine mutée à se replier correctement, et seul 1% des protéines générées atteignent la membrane plasmique (Tsui, 1992).

Des tests d'interaction entre NBD et TMD par double hybride dans la levure ont déjà été tentés avec succès, par exemple sur le transporteur ABC de levure Pdr5p (Subba Rao *et*

al., 2002). Un test d'interaction semblable a été réalisé au cours de cette thèse entre différentes protéines ccm supposées être impliquées dans un transporteur ABC dans les mitochondries d'*Arabidopsis* (Rayapuram *et al.*, 2007).

4.3.Import et export

Les transporteurs ABC sont généralement classés en tant qu'importeur ou exporteur. Les importeurs, présents uniquement chez les procaryotes, requièrent une liaison avec une protéine de liaison périplasmique (PBP pour Periplasmic Binding Protein) qui délivre le substrat capturé au coté externe du transporteur. Par contre, les exporteurs reconnaissent leur substrat directement depuis le cytoplasme ou depuis la bicouche lipidique.

La première cristallisation d'un transporteur ABC a été effectuée sur l'importeur de la vitamine B₁₂, BtuCD chez *E. coli* (Locher, 2004). Cette protéine interagit avec BtuF, la protéine périplasmique de liaison pour la vitamine B₁₂. Les protéines de liaison soluble de haute affinité sont localisées dans le périplasma des bactéries Gram négative (Boos et Shuman, 1998) ou liées à la surface de la cellule en tant que lipoprotéine chez les bactéries Gram positives. Contrairement aux systèmes d'export où la spécificité de substrat est déterminée par les domaines transmembranaires, les protéines périplasmiques de liaison des systèmes d'import déterminent la spécificité de leurs substrats.

4.4.Mécanisme de transport

Les mécanismes détaillés par lesquels les transporteurs ABC transportent leurs substrats à travers la membrane ne sont pas encore clairement compris. Pour les exporteurs, le cycle de transport est initié par l'interaction du substrat avec le TMD. Pour les importeurs, le substrat peut être considéré comme un substrat du PBP. Le substrat est ensuite libéré du PBP pour interagir avec le TMD.

La liaison d'un substrat induit un changement de conformation dans le TMD qui est ensuite transmis au NBD pour initier l'hydrolyse de l'ATP. Les deux NBD sont requis et tous deux doivent hydrolyser l'ATP en un mécanisme où la molécule d'ATP est prise en « sandwich » entre les deux NBD (Locher *et al.*, 2002; Loo *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2002). L'hydrolyse de l'ATP induit d'autres changements de conformation qui sont transmis au

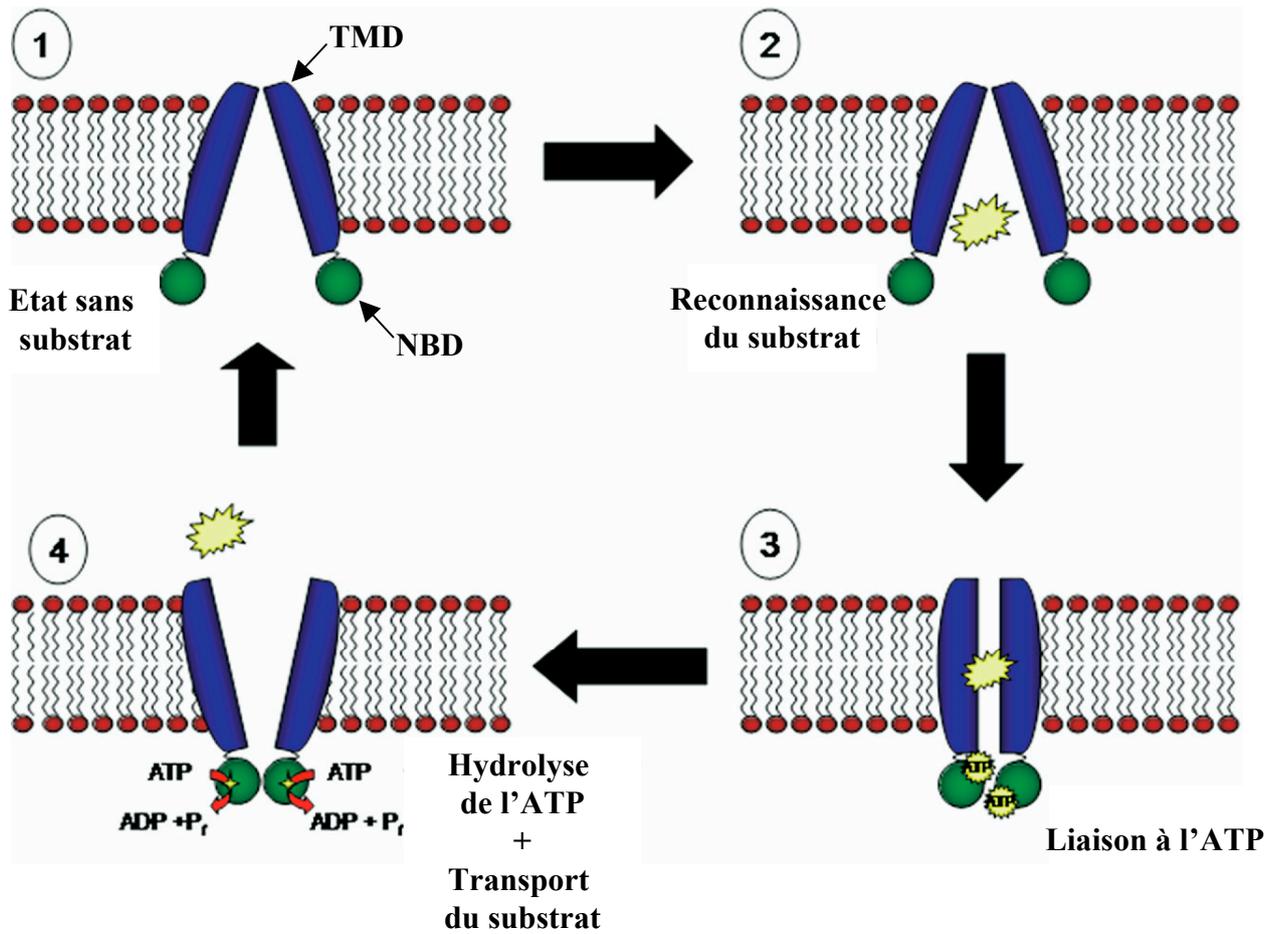


Figure 12 : Mécanisme possible d'un transporteur ABC :

1 : Le transporteur n'ayant pas reconnu son substrat

2 : Reconnaissance du substrat par le TMD

3 : Liaison à l'ATP ce qui enclenche l'homodimérisation du transporteur et l'entrée du substrat dans le canal transmembranaire

4 : Hydrolyse de l'ATP et transport du substrat à travers la membrane.

(Burke et Ardehali, 2007 ; Locher *et al*, 2004)

TMD qui ouvre un canal permettant le passage du substrat à travers la membrane (Hunke *et al.*, 2000) (Fig. 12).

L'étude cristallographique de l'exporteur Sav1866 et de l'importeur ModBC-A ont permis de proposer des éléments communs du mécanisme de transport de l'ensemble des transporteurs ABC. L'élément clé pour un transport efficace et unidirectionnel semble être le rapprochement de 10 à 15 Å, causé par la liaison à l'ATP, des deux NBD. Le rapprochement des hélices de couplage semble déclencher un changement de conformation des TMD, celles-ci passant d'une conformation « face à face » à une conformation « dos à dos ». Les transporteurs ABC de type importeur peuvent alors accepter des substrats de leur protéine de liaison correspondante tandis que les transporteurs ABC de type exporteur peuvent se lier à leur substrat. Au moment du relargage de l'ADP et du phosphate inorganique, le transporteur revient à sa conformation d'origine. Les importeurs relarguent leur substrat dans le cytoplasme alors que les exporteurs recrutent de nouveaux substrats au niveau de site de liaison (Hollenstein *et al.*, 2007a).

4.5. Les transporteurs ABC de plantes

4.5.1. Inventaire des transporteurs ABC de plantes

Les plantes sont connues pour posséder un grand nombre de protéines faisant parties de transporteurs ABC, ces derniers étant spécifiques de multiples substrats métaboliques et servant souvent à établir des gradients de concentration de divers solutés de part et d'autre des membranes biologiques. La nature sessile des plantes et leurs capacités photosynthétiques nécessitent des fonctions étendues de détoxification et de transport (Sanchez-Fernandez *et al.*, 2001a; Sanchez-Fernandez *et al.*, 2001b).

Il a été établi que les protéines composant les transporteurs ABC de plantes sont non seulement impliquées dans le transport des hormones, lipides, métaux, métabolites secondaires et xenobiotiques, mais contribuent également aux interactions plantes-pathogènes et à la modulation des canaux ioniques (Martinoia *et al.*, 2002; Rea, 2007). Ces protéines ont été inventoriés chez *Arabidopsis* et le riz sur la base d'une analyse gène par gène rendue possible par l'étude de leurs génomes respectifs (Garcia *et al.*, 2004; Jasinski *et al.*, 2003). Il

est à noter que l'identification d'un même gène par différents groupes de recherche et le manque d'appellations communes au sein de la littérature scientifique ont conduit à différentes nomenclatures (Bouige *et al.*, 2002; Dassa et Bouige, 2001; Saier, 2000; Sanchez-Fernandez *et al.*, 2001a; Verrier *et al.*, 2008).

4.5.2. Les transporteurs ABC chloroplastiques et mitochondriaux

Connaissant l'origine procaryotique des chloroplastes et des mitochondries, il est logique de supposer que ces organelles disposent elles aussi de protéines formant des transporteurs ABC. Cependant, des études de mutants n'ont permis d'identifier que peu de transporteurs ABC en comparaison avec, par exemple, les 79 transporteurs de ce type retrouvés chez la bactérie *E. coli* (Linton et Higgins, 1998).

Les transporteurs ABC chez les chloroplastes

Le gène *LAF6* (Long After Far Red) d'*Arabidopsis* code pour la protéine AtABC1, la partie NBD d'un transporteur ABC. Le mutant *laf6* présente une déficience lors d'une exposition sous une lumière particulière en accumulant de la protoporphyrine IX, un précurseur de la chlorophylle et de l'hème. AtABC1 a une séquence d'adressage chloroplastique dans sa partie N-terminale. Il est supposé qu'AtABC1 ainsi que sa partie TMD aient un rôle dans le transport de la protoporphyrine IX de l'enveloppe, son lieu de synthèse, vers le stroma du chloroplaste. La mutation du gène *LAF6* causerait l'expression d'une protéine ne pouvant interagir correctement avec sa partie TMD, causant ainsi une défaillance globale du transporteur et menant à l'accumulation de son substrat (Moller *et al.*, 2001).

Un autre exemple de protéine ABC chloroplastique est la protéine AtNAP1, homologue de la protéine SufB retrouvée chez *E. coli*. Une récente étude suggère qu'AtNAP1 agit en dimère, peut interagir avec l'ATPase AtNAP7 et est impliquée dans l'assemblage des clusters fer-soufre (Xu *et al.*, 2005).

Les transporteurs ABC dans la mitochondrie

Les protéines de transporteurs ABC les plus connues dans les mitochondries de plantes sont les protéines de type « demi-transporteurs » AtATM1, 2 et 3 (anciennement Sta1, 2 et 3) et sont les homologues de la protéine de levure ScATM1 impliquée dans l'export des clusters

fer-soufre synthétisés dans la mitochondrie (Kispal *et al.*, 1997). Chez *Arabidopsis*, une mutation du gène *AtATM1* cause un phénotype nain de la plante (Kushnir *et al.*, 2001).

Des trois protéines AtATM, la protéine AtATM3 est celle ayant la plus grande similarité fonctionnelle avec ScATM1. AtATM3 est également capable de compléter avec une meilleure efficacité qu'AtATM1 et 2 les mutants de levure $\Delta ScATM1$. Des expériences utilisant la fusion des trois protéines AtATM à la GFP ont confirmé leur localisation mitochondriale (Chen *et al.*, 2007).

Un nouveau type de transporteur ABC mitochondrial, étudié au cours de cette thèse, est constitué des protéines AtCCMA, codée dans le noyau, AtCcmB et peut-être AtCcmC, codées dans la mitochondrie. Il s'agit du seul exemple connu de transporteur ABC dont les parties NBD et TMD sont codées par deux génomes différents.

Présentation du travail de thèse

Au cours de ma thèse, je me suis intéressé aux protéines composant le système I de maturation des cytochromes de type *c* dans les mitochondries d'*Arabidopsis*. En étudiant les interactions entre ces protéines, j'ai pu obtenir des résultats apportant de nouvelles données concernant la stoechiométrie et les fonctions potentielles de ces protéines.

Chapitre I :

Le système I de maturation des cytochromes de type *c* comprend un transporteur ABC. Chez les bactéries, ce transporteur est composé de CcmA, CcmB et peut-être CcmC selon certains modèles. Chez *Arabidopsis*, seuls AtCcmB et AtCcmC ont été retrouvés dans le génome mitochondrial. D'autres travaux ont caractérisé la protéine AtNAP10, codée par le génome nucléaire, comme l'orthologue potentiel de CcmA. Pour le confirmer, nous avons utilisé différents tests d'interaction double hybride dans la levure afin de confirmer qu'AtNAP10 interagit bien avec AtCcmB et/ou AtCcmC.

D'autres études utilisant des plantes *Arabidopsis* portant une mutation d'insertion dans le gène *AtCCMA* ont apportés des réponses concernant l'effet de cette mutation et le caractère essentiel de ce gène.

Chapitre II :

Les protéines AtCcmC et AtCCME ont un rôle supposé dans la livraison de l'hème. Des expériences de co-immunoprécipitation effectuées chez *E. coli* ont démontré qu'il existe une interaction entre les protéines EcCcmC et EcCcmE. Nous avons voulu vérifier par des tests d'interaction double hybride si une telle interaction se retrouvait également entre les protéines orthologues correspondantes des mitochondries d'*Arabidopsis*.

Chapitre III :

AtCcmFN1, AtCcmFN2 et AtCcmFc ont un rôle supposé dans l'assemblage de l'hème. Des expériences de co-immunoprécipitations effectuées chez *E. coli* ont démontré une interaction entre les protéines EcCcmF et EcCcmH. Afin de déterminer si une telle interaction se retrouvait entre les protéines AtCcmFN1, AtCcmFN2 et AtCcmFc d'une part et AtCCMH

d'autre part et si oui par quel domaine, nous avons procédé à un nouveau test d'interaction double hybride dans la levure.

Chapitre IV :

Chez les bactéries, trois protéines (CcmG, DsbD et ccmH) forment une voie de réduction. Dans les mitochondries de plantes, seul l'orthologue de CcmH a été trouvé. En effectuant un criblage d'une banque d'ADNc double hybride avec la protéine AtCCMH comme appât, nous avons recherché des candidats potentiels pour l'interaction avec cette protéine.

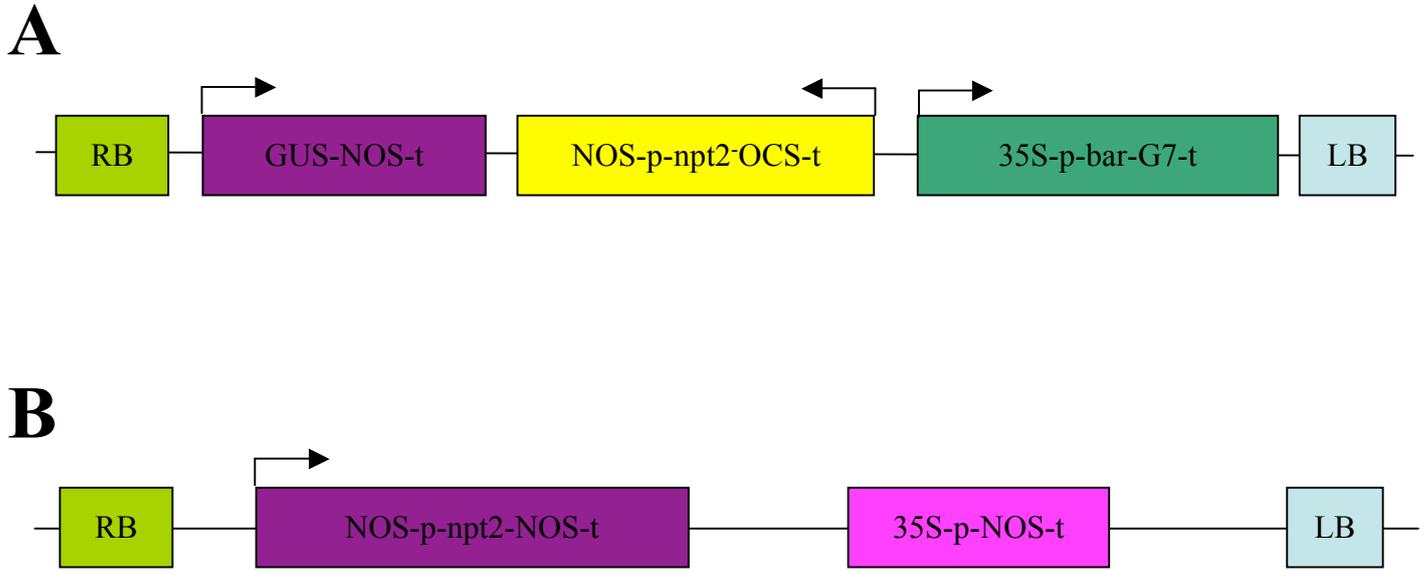


Figure 13 : Représentation des deux ADN-T utilisés dans l'étude des mutants d'insertion dans AtCCMA. Le gène *npt2* confère une résistance à la kanamycine. Le gène *bar* confère une résistance à l'herbicide basta.

A, ADN-T du vecteur pGKB5 utilisé pour la création de la banque de mutant d'insertion par l'INRA de Versailles.

B, ADN-T du vecteur pROK 2-, utilisé pour la création de la banque de mutant d'insertion par le Salk Institute.

Matériels et méthodes

1. Matériels et outils informatiques

1.1. Matériel végétal

Les plants d'*Arabidopsis thaliana* écotype *Wassilievsjkja* et *Columbia-0* sont cultivés en serres à 25°C avec une photopériode de 16 h de jour et 8 h de nuit.

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

Des cellules d'*Arabidopsis thaliana* sont cultivées dans du milieu Gamborg's B5 (Duchefa G0210) contenant 20 g/L de saccharose et 1 mg/L de 2,4 D à PH 5,7. Les cultures sont placées sur un agitateur rotatif (125 rpm, 25°C). 10 mL de cellules sont repiquées stérilement dans 90 mL de milieu frais toutes les semaines. Des cultures âgées de 5 jours sont utilisées pour les expérimentations.

Différentes lignées de plantes mutées ont été obtenues de :

- l'INRA de Versailles (Lignée DRC29 et EGU279) par l'insertion d'un ADN-T du vecteur pGKB5 (Fig. 13 A)
- l'institut SALK de San Diego (SALK_120966, 010633 et 010921) par l'insertion de l'ADN-T du vecteur pROK 2- (Fig. 13 B)

1.2. Souches de bactéries et de levures

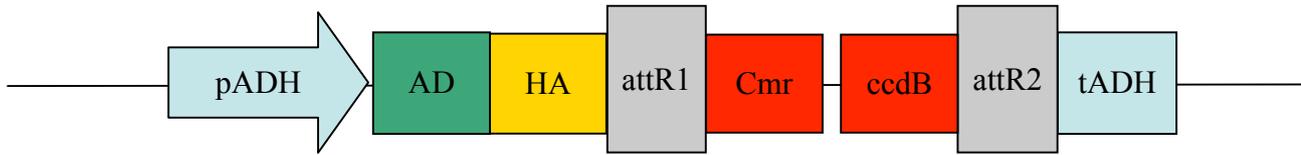
Trois souches d'*Escherichia coli* ont été utilisées :

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

pGADT7

Modifié avec cassette Gateway

LEU2, 2 μ , Amp^R



pGBKT7

Modifié avec cassette Gateway

TRP1, 2 μ , Kan^R

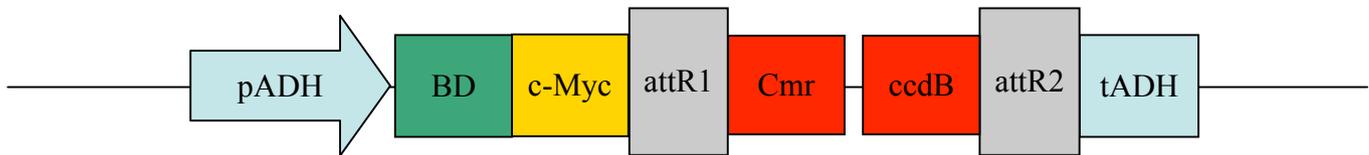


Figure 14 : Cassettes d'expression des vecteurs utilisés pour le double hybride classique. Sur les deux vecteurs se trouve la cassette gateway attB1-Cmr-ccdB-attB2 nécessaire à la recombinaison homologue pendant laquelle le « death domain » *ccdB* et le gène de résistance au chloramphénicol *Cmr* seront remplacés par la séquence codant pour la protéine dont on souhaite tester l'interaction. Cette séquence est fusionnée avec une « étiquette » (l'épitope HA ou c-Myc) et le domaine d'activation (AD) ou de liaison (BD) à l'ADN. En dehors de la cassette, les deux vecteurs ont aussi un gène *Amp^R* ou *Kan^R* conférant une résistance respectivement à l'ampicilline ou à la kanamycine. Chacun des vecteurs porte un gène de sélection codant pour un acide aminé particulier (*LEU2* codant pour la leucine et *TRP1* codant pour le tryptophane). 2 μ correspond à une origine de répllication de haut nombre de copie chez la levure.

DH5 α : *endA1 hsdR17* (r_k-m_k⁺) *supE44 thi-1 recA1gyrA* (Nal^r) *relA1* Δ (*lacZYA-argF*)*U169* (\emptyset 80d*lac* Δ (*lacZ*)*M15*)

DB3.1: F⁻ *gyrA462 endA1* Δ (*sr1-recA*) *mcrB mrr hsdS20* (rB⁻, mB⁻) *supE44 ara-14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20*(Sm^R) *xyl-5 λ -leu mtl-1*

Trois souches de *Saccharomyces cerevisiae* ont été utilisées :

pJ69 4A : *MATa trp1-901 leu2-3, 112 ura3-52 his3-200 gal4 Δ gal80 Δ GAL2-ADE2 LYS2 ::GAL1-HIS3 met2 ::GAL7-lacZ*

AP4 : *MATa ura3 leu2 lexA::lacZ::trp1 lexA::HIS3 lexA::ADE2*

AP5 : *MAT α URA3 leu2 trp1 his3 loxP::ade2*

Une souche d'*Agrobacterium tumefaciens* a été utilisée :

GV3101 (pM90) : *rpoH+ hrcA+ Rif^R*

Cette souche comporte un gène de résistance à la rifampicine dans son génome. Elle contient également un plasmide Ti dépourvu de gènes oncogènes (ONC) et d'ADN-T mais comportant des gènes de virulence (VIR). Ceci afin de permettre le transfert en *trans* de la séquence ADN introduite entre les séquences de bordures artificielles d'un second vecteur de type pBIN (vecteur binaire).

1.3. Vecteurs de clonage

pDONR207

Le vecteur pDONR207 est un vecteur d'entrée de type Gateway (Invitrogen). Il contient un gène de résistance à la gentamycine et des sites d'attachement du phage λ , nommés attP, utilisés pour introduire par recombinaison homologue un insert comprenant à chaque extrémité des sites d'attachement bactériens nommés attB. Entre les sites d'attachement attP se trouve un gène de résistance au chloramphénicol (CAT) et un gène codant un poison de la gyrase d'*E. coli*.

pGBKT7 et pGADT7 modifiés pour le système Gateway

Les vecteurs pGBKT7 et pGADT7 sont utilisés dans des expériences de double hybride dans la levure (Fig. 14).

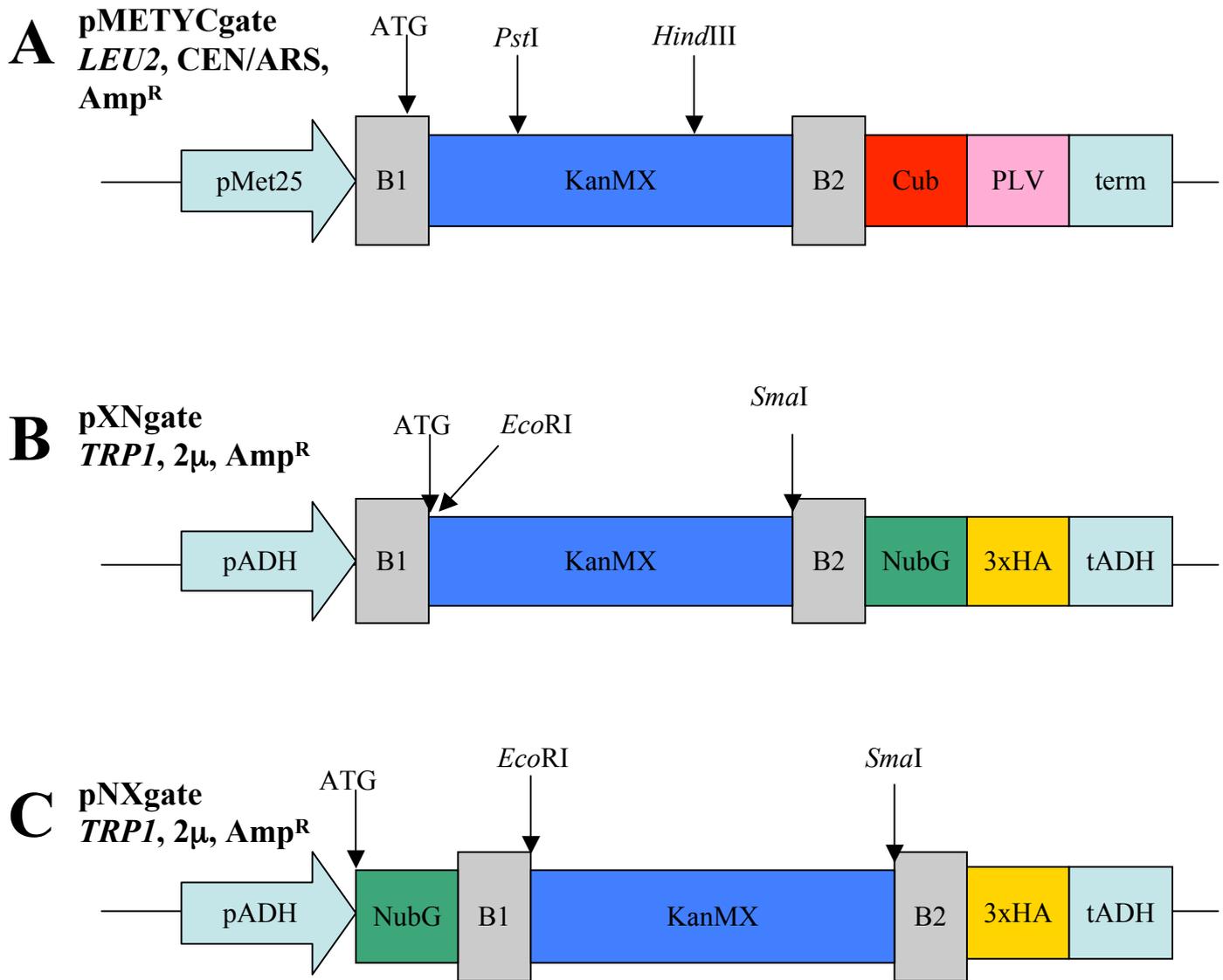


Figure 15 : Cassettes d'expression des vecteurs split-ubiquitin. Sur les trois vecteurs se trouve la même cassette B1-KanMX-B2 qui confère une résistance à l'antibiotique G418. En dehors de la cassette, les trois vecteurs ont aussi un gène *Amp^R* conférant une résistance à l'ampicilline. Les séquences B1 et B2 sont utilisées pour la recombinaison *in vivo*, où *KanMX* est remplacé par la séquence codant pour la protéine dont on souhaite tester l'interaction. Les sites de restriction utilisés pour produire un vecteur linéaire sont indiqués, ainsi que l'ATG initiateur et le codon STOP bornant la cassette d'expression. Le plasmide pMETYCgate (A) est un vecteur « low-copy » au contraire des plasmides pXNgate et pNXgate (B et C) qui sont « multi-copy ». L'insertion d'un « tag » HA permet l'immunodétection de la protéine de fusion exprimée par l'utilisation d'anticorps anti-HA. Chacun des vecteurs porte un gène de sélection codant pour un acide aminé particulier (*LEU2* codant pour la leucine et *TRP1* codant pour le tryptophane). 2 μ et CEN/ARS correspondent à des origines de réplication chez la levure respectivement de haut et faible nombre de copies.

- pGBKT7 contient un gène de résistance à la kanamycine, le gène *trp1* codant pour une protéine impliquée dans le métabolisme du tryptophane et une séquence codant pour le domaine de liaison à l'ADN (BD) du facteur de transcription Gal4.
- pGADT7 contient un gène de résistance à l'ampicilline, le gène *leu2* codant pour une protéine impliquée dans le métabolisme de la leucine et une séquence codant pour le domaine d'activation (AD) du facteur de transcription Gal4.

Ces deux vecteurs ont été modifiés par l'insertion de la cassette de recombinaison Gateway dans le site *SmaI* (Dieterle *et al.*, 2005).

QuiaXpress (pQE)

Les plasmides de la série pQE sont des vecteurs d'expression dérivés du pDS56/RBSII et du pDS781/RBSII-DHFRS. Ce plasmide contient :

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

Vecteurs utilisés pour le double hybride « split-ubiquitin » : pMetYCgate, pNXgate, pXNgate

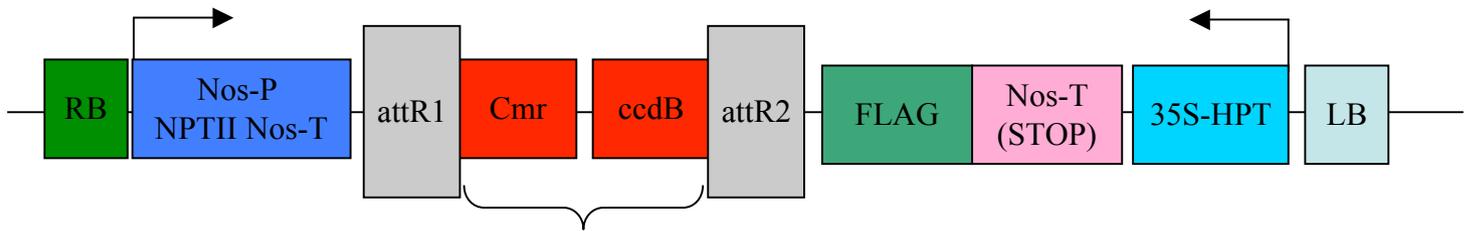
Le vecteur pMetYCgate (Fig. 15 A) est dérivé du plasmide YCpHXT7-hsGLUT4-CubPLV (Wieczorke *et al.*, 2003) par l'utilisation d'une stratégie de clonage *in vivo*. La cassette B1-KanMX-B2 est bordée par des régions complémentaires à l'extrémité 3' du promoteur HXT7 et à l'extrémité 5' de la séquence *Cub* respectivement.

Les vecteurs pNXgate et pXNgate (Fig. 15 B et C) sont basés sur les plasmides pNubG-X et pX-NubG respectivement (Stagljar *et al.*, 1998) auxquels ont été ajoutés la cassette KanMX bordée des séquences linker B1 et B2.

Vecteurs utilisés pour la transformation de plantes Arabidopsis : pGWB10 et pMDC99

Le vecteur pGWB10 (Gateway Binary vector) comporte des gènes conférant une résistance à la kanamycine et à l'hygromycine aux plantes transformées. Comme pour le vecteur pDONR207, ce vecteur comporte le gène *ccdB* ("Control of Cell Death") borné des

A pGWB10



B pMDC99

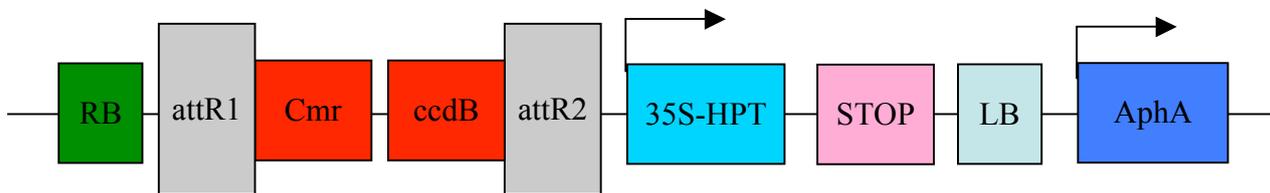


Figure 16 : Les vecteurs et constructions utilisés pour la complémentation des plantes mutantes d'insertion dans *AtCCMA*.

A, Le vecteur pGWB10, dérivé du vecteur pBI101, dispose d'une cassette de clonage Gateway contenant le gène de résistance au chloramphénicol *Cmr* et le "death domain" *ccdB*, le gène *NPTII* conférant une résistance à la kanamycine, le gène *HPT* conférant une résistance à l'hygromycine et une étiquette FLAG.

B, Le vecteur pMDC99, dérivé du vecteur pCambia, dispose de la même cassette de clonage Gateway que pGWB10, du gène *AphA* (aminoglycoside 3'-phosphotransférase) conférant une résistance à la kanamycine et du gène *HPT* conférant une résistance à l'hygromycine.

séquences de recombinaison attR1 et attR2. La cassette de clonage est suivi d'une étiquette de type FLAG (Fig. 16 A).

pMDC99 est un autre vecteur binaire conférant lui aussi une résistance à la kanamycine et à l'hygromycine aux plantes transformées. Il dispose également d'une cassette de clonage Gateway (gène *ccdB* borné des séquences de recombinaison attB1 et attB2), mais ne fusionne pas l'insert à une étiquette (Fig 16 B).

1.4. Banque d'ADNc

La banque d'ADNc utilisé dans le cadre du criblage de protéines provient de DUALsystems Biotech. Cette banque d'ADNc a été réalisée à partir d'une extraction d'ARN total effectuée sur une mixture de plantules étiolées âgées de 6 jours. Les ADNc issus de la reverse-transcription par oligo dT et par amorces hexamériques aléatoires ont été insérés de façon directionnelle dans des vecteurs pDSL-Nx. Cette banque a une complexité de $1,7 \times 10^7$ clones indépendants ayant une taille allant de 1,2 à 2,5 kb pour une taille moyenne de 1,7 kb.

1.5. Oligonucléotides

Les oligonucléotides synthétiques ont été fournis par Eurogentec, Sigma-Aldrich, GibcoBRL et Invitrogen. Les séquences de tous les oligonucléotides utilisés lors de ces travaux sont données en annexes.

1.6. Outils informatiques

Les comparaisons, alignements de séquences d'acides nucléiques et protéiques et calculs des températures d'hybridation des amorces PCR ont été réalisés à l'aide du logiciel MacVector 9.0.2 (MacVector Inc.).

Les principaux sites utilisés sont :

Recherches bibliographiques :

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=pubmed>

Comparaison de séquences nucléotidiques et peptidiques :

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

Le logiciel de recherche de FST :

FlagDB++ v3.9 (<http://urgv.evry.inra.fr/projects/FLAGdb++/HTML/guide.shtml>)

Les logiciels de prédiction de domaines transmembranaires :

TOPPRED 2 (<http://www.sbc.su.se/~erikw/toppred2/>)

DAS (<http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS/>)

Le logiciel de représentation 2D des protéines membranaires :

TMRpres2D (<http://bioinformatics.biol.uoa.gr/TMRPres2D/>)

Les logiciels de prédictions d'adressage aux organelles :

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

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

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

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

2. Méthodes

Les méthodes classiques de la biologie moléculaire ont été réalisées selon les protocoles décrits par Sambrook et Russel (Sambrook et Russell, 2001).

2.1.Méthodes de biologie moléculaire

2.1.1. Transcription inverse: obtention d'ADNc total

La transcription inverse se base sur l'utilisation d'une ADN polymérase ARN dépendante afin d'obtenir de l'ADN complémentaire (ADNc) à partir d'une matrice d'ARN. 2 µg d'ARN total extraits de cellules d'*Arabidopsis thaliana* sont dénaturés par chauffage à 65°C pendant 5 min en présence de 100 pmol d'amorces hexamériques aléatoires. L'ensemble

est mis sur la glace et l'on y ajoute les composants suivants : 10 μL de **tampon de RT 5x**, 20 mM de DTT, 10 mM de chaque dNTP et 10 U SuperscriptII reverse transcriptase (Invitrogen) qsp 50 μL avec de l'eau. La réaction est ensuite incubée à 42°C pendant 2 h.

Tampon de RT 5x : 250 mM Tris-HCl pH 8,3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl_2 , 50 mM DTT

2.1.2. Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR)

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

- 5 pmol de chaque amorce
- 1,25 μM MgCl_2
- 5 μL de **tampon PCR 10x** (Invitrogen)
- 100 μM de dNTPs
- 1 U de Taq polymérase (n'ayant pas d'activité 5'-3'exonucléase)
- 1-100 ng de la matrice (ADN plasmidique, fragment d'ADN) à amplifier.

La température d'hybridation choisie est calculée grâce au logiciel Macvector 9.0.2 (MacVector Inc.).

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

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

2.1.3. Électrophorèse sur gel d'agarose

Cette technique permet de séparer des molécules d'ADN selon leur taille. Du **tampon de charge A** est additionné à la solution d'ADN, qui est ensuite chargée sur un gel d'agarose (0,7 à 3%, selon la taille des fragments à analyser) dans lequel a été incorporé du bromure d'éthidium 0,5 $\mu\text{g/mL}$. L'électrophorèse est effectuée dans du **tampon TBE x0,5** à 100 V.

L'ADN, coloré par le bromure d'éthidium intercalé entre les plateaux de bases, est visualisé sous UV.

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

Tampon TBE x0,5 : 45 mM Tris-HCl pH 8,0, 45 mM acide borique, 1 mM EDTA

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

Des fragments de gel d'agarose contenant l'ADN d'intérêt peuvent être découpés sous UV. L'ADN est ensuite extrait à l'aide du kit Nucleospin extract II® (Machery-Nagel). L'agarose est solubilisé dans du perchlorate de sodium puis l'ADN est retenu par une membrane de silice. L'agarose et le tampon d'électrophorèse résiduel sont éliminés lors d'un lavage avec un tampon contenant de l'éthanol. L'ADN est finalement élué de la membrane par de l'eau ou du TE.

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

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

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

2.1.6. Ligation de deux fragments d'ADN

Deux fragments d'ADN, digérés avec des enzymes de restriction donnant des extrémités cohésives ou franches, peuvent être reliés grâce à l'ADN ligase du

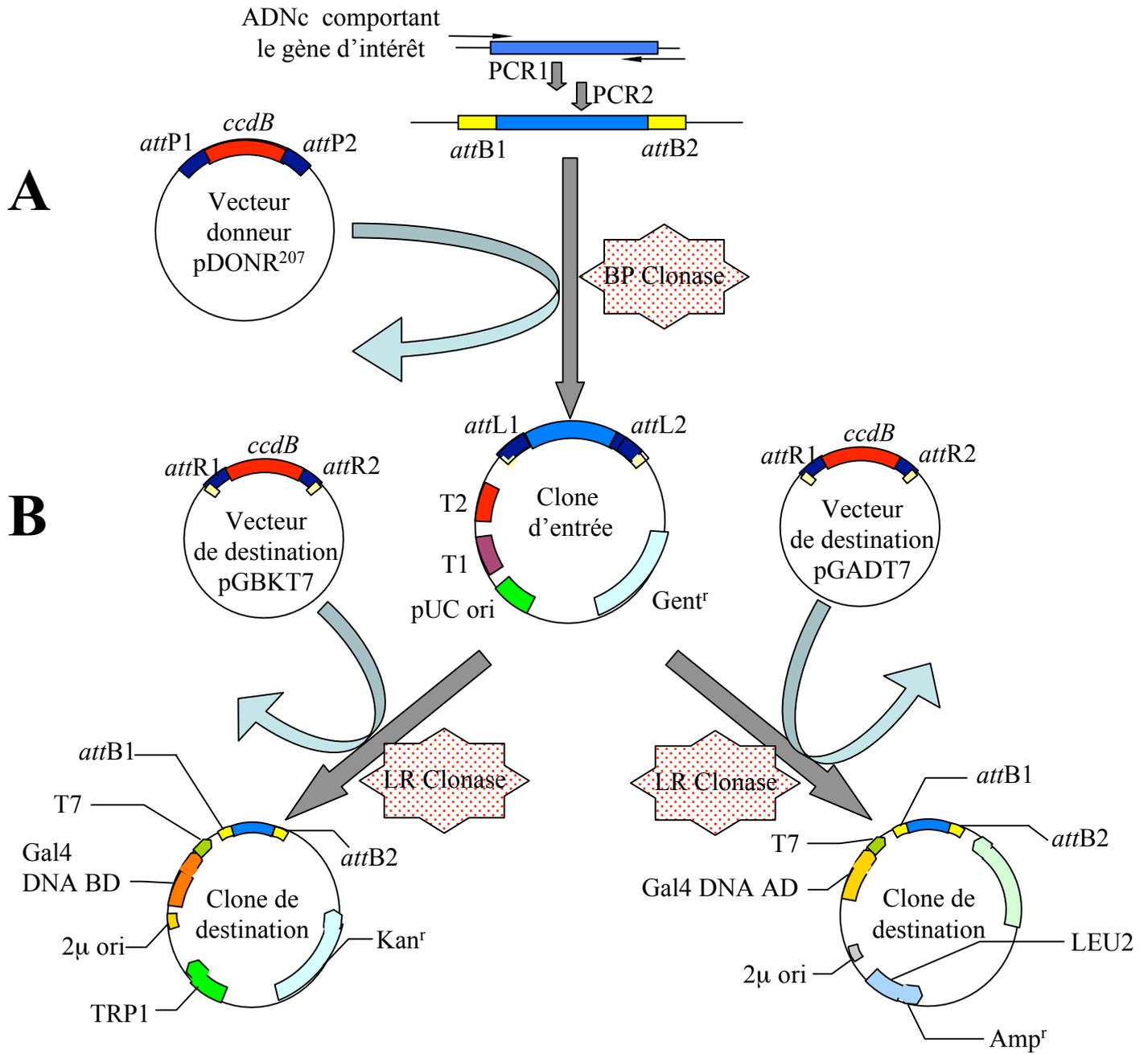


Figure 17 : Principe du clonage Gateway et production des constructions. Par souci de clarté, les sous-produits de recombinaison ne sont pas représentés.

A, Construction du clone d'entrée.

B, Construction du clone de destination.

bactériophage T4. La quantité d'ADN nécessaire est calculée selon la formule suivante (pour un insert plus petit que le vecteur, excès molaire de l'insert : 5 x) :

Quantité d'insert (en ng) = 5 x quantité de vecteur (en ng) x (taille de l'insert/taille du vecteur)

La réaction est réalisée dans du **tampon ligation** avec 3 unités de T4 ADN ligase, 16 h à 15°C. L'ADN est ensuite précipité à l'éthanol, repris dans un petit volume d'eau et une fraction (généralement 1/10^{ème}) de cet ADN est utilisé pour transformer des bactéries compétentes. Une fraction de la réaction de ligation (1/10^{ème}) peut aussi être directement utilisée lors de la transformation.

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

2.1.7. Clonage « Gateway »

Ce clonage (Fig. 17) et les réactions de recombinaisons homologues sont réalisées selon le protocole du fournisseur (Invitrogen).

- Le milieu de recombinaison BP (sites *attB/attP*) est constitué de 1 à 10 µL de produit de PCR avec sites *attB* (40 à 100 fmol), 1 µL du vecteur d'entrée (150 ng, soit environ 40 fmol), 2 µL de BP Clonase II et de tampon **TE** pH 8,0 qsp 8 µL. La recombinaison s'effectue à 25°C pendant 1 h et la BP Clonase II est ensuite inactivée par incubation pendant 10 min à 37°C avec 2 µL de protéinase K (2 mg/mL). Le produit de recombinaison est alors amplifié dans des cellules d'*E. coli* DH5α pour obtenir des quantités suffisantes de vecteurs d'entrées contenant l'insert et aussi pour vérifier par séquençage l'exactitude de la construction (Fig. 17 A).

- Le milieu de recombinaison LR (sites *attL/attR*) comprend: 1 à 10 µL du clone d'entrée, issu de la recombinaison BP (25 à 80 fmol), 1 µL de vecteur de destination pGADT7 et pGBKT7 (40 fmol), 1 µL LR Clonase II et du tampon **TE** pH 8,0 qsp 8 µL. Cette réaction a lieu dans les mêmes conditions que la précédente et la LR Clonase II est inactivée de la même façon (Fig. 17 B). Ce produit de recombinaison est ensuite transformé dans des cellules d'*E. coli* DH5α et la construction finale obtenue est analysée par PCR sur colonie et séquençage.

2.1.8. Transformation d'ADN plasmidique dans *E.coli*

Des bactéries électro-compétentes sont préparées par lavage des bactéries en phase exponentielle de croissance avec de l'eau stérile à 4°C. Elles sont ensuite conservées à -80°C dans du glycérol 20% (v/v).

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

Pour les bactéries électro-compétentes : Une fraction de l'ADN à transformer est mélangée avec 40 µL de bactéries électro-compétentes et le tout est transféré dans une cuve à électroporation. Lors de la décharge électrique (Capacité 25 µF, 2,5 kV, 200 Ω, Biorad Gene Pulser), des pores transitoires sont formés dans la paroi bactérienne et, ainsi, l'ADN peut pénétrer dans la bactérie. Les bactéries transformées sont diluées dans 1 mL de **milieu LB** contenant 0,2 % (p/v) de glucose et incubées 30 min à 37°C. Cette incubation permet aux bactéries de reconstituer leur paroi et d'exprimer le gène de résistance présent sur le plasmide.

Pour les bactéries compétentes pour choc thermique : Une fraction de l'ADN à transformer est mélangée avec 50 µL de bactéries compétentes pour choc thermique. Le mélange est laissé à température ambiante pendant 5 min avant d'être transféré sur glace pendant 30 min. Il est ensuite placé au bain marie à 42°C pour causer le choc thermique qui va moduler les pores de la paroi bactérienne et permettre la pénétration de l'ADN. Le mélange est alors replacé dans la glace pendant 2 min. 1 mL de **milieu SOC** est ajouté au mélange qui est alors transféré au bain-marie porté à 37°C pendant une heure.

Les bactéries transformées sont ensuite étalées sur une boîte **LB-Agar** contenant l'antibiotique approprié. La boîte est placée 16 h à 37°C. Si le plasmide contient le marqueur pour l' α -complémentation, 40 µL de X-Gal 2 % (p/v) dans du diméthylformamide et 20 µL d'IPTG 0,1 M sont ajoutés au milieu avant d'étaler les bactéries.

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

LB-Agar : 5 g/L tryptone, 10 g/L yeast extract, 5 g/L NaCl, 15% Agar

SOC medium : 20 g/L tryptone, 5 g/L yeast extract, 0.5 g/L NaCl, 2.5 mL 1M KCl,

2.1.9. Préparation d'ADN plasmidique de bactéries

Bactéries : Mini-préparation

Les mini-préparations sont réalisées grâce au kit NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel). Une culture bactérienne de 1,5 mL (16 h à 37°C) est centrifugée 5 min à 5000 g pour sédimenter les bactéries. Le culot est repris dans 250 µL de **solution I**, puis les bactéries sont lysées par un traitement alcalin avec 250 µL de **solution II**. Ce traitement dénature l'ADN chromosomique et les protéines. Le lysat est neutralisé avec 300 µL de **solution III**. Le mélange obtenu est centrifugé à 11000 g pendant 5 min à température ambiante. Le surnageant est prélevé et déposé sur une colonne (résine échangeuse d'anions) qui, après une centrifugation à 11000 g pendant 1 min à température ambiante, retiendra l'ADN sur sa membrane de silice. La colonne est lavée avec 450 µL de tampon AQ puis centrifugée à 11000 g pendant 3 min à température ambiante. L'éluion se fait par l'ajout de 50 µL de tampon AE. L'ADN est récupéré après une centrifugation à 11000 g pendant une minute à température ambiante.

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

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

Solution III: 5 M acétate de potassium

Bactéries : Midi-préparation

Les midi-préparations d'ADN sont réalisées avec le kit NucleoBond® PC 100 (Macherey-Nagel) à partir de culture bactérienne de 50 mL (16 h à 37°C). Les bactéries sont lysées par une méthode dérivée de la lyse alcaline-SDS. Après neutralisation, le lysat est chargé sur une colonne (résine échangeuse d'anions) et l'ADN plasmidique est retenu sur la matrice. La colonne est lavée pour se débarrasser des impuretés. L'ADN plasmidique est élué puis précipité à l'isopropanol.

2.1.10. « Plasmid rescue » dans la levure

Dans le cadre d'un criblage de banque, afin d'identifier les plasmides transformés dans les cellules de levures, il faut procéder à un « plasmid rescue » soit la récupération de l'ADN

plasmidique. Cette méthode permet également de discriminer un plasmide particulier dans les cas où la cellule de levure a assimilé plus d'un seul plasmide lors de sa transformation.

Préparation d'ADN total

5 mL d'une culture à saturation de levures sont centrifugés à 5000 g pendant 5 min à température ambiante. Le culot est repris dans 250 µL de **tampon de broyage**. On ajoute ensuite l'équivalent de 250 µL de billes de verre stériles (0,5 mm de diamètre), 125 µL de phénol et 125 µL de chloroforme. Le mélange est homogénéisé au vortex pendant 3 min, puis centrifugé à 12000 g pendant 5 min à température ambiante. 200 µL de la phase aqueuse sont transférés dans un nouveau tube Eppendorf et sont précipités par l'ajout de 20 µL d'acétate d'ammonium 4 M et 600 µL d'éthanol 100%. Le mélange est alors mis à -20°C pendant 2 h puis est centrifugé à 12000 g pendant 10 min à température ambiante. Le culot est lavé deux fois avec 300 µL d'éthanol 70%. Le culot est alors repris dans 40 µL de **TE**.

Tampon de broyage : 10 mM Tris-HCl, pH8,0, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 2% Triton, 1% SDS

Transformation de l'ADN extrait dans E. coli et sélection des transformants

Cf. partie 2.1.8 de la section matériels et méthodes.

2.1.11. Séquençage d'ADN

Le séquençage de l'ADN a été réalisé par P. Hammann et M. Alioua (service de séquençage de l'IBMP) avec l'appareil « Applied Biosystems 3130 XL Genetic Analyser » (Hitachi). La méthode utilisée est basée sur la technique de Sanger (Sanger *et al.*, 1977) dans laquelle l'élongation de chaînes d'ADN néosynthétisées sont stoppées par l'incorporation statistique d'un ddNTP couplé à un fluorophore. Les produits de séquençage sont séparés par électrophorèse et, après excitation par un laser à l'argon (longueur d'onde 492 et 514 nm), les signaux réémis par chaque bande sont analysés et permettent d'identifier la dernière base incorporée. Il faut en pratique 500 ng d'ADN et 5 pmol d'amorce pour déterminer la séquence d'environ 700 pb.

2.1.12. Analyse d'ADN par hybridation de type Southern Blot

Extraction d'ADN au DNAzol[®] (GibcoBRL)

L'ADN est extrait de fleurs et bourgeons floraux. 1 g de matériel végétal est recueilli par plante. Ce matériel est broyé au mortier dans de l'azote liquide. Le broyat est transféré dans un tube Falcon et 1 mL de DNAzol[®] par 100 µg de matériel est ajouté. Après 5 min à température ambiante, le mélange est centrifugé à 12000 g pendant 10 min à 4°C. Le surnageant est prélevé et l'on y ajoute 300 µL de chloroforme par 100 µg de matériel. Le mélange est agité au vortex pendant 15 sec puis est incubé à température ambiante pendant 15 min. Le mélange est centrifugé à 10000 g pendant 15 min à 4°C. La phase aqueuse (contenant l'ADN) est prélevée et transférée dans un nouveau tube. On procède à une nouvelle centrifugation de 12000 g pendant 5 min à 4°C. Le reste de la phase aqueuse est retiré. 250 µL de **BEB (Back Extraction Buffer)** pour 100 µg de matériel sont ajoutés au mélange qui est ensuite passé au vortex pendant 3 min. On procède à une centrifugation à 12000 g pendant 30 min à température ambiante. La phase aqueuse et l'interphase sont retirées. 400 µL d'isopropanol par 100 µg de matériel sont ajoutés à la phase organique. Le mélange est homogénéisé au vortex et incubé pendant 5 min à température ambiante. On procède à une centrifugation à 12000 g pendant 15 min à 4°C. Le surnageant est retiré. Le culot d'ADN est lavé avec 5 mL d'éthanol 70% puis, après une centrifugation à 12000 g pendant 15 min à 4°C, séché et resuspendu dans 100 µL de **TE**.

BEB (Back Extraction Buffer): 4 M guanidine thiocyanate, 50 mM citrate de sodium, 1 M Tris.

Marquage d'un fragment d'ADN (DECAprime IITM)

La sonde radioactive a été réalisée par la technique de PCR. La sonde est amplifiée avec deux amorces déterminées sur un plasmide purifié. Le marquage radioactif est distribué tout le long de la séquence grâce à l'incorporation d' α [³²P] dCTP. Le mélange réactionnel est composé de :

- 20 ng d'ADN
- 50 pmoles de chaque amorce
- 20 µM d'ATP, dGTP, dTTP
- 5 µL α [³²P] dCTP à 10 Ci/L (3000 Ci/mmmole)

- 1,5 mM MgCl₂
- 5 µL tampon PCR 10X (Gilbco-BRL)
- 1 U d'exonucléase-free Klenow (Gilbco-BRL)
- Dans un volume final de 50 µL

Ces conditions particulières de PCR sont employées pour optimiser l'élongation effectuée avec une quantité limitante d' α [³²P] dCTP. La PCR se déroule pendant 5 cycles comme suit : 1 min à 92°C, 1 min 30 à 50°C, 5 min à 72°C, puis une phase finale d'élongation de 10 min à 72°C achève la réaction. La polymérase est inactivée par l'extraction au chloroforme et la radioactivité libre est éliminée par filtration sur une colonne de Séphadex G50.

Digestion, transfert et hybridation de l'ADN

L'ADN génomique d'*Arabidopsis thaliana* est digéré par des enzymes de restriction dans un volume final de 500 µL pendant 16 h. Les produits résultants sont précipités, séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose à 0,7% sous un voltage constant de 25 V pendant 18 h. Après électrophorèse, les fragments génomiques sont partiellement hydrolysés pour faciliter leur transfert sur la membrane. Le gel est incubé pendant 15 min dans 0,25 N d'HCl pour une dépurination partielle de l'ADN, puis placé dans un bain de 0,2 M NaOH pendant une heure afin d'hydrolyser les liaisons phosphodiester au niveau des sites de dépurination et dénaturer les brins d'ADN. Le gel subit deux lavages dans une **solution de neutralisation**. L'ADN ainsi préparé est transféré sur une membrane de Nylon (Hybond NX[®], Amersham) par capillarité grâce à un flux de tampon SSC 10x pendant 16 h. Les acides nucléiques sont fixés covalamment à la membrane par exposition aux UV (UV Stratalinker 2400, Stratagene[®]). La membrane est incubée à 50°C pendant 4 h dans du **tampon de préhybridation** pour diminuer les interactions aspécifiques ultérieures entre la sonde d'oligonucléotides et la membrane. La sonde radioactive est dénaturée et mélangée à un volume minimal de **tampon de préhybridation** (2 M cpm/10 mL). L'hybridation est réalisée pendant 16 h à 50°C. Deux série de lavages ont lieu pendant 30 min à 50°C dans :

- SSC 5x, 0,1% SDS
- SSC 2x, 0,1% SDS

La membrane est exposée à une plaque de phosphorimager (Imaging plate, BAS-MS, Fujifilm) pendant 16 h à température ambiante, puis révélée au phosphorimager (BAS 1000, Fujifilm).

SSC 10x : 0,15 M citrate trisodium pH 7,0, 1,5 M NaCl

Solution de neutralisation : 0,5 M Tris HCl pH 7,5, 1,5 M NaCl

Tampon de préhybridation : 6x SSC, 5x Denhardt, 0,5% SDS, 20 mg/L ADN de sperme de saumon

2.1.13. Préparation d'ARN

Extraction des ARN d'Arabidopsis thaliana

L'extraction des ARN se fait selon la méthode décrite par Goodall (Goodall *et al.*, 1990). Les ARN sont extraits à partir d'organes aériens âgés d'un mois ou de racines âgées de deux mois. Ces organes sont broyés au mortier dans de l'azote liquide. 1 g de la poudre obtenue est repris dans 3 mL de **tampon d'extraction**. On ajoute 0,2 mL d'acétate de sodium 3 M pH 4,8, puis 3 mL de phénol saturé en eau et 0,6 mL de chloroforme/alcool isoamylique (24/1). La solution est agitée vigoureusement puis placée 15 min dans la glace. Après centrifugation 30 min à 15000 g à 4°C, la phase aqueuse est récupérée et d'autres extractions au phénol/chloroforme (1:1) sont réalisées jusqu'à ce que l'interface soit propre. Les acides nucléiques sont précipités par addition d'un volume d'isopropanol (1 h à -20°C) à la phase aqueuse. Après une centrifugation de 30 min à 15000 g le culot d'ARN est lavé à l'éthanol 70% et séché rapidement à l'air et repris dans de l'eau distillée stérile. La quantité d'ARN est déterminée en mesurant l'absorbance à 260 nm, une unité de DO₂₆₀ correspond à 40 µg/mL d'ARN.

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

ARN mitochondriaux

Les mitochondries sédimentées (100 µg équivalent protéines, cf. parties 2.2.1 et 2.2.2 de la section matériels et méthodes) 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, MgCl₂ 10 mM, SDS 1% (p/v)

Gel d'agarose dénaturant pour ARN

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

Tampon de dénaturation : tampon MOPS x1, 70% (v/v) formamide, 20% (v/v) formaldéhyde

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

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

Transcription inverse

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

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

2.2.Méthodes de biochimie

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

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

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

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

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

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

La purification de mitochondries à partir de tubercules de pommes de terre suit un protocole dérivé de ceux utilisés par Neuburger *et al* (Neuburger *et al.*, 1982) et Struglics *et al* (Struglics *et al.*, 1993). Toutes les étapes sont réalisées à 4°C. Les tubercules de pomme de terre sont pelés, lavés et broyés dans un extracteur de jus (Moulinex). Deux volumes du jus obtenu (environ 600 mL à partir d'un kg de tubercules de pomme de terre) sont mélangés avec un volume de **tampon d'extraction 3x**. Le pH est maintenu à 7,5 par addition de tampon phosphate de potassium 1 M. La solution est laissée au repos quelques minutes pour que l'amidon sédimente, puis elle est filtrée à travers un tissu de Nylon (maille : 120 µm). Le filtrat est soumis à deux cycles de centrifugations différentielles : basse vitesse, 10 min à 2000 g et haute vitesse, 20 min à 16000 g toutes deux à 4°C. Entre les deux cycles de centrifugations différentielles, le culot est remis en suspension dans du **tampon de lavage**. Le culot de mitochondries brutes obtenu après la deuxième centrifugation à 16000 g est remis en suspension dans du tampon de lavage à l'aide d'un homogénéisateur de Dounce puis chargé sur 30 mL de Percoll 28% (v/v) dans du tampon de lavage. Pendant la centrifugation (1 h 30 à 37000 g), un gradient de Percoll se forme et les mitochondries intactes sont séparées des membranes des amyloplastes et des mitochondries cassées. Les mitochondries purifiées sont prélevées au milieu du gradient, diluées dix fois dans du **tampon lavage** et centrifugées 15 min à 16500 g pour éliminer le Percoll (cette opération est réalisée deux fois).

Tampon d'extraction 3x : 0,9 M saccharose, 90 mM phosphate de potassium pH 7,5, 6 mM EDTA, 0,6% BSA, 6 mM DTT

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

Ce protocole est aussi utilisé pour la purification de mitochondries à partir de têtes de chou-fleur. La différence de protocole est qu'après le gradient de Percoll, les mitochondries purifiées doivent être diluées dans un plus grand volume de tampon de lavage (60x au lieu de 10x). De plus les purifications faites avec des têtes de chou-fleur comportent peu d'amidon contrairement aux purifications faites sur les tubercules de pommes de terre.

2.2.3. Purification de mitoplastes

Ce fractionnement, décrit par Werhahn *et al.* (Werhahn *et al.*, 2001) permet de purifier la membrane externe et les mitoplastes, structures sphériques correspondant à des mitochondries dépourvues de membrane externe. Le culot enrichi en mitochondries obtenues après les centrifugations différentielles (cf. partie 2.2.1 de la section matériels et méthodes) est repris dans une **solution hypotonique** à une concentration en protéine de 1 mg/mL et la suspension obtenue est homogénéisée pendant 10 min à 4°C à l'aide d'un homogénéisateur de Dounce. La suspension est chargée sur un gradient discontinu de saccharose (60%-32%-15% (v/v)) et centrifugée à 50000 g pendant 1 h à 4°C. Les mitoplastes purifiés sont prélevés à l'interface des couches à 32% et 60% de saccharose, dilués lentement avec du **tampon de lavage** de manière à ramener la concentration en saccharose à 10%, puis lavés dans le **tampon de lavage**.

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

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

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

2.2.4. Fractionnement des mitoplastes d'*Arabidopsis thaliana*

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

2.2.5. Quantification des protéines

La concentration d'une solution de protéine est estimée en utilisant la méthode de Bradford. Le réactif de Bradford, qui contient du bleu de Coomassie, a une couleur brune à cause du pH bas de cette solution. Le pKa du bleu de Coomassie change lorsqu'il se fixe sur

une protéine, et le colorant devient bleu. La concentration en protéine d'une solution est estimée en mesurant son absorbance à 595 nm, en présence du **réactif de Bradford** (100 µL d'échantillon + 1 mL de réactif), et en comparant la valeur obtenue à une courbe standard obtenue avec des concentrations connues de BSA.

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

2.2.6. Concentration des protéines

Précipitation au TCA

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

2.2.7. Électrophorèse sur gel de polyacrylamide

Électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)

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

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

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

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

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

Électrophorèse en condition native (BN-PAGE)

Cette technique d'électrophorèse permet de séparer des complexes selon leur taille en conditions natives. Les sous-unités de ces complexes peuvent être séparées lors d'une seconde dimension par un SDS-PAGE classique. Le BN-PAGE est réalisé en suivant un protocole décrit par Jansch *et al.* (Jansch *et al.*, 1996) pour étudier les complexes protéiques mitochondriaux. La mobilité électrophorétique est conférée aux protéines par le bleu de Coomassie G250 chargé négativement.

Solubilisation des complexes membranaires mitochondriaux

Les complexes protéiques sont extraits des membranes les entourant pour pouvoir être séparés par électrophorèse. Des membranes mitochondriales sont solubilisées en utilisant un détergent doux, le n-dodécylmaltoside (avec un rapport détergent/protéine 3/1 (g/g)) dans un **tampon de solubilisation**, 30 min à 4°C. Les complexes protéiques solubilisés sont séparés par centrifugation 30 min à 100000 g à 4°C et sont récupérés dans le surnageant.

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

Bleu Natif

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

Les complexes solubilisés sont mélangés avec du bleu de Coomassie G250 (solution stock à 5% dans 500 mM d'acide aminocaproïque) pour avoir un rapport détergent/colorant de 4/1. La migration se déroule à 4°C, 1 h à 100 V puis 4-5 h à 500 V dans des **tampons cathode** et **anode**. Les deux premiers tiers se déroulent avec du tampon cathode additionné de 0,02% de bleu G250.

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

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

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

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

SDS-PAGE

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

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

2.2.8. Détection des protéines

Coloration au bleu de Coomassie

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

Solution de coloration : 0,125% (p/v) bleu de Coomassie R250, 10% (v/v) acide acétique, 25% (v/v) éthanol

2.2.9. Purification des anticorps

Les anticorps spécifiques ont été purifiés sur colonne d'affinité. La colonne est constituée d'une matrice de sépharose-CNBr sur laquelle est fixé le peptide antigène. La matrice est activée par de l'HCl 0,1 M. Puis 1 mg de polypeptide purifié, repris dans 700 μ L de tampon de couplage, est couplé à la matrice 1 h à température ambiante puis 16 h à 4°C. Les fonctions cyanogène de la matrice réagissent avec les amines primaires du polypeptide de

manière à former des liaisons covalentes. Après lavage dans 5 mL de **tampon de couplage**, les sites restés libres sont bloqués par addition de Tris 1 M pH 8,0 pendant 2 h à température ambiante. La matrice est ensuite retenue sur une colonne puis lavée avec 3 mL de **tampon S1** puis 3 mL de **tampon S2** pour éliminer les polypeptides non couplés.

Le sérum à purifier (2 mL), dilué 10 fois dans le **tampon L1**, est centrifugé à 10000 g pendant 10 min puis le surnageant est chargé sur la colonne. La matrice est lavée avec 20 mL de **tampon L2**.

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

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

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

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

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

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

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

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

2.2.10. 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 du méthanol 100%. L'ensemble est disposé en « sandwich » entre 5 feuilles de papier Whatman imbibées avec du **tampon de transfert** et placé dans une cuve à électrotransfert semi-sec (Bio-Rad, Transblot® SD). 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 3 mA par cm² de membrane pendant 1 heure.

Tampon de transfert : 48 mM Tris, 39 mM glycine

2.2.11. Immunodétection

La membrane est incubée dans du **tampon bloquant** 1 h à température ambiante sous agitation pour saturer les sites de fixation aspécifiques. Puis, la membrane est incubée avec l'anticorps primaire (de lapin ou de souris) 16 h à 4°C sous agitation dans du **tampon anticorps**. Après 3 lavages avec une solution de **PBS-T** pour éliminer les anticorps non hybridés, la membrane est incubée avec l'anticorps secondaire (anticorps de chèvre anti-lapin ou anti-souris, couplés à la peroxydase de raifort) 1 h à température ambiante sous agitation. Après 3 lavages, la révélation est réalisée grâce au kit **ECL** ("Enhanced Chemical Luminescence") Western Blotting detection system (Amersham®) d'après les indications du fournisseur.

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

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

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

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

2.3. Méthodes génétiques d'étude des interactions protéiques

2.3.1. Interaction de type double hybride Gal4 dans la levure

Il s'agit de transformer des cellules de levures avec deux constructions où les séquences codant pour des protéines dont l'on souhaite tester l'interaction sont fusionnées avec les domaines d'activation (AD) ou de liaison à l'ADN (BD) du facteur de transcription Gal4 (Fields et Song, 1989). Dans ce système, l'interaction entre protéines cause un rapprochement physique entre AD et BD reconstituant ainsi le facteur de transcription fonctionnel Gal4. L'activation de ce dernier conduit à l'expression de gènes rapporteurs *ADE2*, *HIS3* et *LacZ* permettant de visualiser et de mesurer l'interaction protéique concernée.

2.3.2. Interaction de type double hybride « Split-ubiquitin » dans la levure

La technique du double hybride « split-ubiquitin » a été développée par Johnsson et Varshavsky (Johnsson et Varshavsky, 1994). Son intérêt réside dans la possibilité de tester les interactions entre protéines membranaires contrairement au double hybride Gal4. L'ubiquitine est une protéine eucaryotique très conservée d'un poids moléculaire de 8,5 kDa. Cette protéine a été séparée en deux parties : Une partie C-terminale native et une partie N-terminale ayant une mutation ponctuelle (Ile 3 -> Gly) empêchant le réassemblage spontané des deux parties de la protéine. L'une de ces deux parties est fusionnée avec la protéine « proie » et l'autre avec la protéine « hameçon » dont l'on souhaite tester l'interaction. L'interaction entre protéines cause un rapprochement physique entre les parties C et N-terminales de l'ubiquitine. Cet événement recrute des protéases spécifiques et permet le largage du facteur de transcription PLV (fusion des facteurs de transcription LexA et VP16) fusionné à la partie C-terminale de l'ubiquitine. Ce facteur de transcription ira alors activer les gènes rapporteurs *ADE2*, *HIS3* et *LacZ* dans le noyau des cellules de levures.

2.3.3. Préparation de levures compétentes à la transformation par choc thermique

Une colonie de levure pJ69-4A est cultivée à 30°C pendant 16 h dans 5 mL de **YPD**. Cette culture est alors diluée 10 x dans 45 mL de **YPD** puis incubée à 30°C sous agitation jusqu'à obtention d'une DO₆₀₀ de 0,2. La culture est centrifugée à 4000 g pendant 5 min à température ambiante, le culot est lavé successivement dans 20 mL d'eau et 20 mL de **TE**, **LiAc 1X** puis finalement resuspendu dans 1 mL de **TE**, **LiAc 1X**.

YPD : 20 g/L de peptone, 20 g/L glucose, 10 g/L de yeast extract (ajouter 15 g/L de bactoagar pour les milieux solides)

TE, LiAc 1X : TE 1 x ; 0,1M LiAc

2.3.4. Transformation des levures par choc thermique

Une seule étape de transformation est suffisante pour introduire les deux constructions au sein d'une même cellule de levure.

On ajoute à 5 µg d'ADN plasmidique, 100 µg d'ADN porteur (ssDNA) et 100 µL de levures compétentes préparées comme décrit préalablement. Après une courte agitation au vortex,

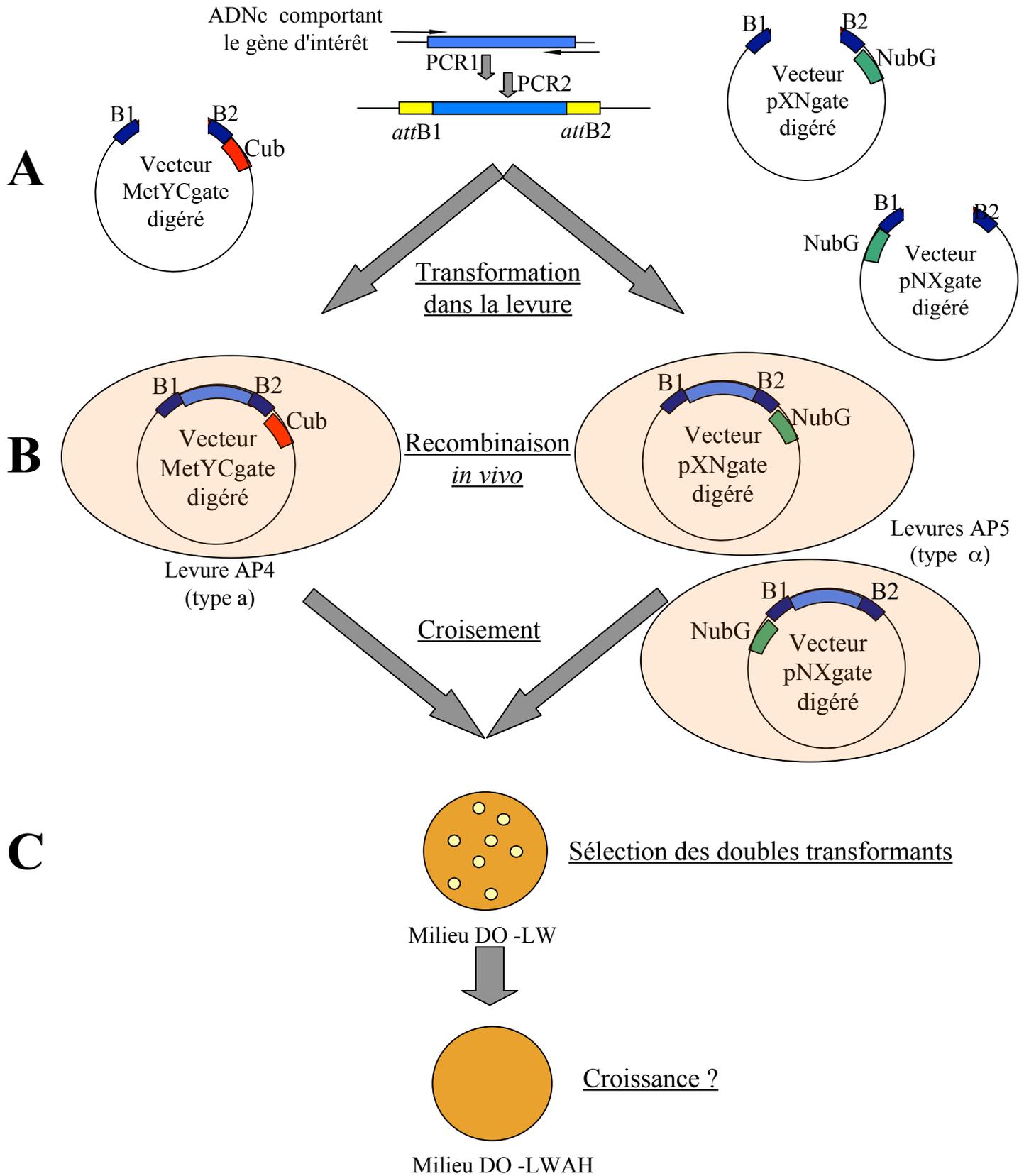


Figure 18 : Schéma récapitulatif du principe du test d'interaction split-ubiquitin dans la levure.

A, Digestion par des enzymes de restrictions spécifiques des vecteurs split-ubiquitin.

B, Cotransformation dans des cellules de levures des vecteurs digérés et des fragments clonés par PCR. Croisement entre les deux souches de levures transformées.

C, Sélection des doubles transformants sur milieu DO -LW puis repiquage sur milieu DO -LWAH pour vérifier l'activation des gènes rapporteurs *ADE2* et *HIS3*.

cette réaction de transformation est incubée pendant 30 min à 30°C. On ajoute alors 700 µL de **PEG-LiAc-TE** avant d'incuber pendant 15 min à 42°C. On centrifuge alors à 35000 g pendant 15 sec, le culot est suspendu et lavé dans 1 mL d'eau. On centrifuge à nouveau dans les mêmes conditions et le culot est repris dans 1 mL de **YPD**. L'ensemble est incubé pendant 1 h à 30°C sous agitation (150 rpm). On procède à une dernière centrifugation toujours dans les mêmes conditions puis les levures sont étalées sur un milieu drop out **DO -LW** afin de sélectionner les doubles transformants.

PEG-LiAc-TE : 40 % (v/v) PEG 3000 (ou 50% (p/v)), 1x TE pH 7,5, 0,1 M LiAc

Milieux « drop out » (DO) : composants communs : 0,67% (p/v) de yeast nitrogen base, 38 mM de sulfate d'ammonium, 2% (p/v) de glucose (on ajoute 15 g/L de bactoagar pour les milieux solides) et 0,06% (p/v) d'un mélange d'acides aminés ne contenant pas certains acides aminés en fonction du milieu à composer (-L : sans leucine ; -W : sans tryptophane ; -LW : sans leucine ni tryptophane ; -LWH : sans leucine ni tryptophane ni histidine ; -LWA : sans leucine ni tryptophane ni adénine ; -LWAH : sans leucine ni tryptophane ni adénine ni histidine)

2.3.5. *Obtention des constructions pour le double hybride split-ubiquitin*

On transforme ensemble le plasmide, linéarisé par deux enzymes de restriction, et l'insert, obtenu par PCR, dans des cellules de levures (Fig. 18 A). La construction, correspondant à l'insertion de l'insert dans le plasmide linéarisé, se fait par recombinaison homologue *in vivo* dans la levure (Fig. 18 B).

Le vecteur MetYCgate (codant pour la protéine dont l'on souhaite tester l'interaction fusionnée avec la partie C-terminale de l'ubiquitine et le facteur de transcription PLV) est digéré par PstI et HindIII . Les vecteurs pXNgate et pNXgate (codant respectivement pour la protéine dont l'on souhaite tester l'interaction fusionnée en sa partie C-terminale ou N-terminale avec la partie N terminale de l'ubiquitine) sont digérés par les enzymes de restrictions EcoRI et SmaI selon les programmes appropriés.

Le mélange de transformation comprend : 1 µg de vecteur digéré, 1 µg de PCR codant pour la protéine d'intérêt, 100 µg d'ADN porteur (ssDNA) et 100 µL de levures compétentes. Le reste de la transformation est réalisé comme décrits préalablement avec sélection des transformants sur milieu DO-L (pour les transformants MetYCgate) ou DO-W (pour les transformants pXNgate et pNXgate).

Les constructions effectuées avec les vecteurs pXNgate et pNXgate sont transformées dans des cellules de levures de souche AP4 de mating type « a ». De la même manière, les constructions effectuées avec le vecteur MetYCGate sont transformées dans les cellules de levures de souche AP5 de mating type « α ». Afin d'obtenir des levures comportant un plasmide de chaque type (pXNgate/pNXgate d'une part et MetYCGate d'autre part), on procède à un croisement des levures précédemment obtenues. Les levures ayant assimilé les deux plasmides sont ensuite sélectionnées sur un milieu DO-LW (Fig. 18 C). L'expression de la protéine par la levure est vérifiée par Western blot.

2.3.6. Lyse des cellules de levures

Une culture de 5 mL à saturation de levures est centrifugée à 5000 g pendant 5 min à 4°C. Le culot est resuspendu dans 400 μ L de tampon 50mM Tris/HCl pH 7,4 et ajouté à un tube Precellys de 2,2 mL contenant un volume équivalent à 200 μ L de billes de verre. Le tube est mis dans un agitateur de type Precellys avec les paramètres suivants : agitation 5500 cycles par min pendant 2x30 sec séparé par une pause de 30 sec. Le tube est centrifugé à 13000 g pendant 5 min à 4°C et le surnageant prélevé. 10 μ L de ce surnageant mélangés à 10 μ L de tampon de charge P x2 peuvent être utilisés par piste pour un Western blot afin de vérifier l'expression de certaines protéines.

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

2.3.7. Test d'interaction double hybride

Des colonies de levures transformées comportant les deux plasmides AD et BD sont cultivées dans 5 ml de milieu **DO -LW** et agité (150 rpm) pendant 16 h à 30°C. 5 μ L de dilutions correspondant à des D.O. de 0,1, 0,01 et 0,001 de cette culture sont déposées sur un milieu sélectif de type **DO -LWAH**. L'activation des gènes rapporteurs *ADE2* et *HIS3* permet la croissance des levures sur ces milieux sélectifs et démontre l'interaction entre les protéines étudiées.

2.3.8. *Mesure de la force de l'interaction par la quantification de l'activité du gène rapporteur LacZ*

L'expression du gène *LacZ* est quantifiée en mesurant, à DO₄₂₀, l'accumulation du produit de la réaction de la galactosidase avec son substrat 2-Nitrophenyl β-D-galactopyranoside (o-NPG). Une colonie de levure portant deux plasmides comportant les séquences codant pour des protéines dont l'on souhaite tester l'interaction est cultivée pendant 16 h dans 3 mL de milieu sélectif **DO -LW**. 1 mL de cette culture est prélevé pour mesurer la DO₆₀₀ devant alors se situer entre 0,5 et 1 unité. Les 2 mL restants sont centrifugés pendant 10 sec à 15000 g et le culot obtenu est congelé dans de l'azote liquide. On ajoute au culot 665 µL de **tampon H**, 55 µL de chloroforme et 55 µL de SDS 0,1% avant de vortexer brièvement. 125 µL d'une solution o-NPG (13,2 mM dans du **tampon H**) sont ajoutés et la solution est mise à incuber à 30°C jusqu'à obtention d'une coloration jaune (durée : entre 20 min et 3 h). On ajoute alors 400 µL de NaCO₃ 1 M pour arrêter la réaction. La solution est centrifugée à 15000 g pendant 5 min et la DO₄₂₀ du surnageant est mesurée. La force de l'interaction protéique est proportionnelle à l'activité galactosidase (U) calculée selon la formule suivante : $U = 1000 \text{ DO}_{420} / (\text{Vol} \times \text{temps} \times \text{DO}_{600})$.

Tampon H : 100 mM HEPES KOH pH 7,0 ; 150mM NaCl ; 2 mM Mgcl2 ; 1% (p/v) BSA.

2.3.9. *Criblage d'une banque d'ADNc par le système double hybride « split-ubiquitin »*

Obtention de la construction exprimant protéine « hameçon »

La construction exprimant la protéine dont on recherche les partenaires est obtenue par le protocole décrits dans la partie 2.3.5 de la section matériels et méthodes.

Contrôles négatifs et positifs

Le contrôle négatif est effectué en co-transformant une cellule de levure avec deux plasmides :

- l'un exprimant la protéine « hameçon » fusionné avec la partie C-terminale de l'ubiquitine et le facteur de transcription PLV

- L'autre exprimant seulement la partie N-terminale mutée de l'ubiquitine

Pour le contrôle positif, on procède de même en remplaçant le plasmide exprimant la partie N terminale mutée de l'ubiquitine par un plasmide exprimant la version native de cette protéine. Ceci permet un réassemblage spontané des deux parties de l'ubiquitine et l'activation des gènes rapporteurs à moins que la protéine « hameçon » ait une orientation membranaire inappropriée au test (ie. la partie comportant la partie C-terminale de l'ubiquitine étant orientée du côté externe de la membrane cytoplasmique).

Criblage

La colonie de levure contenant la construction codant pour cette protéine est cultivée dans 10 mL de milieu **DO-L** pendant 16 h à 30°C avec agitation (150 rpm). 2 mL de cette culture sont utilisés pour inoculer 200 mL de milieu **DO-L**. Une fois que la DO_{546} de cette culture est égale à 0,6, on procède à une transformation par choc thermique (protocole décrit dans la partie 2.3.4 de la section matériels et méthodes) de ces cellules avec 21 µg d'ADN d'une banque d'ADNc (*Arabidopsis thaliana* NubG-x cDNA library, fournie par Dualsystems Biotech®). La transformation est répartie sur un milieu **DO-LWAH** contenant une quantité appropriée de 3-AT (déterminée par une expérience pilote).

Analyse des candidats positifs

Les colonies poussant sur le milieu **DO-LWAH** sont utilisées comme matrice pour une PCR amplifiant l'insert (amorces : z0719 et z0723). Les fragments amplifiés sont séquencés et analysés. Pour les colonies ayant assimilé plus d'un plasmide et pour confirmer le caractère positif d'une interaction testée, on procède à un « plasmid rescue » (cf partie 2.1.10 de la section matériels et méthodes), suivi d'une nouvelle transformation dans une cellule de levure. Le résultat de cette co-transformation avec les plasmides codant pour la protéine « hameçon » et la protéine candidate fusionnées respectivement avec la partie C et N terminale de l'ubiquitine est déposé sur un milieu **DO-LWAH**. Si les levures transformées poussent sur ce milieu, ceci confirme d'interaction.

Test β -galactosidase

Les colonies sont répliquées par « filter lift » sur papier Whatman 3MM stérilisé. Un papier Whatman correctement dimensionné est posé sur la surface du milieu **DO-LWAH** sur lequel les colonies de levures transformées ont été déposées. L'incubation est d'une durée de 10 min. Le papier Whatman est ensuite plongé dans l'azote liquide puis transféré dans une boîte de Petri, les colonies transférées orientées vers le haut, et est laissé à température

ambiante pendant 5 min. Le papier Whatman est ensuite recouvert d'une **solution de révélation** préalablement chauffée à 50°C. L'ensemble est incubé à température ambiante jusqu'à révélation du test colorimétrique.

Solution de révélation: 0,5% (p/v) agarose, 0,1 mg/ml X-Gal, qsp 1x PBS pH 7,4

2.4. Méthodes d'études génétiques chez *Arabidopsis*

2.4.1. Extraction d'ADN de plantes

Méthode Edwards

Cette extraction est basée sur la méthode décrite par K. Edwards (Edwards *et al.*, 1991). Dans un tube Precellys de 2,2 mL, mettre un volume équivalent à 200 µL de billes de verre et 400 µL de **tampon d'extraction** (200mM Tris HCl pH 7.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA). Puis y joindre le matériel végétal dont l'ADN est à extraire, idéalement une jeune feuille d'*Arabidopsis* (deux semaines post-germination). Mettre les tubes dans un agitateur de type Precellys avec les paramètres suivants : agitation 5500 cycles par minute pendant 2x30 sec séparé par une pause de 30 sec. Dans chacun des tubes est ajouté 20 µL de SDS 10% (soit 0.5% SDS final) avant d'être homogénéisé au vortex pendant 2 sec. Les tubes sont ensuite centrifugés à 13000 g pendant 1 min à température ambiante et 300 µL du surnageant sont prélevés. L'ADN contenu dans le surnageant est précipité avec 300 µL d'isopropanol. Le contenu des tubes est alors centrifugé à 13000 g à température ambiante pendant 5 min. Le surnageant est éliminé et le culot est séché pendant 1 h à température ambiante. Le culot est ensuite repris dans 100 µL de **TE**.

2.4.2. Transformation d'*Arabidopsis* par la méthode du « floral dip »

Le protocole utilisé est une adaptation du protocole décrit par Clough et Bent (Clough et Bent, 1998). Des cellules d'*Agrobacterium* sont cultivées dans 10 mL de milieu **LB** contenant les antibiotiques appropriés pendant 16 h à 28°C sous agitation (150 rpm). 2 mL de cette culture sont ajoutés à 250 mL de milieu **LB** avec antibiotiques adaptés et sont incubés dans les mêmes conditions. Les cellules sont alors récupérées par une centrifugation à 5000 g

pendant 15 min à température ambiante et resuspendues dans 250 mL de **milieu d'infiltration**. Des plantes d'*Arabidopsis* en fleur sont imprégnées de cette solution pendant 90 secondes, puis sont placées dans un conteneur maintenu à l'obscurité et à un haut taux d'humidité.

Les graines sont stérilisées (selon le protocole décrit dans la partie 2.4.3 de la section matériels et méthodes) et semées sur un **milieu de germination** contenant les antibiotiques appropriés. Après la vernalisation par passage pendant 48h à 4°C, les milieux sont transférés en logettes, 16 h de jour à 22°C et 8 h de nuit à 20°C comme photopériode, pendant trois semaines. Les plantes résistantes sont repiquées en terre pour l'observation de leurs phénotypes et l'analyse de leurs génotypes.

Milieu d'infiltration : 2,165 g/L de Murashige et Skoog (MS) 255 medium, 5% (p/v) sucrose, 0,1% (v/v) Sliwet L-77, 200mM Acetosyringone

Milieu de germination : 5 g/L de Murashige et Skoog (MS) 255 medium, 10% (p/v) sucrose, 8 g/L agar, pH ajusté à 5,7 par ajout de KOH

2.4.3. Stérilisation des graines

On ajoute à l'équivalent de 100 µL de graines placées dans un tube Eppendorf 800 µL d'une **solution de stérilisation** fraîchement préparée. Le tube est mélangé par inversion pendant 10 min. Les graines sont ensuite lavées 4 fois avec de l'éthanol 80%, puis lavées 2 fois avec l'éthanol 100%. Les graines sont ensuite séchées sous une hotte à flux laminaire stérile.

Solution de stérilisation : 5 volumes d'éthanol 100% mélangés à 1 volume de javel diluée x4

2.4.4. Observation de graines décolorées

Des graines immatures sont isolées à partir de siliques issues de plantes âgées de deux mois (un mois en culture *in vitro* et un mois en culture en terre). Ces graines sont fixées au glutaraldéhyde 2% puis décolorés dans la **solution de Hoyer** (Meinke, 1994). Après ce traitement, les tissus deviennent transparents et les embryons peuvent être observés par transparence avec un microscope optique à épifluorescence Nikon E800, les observations ont

été réalisées en contraste interférentiel différentiel (DIC). Les images ont été prises avec une caméra couleur triCCD Nikon DXM1200.

Solution de Hoyer : 71,4 g/L gomme arabique, 17,3 M d'hydrate de chloral, 15% glycérol

Résultats

1. Le transporteur ABC du système I

Le système I de maturation des cytochromes de type *c* trouvé dans les mitochondries de plantes et de bactéries utilise les protéines ccm. Ce système comporte un transporteur ABC qui a été identifié chez les bactéries. Chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, la ou les parties transmembranaires potentielles de ce transporteur ont été caractérisées et correspondent à AtCcmB et AtCcmC, protéines orthologues des CcmB et CcmC bactériens respectivement. Des études *in silico* suggèrent que la partie de liaison à l'ATP correspondant à ce transporteur soit la protéine AtNAP10 codée dans le noyau.

Afin de confirmer que la protéine AtNAP10 correspond bien à la protéine orthologue de CcmA et afin de préciser la structure de ce transporteur ABC dans les mitochondries d'*Arabidopsis*, nous avons cherché à savoir si cette protéine est capable d'interagir avec CcmB et/ou CcmC. Dans ce but, deux techniques de type double hybride ont été employées. Dans la suite de ces travaux, AtNAP10 sera nommé AtCCMA.

1.1. Étude de la composition du transporteur ABC par double hybride

« split-ubiquitin »

1.1.1. Conception des constructions

La technique de clonage employée utilise la recombinaison *in vivo* dans une cellule de levure permettant d'insérer avec précision la séquence clonée dans un vecteur. Les séquences codant pour les protéines AtCCMA, AtCcmB et AtCcmC ont été introduites dans les vecteurs split-ubiquitin pMetYCGate, pXNGate et pNXgate (Obrdlik *et al.*, 2004) (Fig. 15). Ces constructions expriment ces protéines fusionnées à la partie C ou N-terminale de l'ubiquitine.

1.1.2. Contrôles du test split-ubiquitin

Les contrôles concernant les tests d'interaction split-ubiquitin ont pour but de vérifier l'absence de deux biais expérimentaux : l'auto-activation des protéines de fusion exprimées et leur orientation incompatible au test d'interaction dans les membranes biologiques de la levure.

Le résultat du test d'interaction est représenté en figure 19. Il s'est avéré que les constructions AtCcmB-Cub-PLV et AtCcmC-Cub-PLV sont capables d'auto-activer la transcription des gènes rapporteurs. En effet, dans les contrôles négatifs, les levures cotransformées avec les plasmides exprimant les protéines de fusion AtCcmB-Cub-PLV ou AtCcmC-Cub-PLV d'une part et avec le vecteur vide Nub-X d'autre part, sont capables de croître sur milieu DO-LWAH. Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait que ces protéines de fusion, bien qu'ayant chacune une topologie prédite de six domaines transmembranaires, ne soient pas toutes ancrées dans la membrane lorsqu'elles sont exprimées chez la levure. Dans ce cas, le facteur de transcription PLV est rattaché à une protéine au comportement soluble et peut traverser la paroi nucléaire afin d'activer les gènes rapporteurs. Il est aussi possible que la protéine exprimée soit clivée par des protéases de la levure et entraîne le relargage du facteur de transcription. Il peut également arriver que ces faux positifs soient la conséquence de mutations actives spontanées dans les promoteurs des gènes rapporteurs.

Par contre, les contrôles concernant AtCCMA sont satisfaisants. Les levures cotransformées avec les différentes constructions comportant le gène codant pour la protéine AtCCMA ainsi que le vecteur vide approprié ne poussent pas sur le milieu DO-LWAH.

Des contrôles d'expression par immunodétection utilisant des anticorps dirigés contre le facteur de transcription PLV (exprimé avec les protéines fusionnées avec Cub) et l'étiquette HA (exprimé avec les protéines fusionnées avec Nub) ont été réalisés. Malheureusement, seules des reconnaissances aspécifiques ont été détectées, ce qui laisse penser que les protéines de fusions sont faiblement exprimées.

1.1.3. Test d'interaction AtCCMA, AtCcmB et AtCcmC

Interactions entre les protéines AtCCMA d'une part et AtCcmB, AtCcmC d'autre part

Comme mentionné précédemment, les constructions AtCcmB-Cub et AtCcmC-Cub entraînent l'activation des gènes rapporteurs en présence de la contrepartie Nub vide.

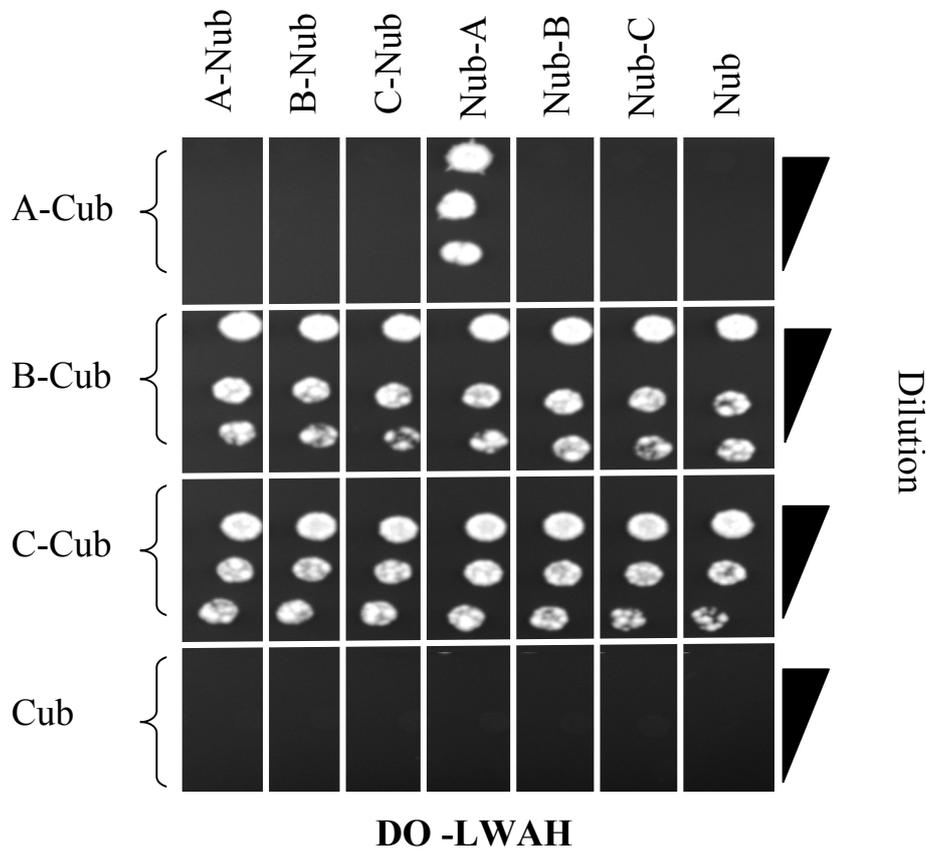


Figure 19 : Résultat du test d'interaction split-ubiquitin, suivi par l'activation des gènes rapporteurs *ADE2* et *HIS3*, entre AtCCMA, AtCcmB et AtCcmC. Les constructions A-Cub, B-Cub et C-Cub correspondent respectivement aux protéines AtCCMA, AtCcmB et AtCcmC fusionnées avec la partie C-terminale de l'ubiquitine. De même, A-Nub, B-Nub et C-Nub correspondent respectivement aux protéines AtCCMA, AtCcmB et AtCcmC fusionnées en leur partie C-terminale avec la partie N-terminale de l'ubiquitine. Nub-A, Nub-B et Nub-C correspondent à la partie N-terminale de l'ubiquitine fusionnée respectivement aux protéines AtCCMA, AtCcmB et AtCcmC. Les constructions Cub et Nub correspondent aux vecteurs « split-ubiquitin » non recombinés et constituent les contrôles négatifs. Les dépôts sont effectués sur un milieu DO -LWAH et correspondent à des dilutions de 0,1, 0,01 et 0,001 unités de DO.

Logiquement, cette activation est donc également observée pour les tests d'interaction de ces constructions avec les protéines AtCCMA, AtCcmB et AtCcmC fusionnées avec la partie Nub (Fig. 19). Aucune interaction n'a été détectée entre AtCCMA-Cub d'une part et AtCcmB et AtCcmC fusionnées à Nub d'autre part. Ceci est peut-être dû à un problème de repliement ou de mauvaise orientation dans la membrane des différentes protéines de fusion exprimées dans la levure. Il n'est donc pas possible de tirer de conclusions concernant ces combinaisons de tests d'interaction.

Interactions détectées avec les protéines AtCCMA

La seule interaction positive détectée est l'interaction d'AtCCMA-Cub avec Nub-AtCcmA (Fig. 19). Par contre, aucune interaction n'a été détectée entre AtCCMA-Cub et AtCcmA-Nub.

Ces résultats sont en faveur de l'hypothèse qu'AtCCMA corresponde à la partie de liaison à l'ATP (NBD) du transporteur ABC. En effet, il est prouvé que ce type de domaine agit en dimère en configuration « tête-bêche » (Mourez *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 2002). Dans ce cas de figure, on peut imaginer que l'interaction entre les différentes protéines de fusion comprenant AtCCMA ne puisse s'effectuer que dans une orientation particulière pour des raisons d'encombrement.

1.2.Étude de la composition du transporteur ABC par double hybride classique

N'ayant pu détecter d'interactions entre AtCCMA, AtCcmB et AtCcmC, une autre technique de type double hybride a été employée. Ce type de test double hybride utilise la reconstitution du facteur de transcription Gal4 pour l'activation des gènes rapporteurs.

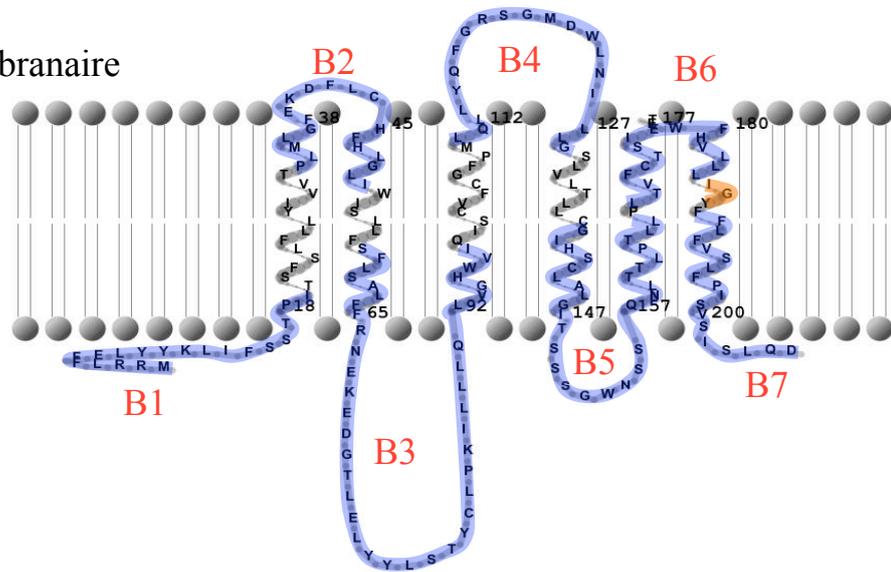
1.2.1. Conception des constructions

Comme mentionné précédemment, la technique du double hybride classique exclue les tests d'interaction de protéines ayant des domaines hydrophobes comme cela est le cas pour les protéines AtCcmB et AtCcmC, chacune ayant 6 domaines transmembranaires.

AtCcmB

Espace intermembranaire

Matrice



AtCcmC

Espace intermembranaire

Matrice

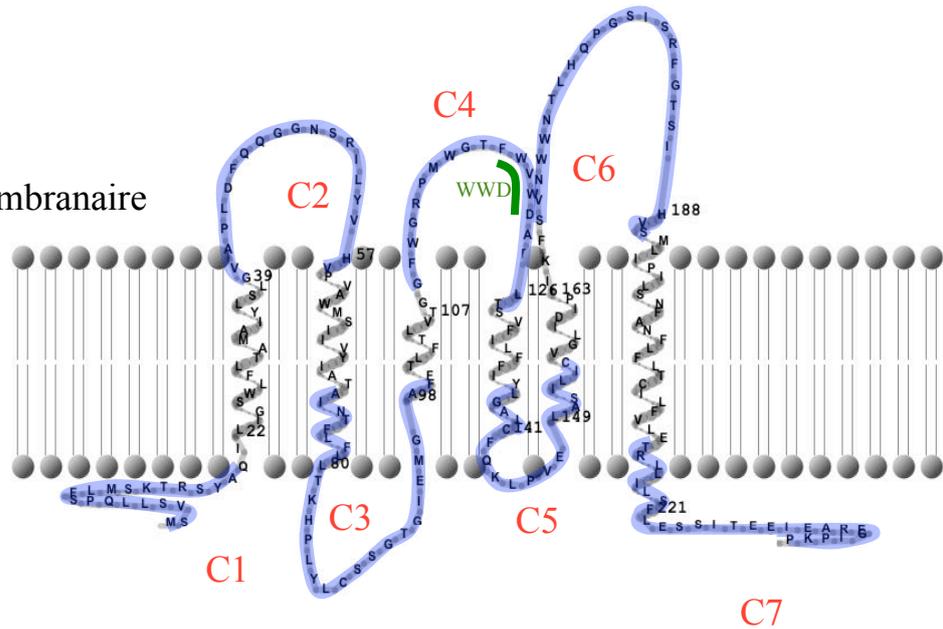


Figure 20 : Topologie prédite des protéines AtCcmB et AtCcmC. Les domaines clonés pour les tests double hybride Gal4 sont surlignés en bleu. Le domaine commun à deux clonages est surligné en orange. Le motif conservé WWD est indiqué en vert.

La topologie de ces protéines a été déterminée en accord avec leur profil d'hydrophobicité via le programme DAS (Dense Alignment Surface, <http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS/maindas.html>) ainsi qu'avec des données expérimentales sur le sujet. Entre autres les manipulations effectuées par Goldmann *et al* (Goldman *et al.*, 1998) qui ont permis de déterminer la topologie des protéines CcmB et CcmC de la bactérie *R. capsulatus* en fusionnant le gène *phoA* et *lacZ* en différentes positions et en étudiant leurs activités enzymatiques respectives. Chez les bactéries, la phosphatase alcaline, codée par le gène *phoA*, est souvent utilisée comme un indice topologique des protéines membranaires. En effet, la phosphatase alcaline a une activité enzymatique élevée dans le périplasme. Une activité *phoA* élevée indique qu'elle est insérée dans un domaine situé du côté externe de la membrane. En se basant sur ces informations, seuls les domaines prédits extra-membranaires ont été clonés (Fig. 20).

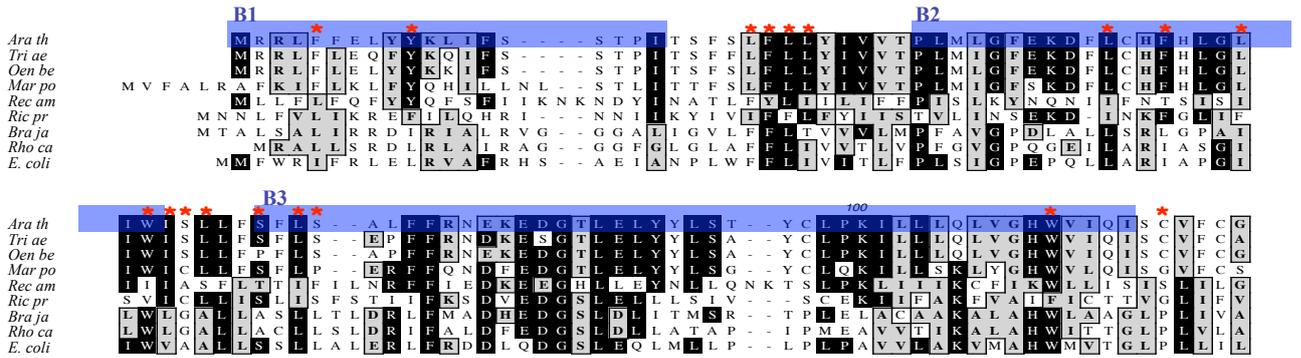
Choix des séquences à cloner

En vue d'un test d'interaction, les séquences codant pour les domaines extramembranaires d'AtCcmB et AtCcmC et la totalité de la protéine AtCCMA ont été clonés. Cette étude d'interaction pourrait nous indiquer si AtCCMA peut effectivement interagir avec AtCcmB et AtCcmC et nous renseignerait aussi sur l'importance relative des différents domaines impliqués dans cette interaction. La comparaison de la séquence d'AtCcmB avec les séquences homologues d'autres organismes, en particulier la bactérie *E. coli* (Fig. 21) nous indique que des résidus strictement conservés sont présents dans certains domaines extramembranaires, en particulier le domaine 3 d'AtCcmB et le domaine 4 d'AtCcmC. Il est possible que certains de ces résidus aient une importance pour l'interaction avec AtCCMA.

Nous avons amplifié la séquence codant pour la protéine AtCCMA entière (soit 691 pb) et 14 fragments différents correspondant aux séquences codant pour les domaines extramembranaires d'AtCcmB et AtCcmC (sept domaines chacun) additionnés à des morceaux d'hélice transmembranaire pour les domaines hydrophiles trop courts (Fig. 20).

L'ARNm du gène *CcmC* d'*Arabidopsis* est maturé en amont du codon stop de la phase codante, entre les bases U720 et U730 de la séquence codante (Raczynska *et al.*, 2006). Ces résultats ont été confirmés par hybridation northern et cRT-PCR. Le fragment C7, représentant le domaine C-terminal extramembranaire d'AtCcmC, correspond donc à la séquence de A640 à T717 du gène codant pour un domaine de 26 acides aminés.

A



B

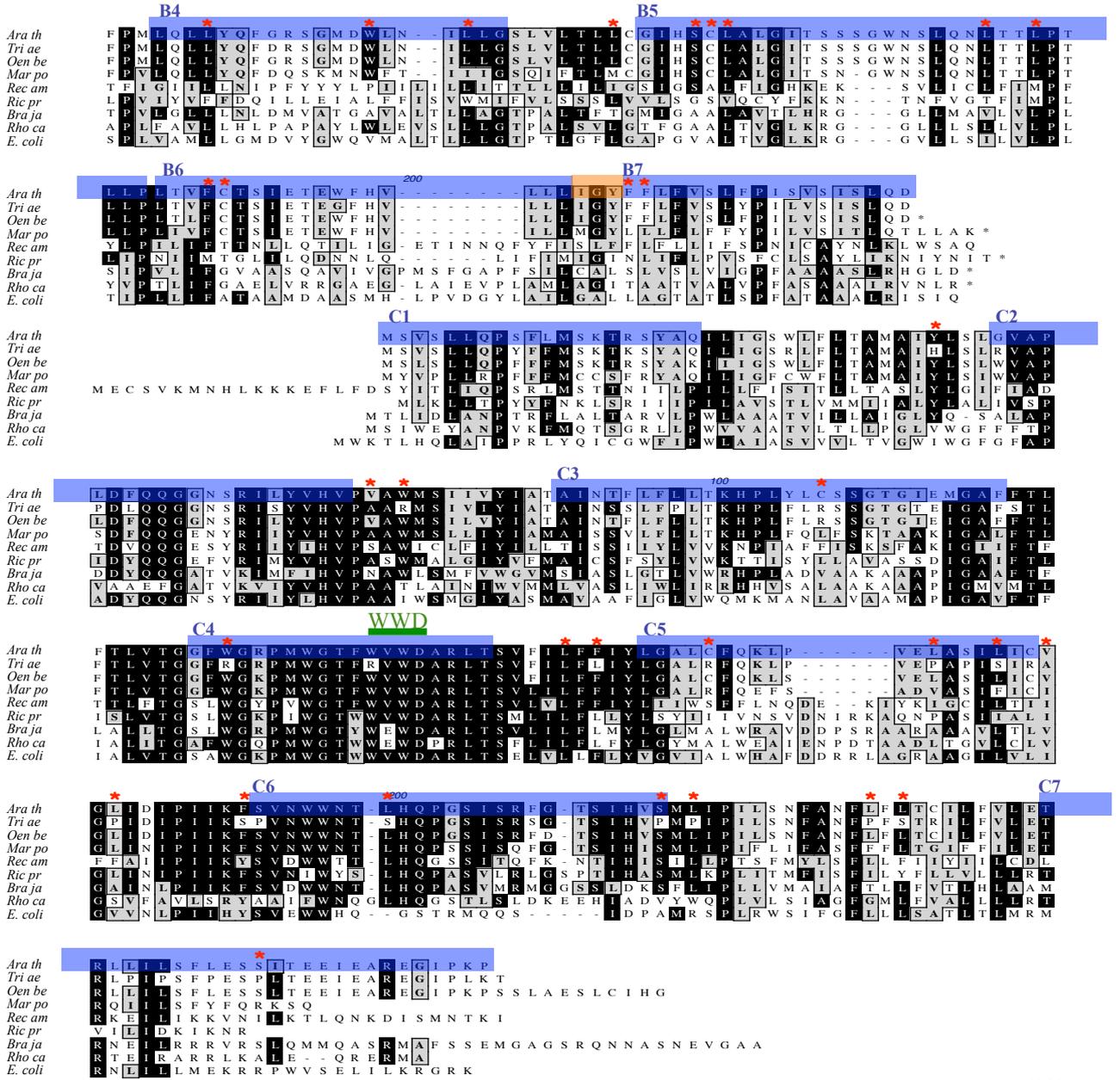


Figure 21 : Alignement des séquences protéiques de AtCmB (A) et AtCmC (B) provenant de différents organismes. Les astérisques rouges indiquent les acides aminés issus d'un codon édité. Les régions clonées pour le double hybride sont surlignées en bleu. La région commune à deux fragments clonés est surlignée en orange. Le domaine riche en tryptophane WWD est indiqué en vert.

Ara th : *Arabidopsis thaliana* ; *Tri ae* : *Triticum aestivum* ; *Oen be* : *Oenothera berteriana* ;
Mar po : *Marchantia polymorpha* ; *Rec am* : *Reclinomonas americana* ; *Ric pr* : *Rickettsia prowazekii* ;
Bra ja : *Bradyrhizobium japonicum* ; *Rho ca* : *Rhodobacter capsulatus* ; *Mar po* : *Marchantia polymorpha* ;
E. coli : *Escherichia coli*

Les clones comportant l'insert codant AtCCMA ou un domaine d'AtCcmB ou AtCcmC sont identifiés par PCR. Leurs ADN plasmidiques sont extraits et vérifiés par séquençage, en particulier pour vérifier que les ADNc codant AtCcmB et AtCcmC correspondent bien à des transcrits complètement édités.

Fragment cloné	Domaine codé	Taille du domaine (en acide aminé)
AtCCMA	M1 à S229	229
AtCcmB1	M1 à I19	19
AtCcmB2	P33 à W52	20
AtCcmB3	P58 à I100	43
AtCcmB4	L110 à G129	20
AtCcmB5	G138 à P167	30
AtCcmB6	L168 à Y188	21
AtCcmB7	I186 à D206	21
AtCcmC1	M1 à Q20	20
AtCcmC2	G39 à V58	20
AtCcmC3	A72 à F99	28
AtCcmC4	G109 à T127	19
AtCcmC5	L137 à C155	19
AtCcmC6	S167 à S190	24
AtCcmC7	T214 à P239	26

1.2.2. Construction des plasmides de destination

Les vecteurs pGADT7 et pGBKT7 (originellement produit par Clontech™) utilisés comme vecteur de destination ont été modifiés par l'insertion d'une cassette de clonage Gateway au niveau du site de restriction *Sma I* (Dieterle *et al.*, 2005). Une recombinaison effectuée avec pGADT7 ou pGBKT7 fusionnera la séquence d'intérêt, ici la séquence codant pour la protéine AtCCMA et les séquences codant pour les domaines extramembranaires

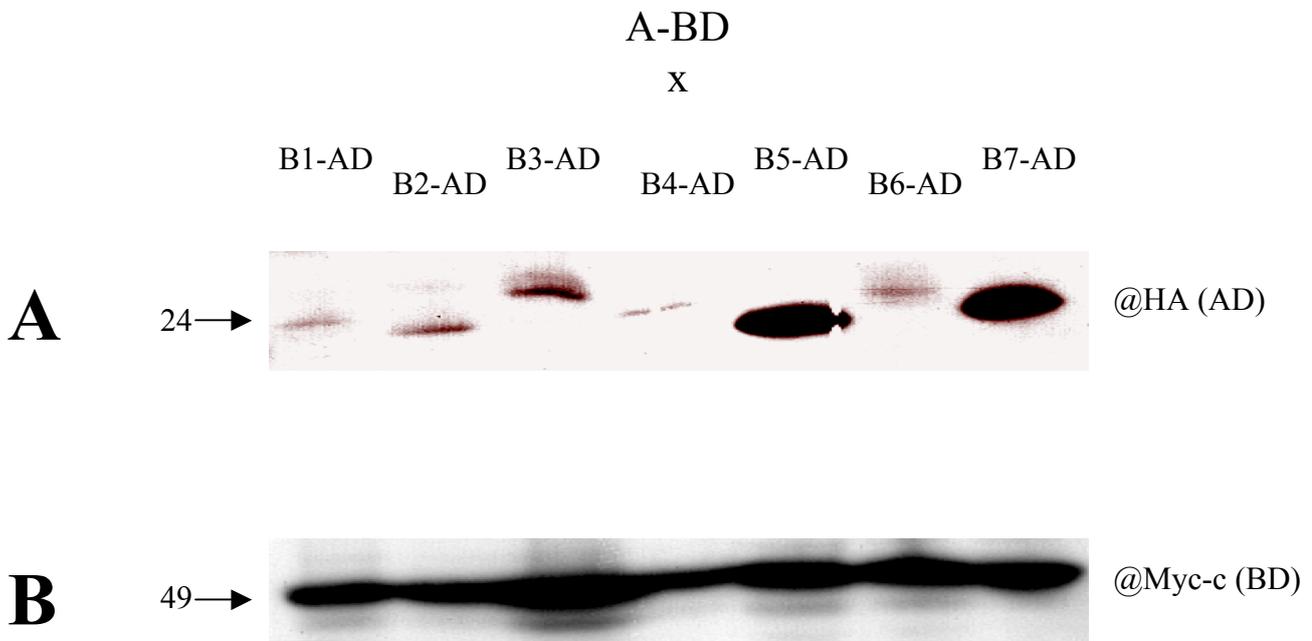


Figure 22 : Western blot effectué sur des extraits de protéines totales issues de cultures de levures cotransformées avec les constructions double hybride AtCCMA-AD d'une part et AtCcmB1-BD à AtCcmB7-BD d'autre part. Les tailles sont indiquées en kDa.

A, Détection de l'étiquette HA présente sur les protéines de fusion avec le domaine d'activation AD. Ici, détection des protéines de fusion AtCcmB1 à AtCcmB7-AD (Respectivement de taille 23,5 ; 23,5 ; 26,5 ; 24 ; 25,5 ; 24,5 et 24,5 kDa). La bande à 24 kDa du marqueur de taille est indiquée.

B, Détection de l'étiquette Myc-c présente sur les protéines de fusion avec le domaine de liaison à l'ATP BD. Ici, la protéine de fusion AtCCMA-BD d'une taille de 49 kDa, est indiquée.

hydrophiles de la protéine AtCcmB (AtCcmB1 à 7) et AtCcmC (AtCcmC1 à 7), avec les séquences codant respectivement pour le domaine AD ou BD du facteur de transcription du promoteur Gal4.

Le produit de la recombinaison est transformé par électroporation ou choc thermique dans des cellules DH5 α puis étalé sur des boîtes LB ampicilline ou LB kanamycine suivant la nature du vecteur de destination (respectivement pGADT7 et pGBKT7). La présence de l'insert est vérifiée par PCR et par séquençage avec une amorce spécifique du promoteur T7. Une fois la séquence du clone confirmée, l'ADN plasmidique correspondant est extrait. 30 clones ont été obtenus, nommés AtCCMA-AD, AtCCMA-BD, CcmB1 à 7-AD, CcmB1 à 7-BD, CcmC1 à CcmC7-AD et CcmC1 à CcmC7-BD.

1.2.3. Contrôles du test d'interaction en double hybride classique

Différents contrôles ont été effectués afin de vérifier l'expression des constructions dans la levure et l'absence d'auto-activation des gènes rapporteurs.

La présence des constructions clonées selon la technique Gateway dans les levures transformées est été vérifiée par PCR.

L'expression de ces constructions a été vérifiée par immunodétection des étiquettes HA (portées par les protéines fusionnées à AD) et c-Myc (portées par les protéines BD). Les protéines de fusions comportant AtCCMA et les différents domaines d'AtCcmB sont bien exprimées et les bandes correspondant aux tailles attendues sont retrouvées sur le western blot (Fig. 22). Concernant l'expression des domaines d'AtCcmC, les tests d'expression n'ont pu être effectués de manière satisfaisante.

Des contrôles ont été effectués afin de vérifier que l'activation du facteur de transcription Gal4 n'est pas artefactuelle, ce qui serait dû par exemple à une reconnaissance entre la protéine ou domaine protéique testé et la partie AD ou BD du facteur de transcription. Des cotransformations de cellules de levures ont été effectuées pour l'ensemble des constructions finales obtenues, soit toutes nos séquences fusionnées soit à l'AD ou BD, avec les vecteurs correspondant vides (ex : CCMA-AD + BD ; CcmB1-BD + AD etc...). Le résultat de ces contrôles étant négatif (Fig. 23) cela confirme que ces constructions sont utilisables pour tester l'interaction entre AtCCMA et les différents domaines d'AtCcmB et d'AtCcmC.

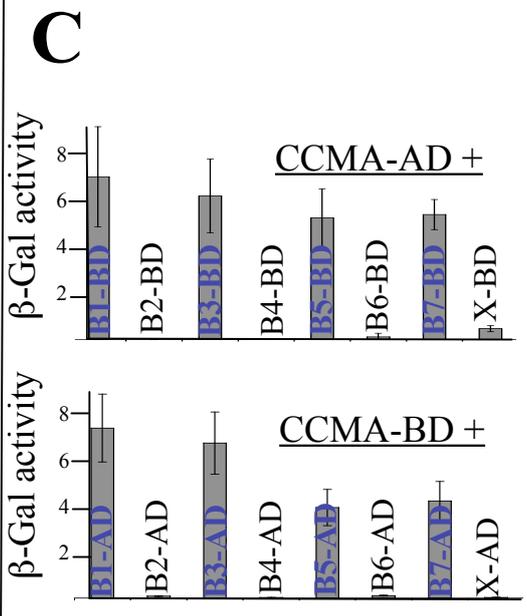
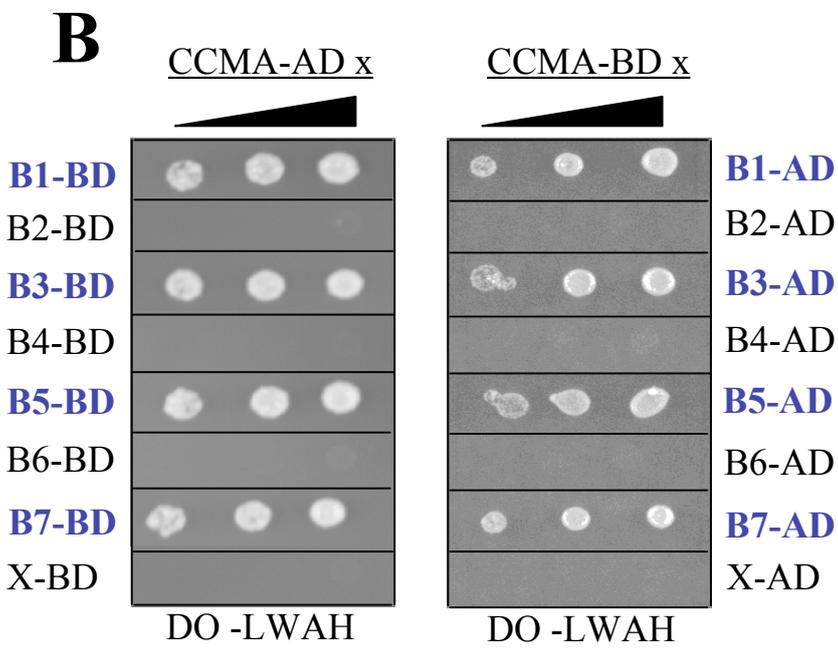
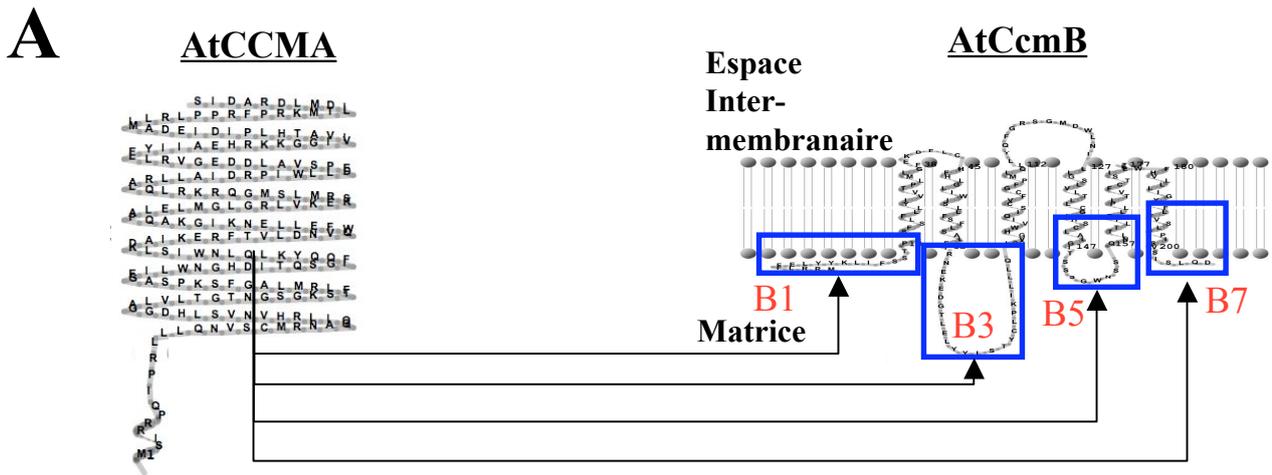


Figure 23 : Analyse par la technique du double hybride dans la levure de l'interaction entre AtCCMA et AtCcmB.

A, Représentation schématique d'AtCCMA et de la topologie d'AtCcmB. Les domaines d'AtCcmB encadrés en bleu sont ceux interagissant avec AtCCMA.

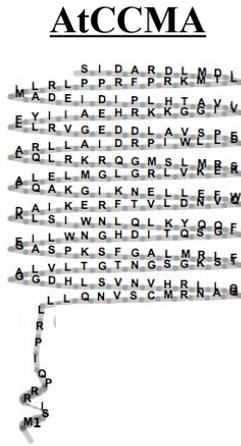
B, La protéine AtCCMA et les sept domaines hydrophiles de AtCcmB ont été fusionnés avec la partie AD ou BD du facteur de transcription Gal4. Ces constructions ont été transformées dans la levure. Les doubles transformants sont déposés selon différentes dilutions (de 1 à 100 fois en partant de la gauche) sur un milieu DO -LWAH qui teste l'activation des gènes rapporteurs *ADE2* et *HIS3*.

C, Test d'activité β-galactosidase par l'utilisation du substrat o-NPG. L'activité β-Galactosidase est mesurée en unité (1 unité = 1 nmol/min). Les valeurs présentées correspondent à la moyenne de l'activité β-galactosidase mesurée sur deux colonies indépendantes provenant de la même cotransformation. Les contrôles négatifs ont été obtenus en transformant les levures avec les constructions AD ou BD avec le vecteur vide complémentaire pGBK ou pGAD.

1.2.4. Test d'interaction entre AtCCMA et AtCcmB

Une série de tests d'interaction entre AtCCMA et AtCcmB1 à 7 a été effectuée. Les levures poussant sur les milieux sélectifs DO-LWAH correspondent à celles cotransformées avec les plasmides comportant AtCCMA-AD/BD d'une part et AtCcmB1, 3, 5 et 7-BD/AD d'autre part (Fig 23 B et C). Cela montre qu'AtCCMA peut interagir avec les domaines extramembranaires d'AtCcmB dont on prédit une orientation vers la matrice mitochondriale.

Ce résultat est cohérent avec la topologie prédite de la protéine AtCcmB (Fig. 23 A). Ce résultat est aussi en accord avec les études de localisation d'AtCCMA (Rayapuram, 2003). En effet il a été démontré par des expériences d'import *in vitro* dans la mitochondrie et par des immunodétections sur différentes fractions subcellulaires et mitochondriales qu'AtCCMA est associée à la membrane interne mitochondriale sur la face orientée vers la matrice (cf. partie 3.6.1 de l'introduction).

A

Espace
Inter-
membranaire

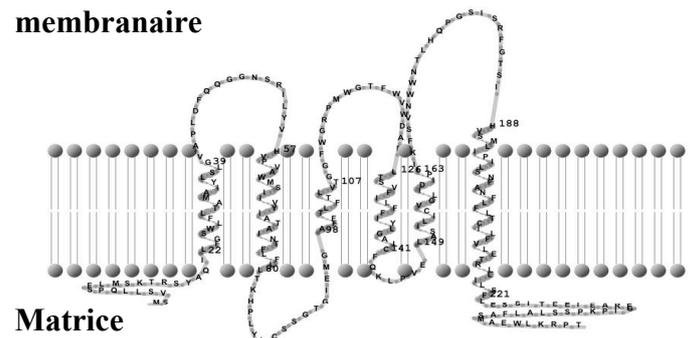
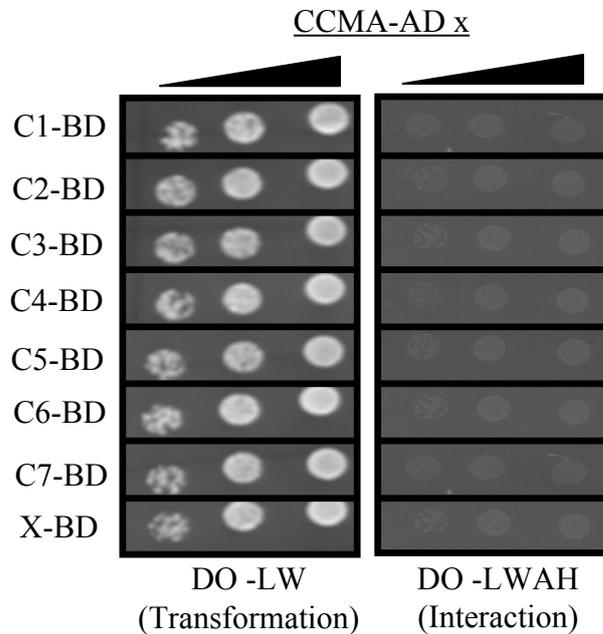
AtCcmC**B**

Figure 24 : Analyse par la technique du double hybride dans la levure de l'interaction entre AtCCMA et AtCcmC.

A, Représentation schématique d'AtCCMA et de la topologie d'AtCcmC.

B, La protéine AtCCMA et les sept domaines hydrophiles d'AtCcmC ont été fusionnés avec la partie AD ou BD du facteur de transcription Gal4. Ces constructions ont été transformées dans la levure. Seule la combinaison A-AD contre B1 à B7-BD est présentée ici, l'autre combinaison ayant donné des résultats identiques. Les doubles transformants sont déposés selon différentes dilutions (de 1 à 100 fois en partant de la droite) sur milieu DO -LW (permettant de sélectionner les levures ayant assimilé les deux constructions AD et BD) sur un milieu DO -LWAH (permettant de tester l'activation des gènes rapporteurs *ADE2* et *HIS3*).

1.2.5. Test d'interaction entre AtCCMA et AtCcmC

Une série d'expériences similaires à la précédente a été effectuée pour tester l'interaction entre les protéines AtCCMA et AtCcmC. L'ADN plasmidique codant pour AtCCMA et pour les parties hydrophiles d'AtCcmC, toutes fusionnées à AD ou BD, est transformé dans des cellules de levures. Ces cellules sont ensuite étalées sur milieu DO-LWAH.

Aucune des colonies transformées n'a poussé sur le milieu de sélection DO-LWAH (Fig. 24). Ceci suggère que la technique du double hybride ne permettrait pas de détecter une interaction entre AtCCMA et les domaines extramembranaires AtCcmC1 à 7. Toutefois, les tests d'expression des différents domaines d'AtCcmC n'ayant pu être réalisés, il ne nous est pas encore possible de conclure.

1.2.6. Conclusions

Les tests d'interactions double hybride classique et split-ubiquitin nous ont appris que :

- Des interactions sont détectées entre AtCCMA et les domaines extramembranaires orientés spécifiquement du côté de la matrice d'AtCcmB.
- Nous n'avons pas pu montrer d'interaction entre AtCCMA et AtCcmC.
- AtCCMA est capable d'interagir avec elle-même

Ces résultats confirment qu'AtNAP10 correspond bien à AtCCMA, soit la partie de liaison à l'ATP du transporteur ABC étudié. Si nous confirmons la détection d'interactions spécifiques de cette protéine avec AtCcmB mais non avec AtCcmC, cela sera en faveur d'un transporteur ABC de stœchiométrie A_2B_2 semblable à un modèle proposé de ce transporteur chez les bactéries (Page et Ferguson, 1999; Schulz *et al.*, 1999).

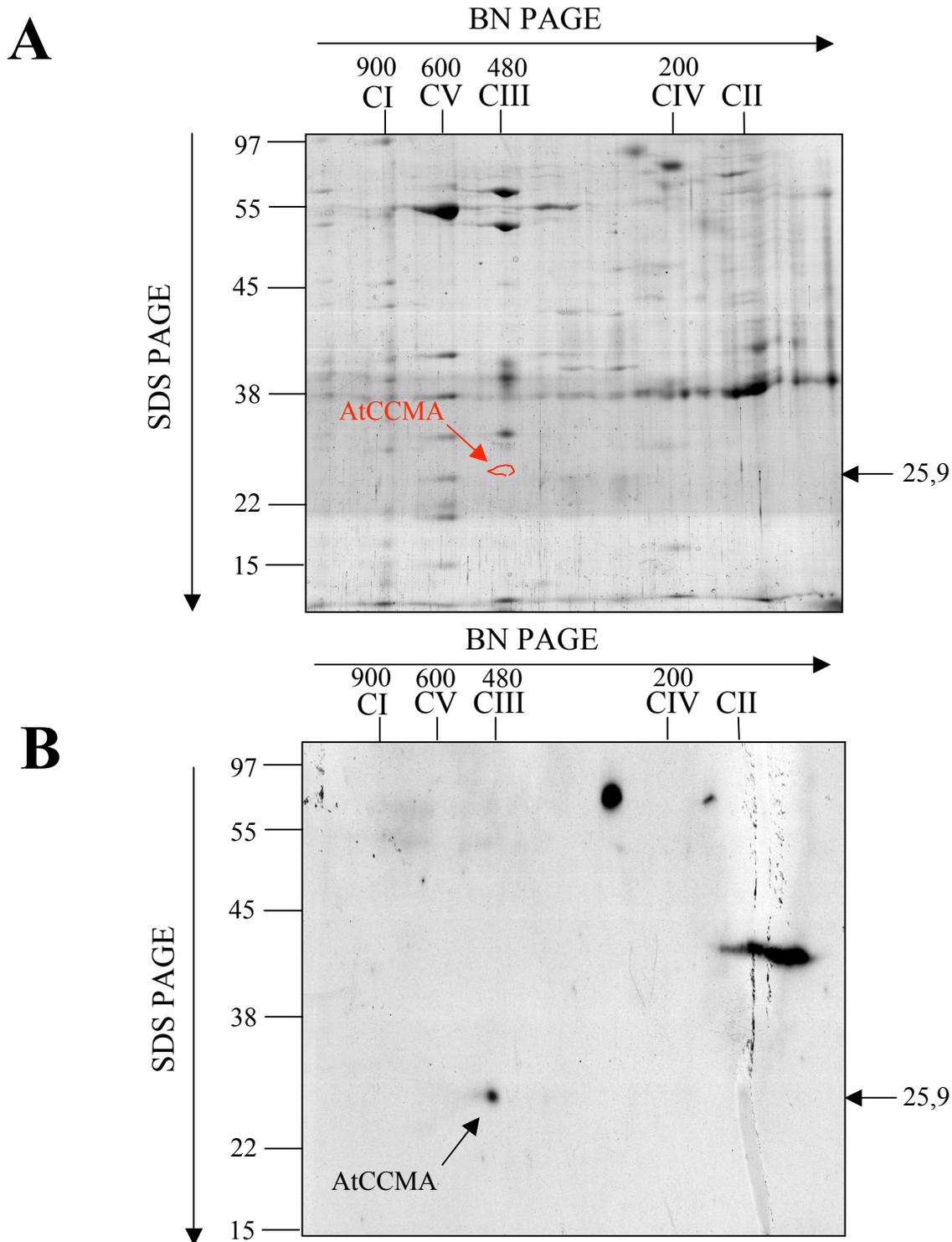


Figure 25 : Séparation en deux dimensions des protéines membranaires de mitochondries d'*Arabidopsis* selon la taille des complexes sur gel bleu natif (BN PAGE) et selon la taille des protéines sur gel SDS PAGE 12%. Les flèches indiquent la taille attendue d'AtCCMA. Les tailles indiquées sont exprimées en kDa.

A, Gel BN-SDS PAGE bidimensionnel coloré avec une solution colloïdale de bleu de Coomassie. CI à CV indiquent les complexes I à V de la chaîne respiratoire avec leurs tailles respectives.

B, Le gel BN-SDS PAGE en A transféré sur une membrane et immunodétecté par des anticorps anti-CCMA. La protéine AtCCMA est détectée dans un complexe de 480 kDa, taille identique au complexe III de la chaîne respiratoire.

1.3. Étude du complexe protéique comprenant AtCCMA par électrophorèse de type bleu natif

1.3.1. Détection d'AtCCMA

La présence d'AtCCMA et d'AtCcmB dans un même complexe renforcerait et élargirait les conclusions tirées des expériences du double hybride. Pour cela nous avons utilisé l'électrophorèse de type bleu natif.

Concrètement, 5 mg de mitochondries ont été extraits à partir de 100 g de cellules d'*Arabidopsis thaliana*. Après fractionnement, nous avons obtenu 3 mg de protéines mitochondriales membranaires. Pour la séparation en 1^{ère} dimension (BN-1D), 6 pistes ont été préparées sur le gel de polyacrylamide non dénaturant, soit 500 µg par piste. Une fois les complexes séparés, on sépare les sous-unités des complexes en 2^{ème} dimension sur un gel dénaturant SDS PAGE. Le gel bidimensionnel ainsi obtenu est coloré (Fig. 25 A) et d'autres gels similaires sont transférés sur des membranes de PVDF. Le transfert effectué, la membrane est utilisée pour une immunodétection de type western avec un anticorps dirigé contre la protéine AtCCMA. L'anticorps a été produit avec la séquence complète d'AtCCMA fusionné avec une étiquette His (Rayapuram, 2003). On détecte sur la membrane un signal de 25,9 kDa, taille qui correspond à la taille calculée d'AtCCMA. Un signal est également détecté au même niveau que le complexe III de la chaîne respiratoire, soit 480 kDa (Fig. 25 B). L'anticorps anti-AtCCMA détecte aussi deux signaux à 40 et 55 kDa. Des études précédentes (Rayapuram, 2003) indiquent que le signal à 25,9 kDa est bien le signal correspondant à AtCCMA et que les autres signaux correspondent vraisemblablement à des reconnaissances croisées.

1.3.2. Détection d'AtCcmB

Nous avons ensuite incubé la même membrane avec un autre anticorps dirigé contre le peptide SEPFFRNDKESGTLELY de la protéine TaCcmB de blé (Faivre-Nitschke *et al.*, 2001) (ce peptide correspond chez *Arabidopsis* au domaine extramembranaire B3) dans le but

de détecter cette protéine dans le même complexe qu'AtCCMA. Toutefois ces anticorps n'ont pas permis de détecter un signal chez *Arabidopsis* (Résultats non présentés). La mauvaise spécificité de l'anticorps anti-CcmB utilisé pourrait s'expliquer par le fait qu'il ait été conçu contre la protéine TaCcmB provenant du blé. Bien que très similaires, les deux protéines diffèrent de 16 acides aminés (soit 92,7% d'identité). Plus particulièrement, l'épitope de blé et d'*Arabidopsis* utilisé pour faire l'anticorps diffèrent de quatre résidus sur 17.

D'autres anticorps polyclonaux dirigés contre des peptides d'AtCcmB ont été produit, mais ne se sont pas avérés spécifiques, même après purification.

Toutefois, si cette expérience se révélait en accord avec les résultats attendus, soit AtCCMA et AtCcmB se situant au niveau d'un même complexe, elle ne suffirait pas à elle seule pour prouver une interaction directe entre ces deux protéines.

1.3.3. Caractérisation du complexe protéique de 480 kDa

Bien que les résultats de l'analyse BN-PAGE ne permettent pas de conclure qu'AtCCMA et AtCcmB sont présents dans un même complexe, elle identifie AtCCMA comme un des éléments d'un complexe protéique d'une taille correspondant celle du complexe III, soit 480 kDa.

Le bleu natif nous apprend qu'AtCCMA fait partie d'un complexe de 480 kDa. Cette taille est trop élevée pour ne comporter que le seul transporteur ABC. En effet, avec les protéines AtCCMA (25,9 kDa) et AtCcmB (23,6 kDa), un transporteur ABC de stoechiométrie A_2B_2 aurait une masse moléculaire de 99 kDa. On peut avancer différentes hypothèses quant à la nature de ce complexe. Il ne peut s'agir du complexe d'assemblage des cytochromes *c* comprenant une partie des protéines CCM déjà caractérisées. En effet, d'autres protéines CCM, AtCcmF_{N1}, F_{N2}, F_C et AtCCMH ont été détectées dans un complexe plus grand que le complexe III (Meyer *et al.*, 2005; Rayapuram *et al.*, 2008), impliquant ainsi que les protéines CCM font partie d'au moins deux complexes différents. On peut avancer l'hypothèse que le complexe de 480 kDa soit impliqué dans la livraison de l'hème et que l'autre, de 500 kDa, soit impliqué dans la liaison de l'hème à l'apocytochrome.

480 kDa correspondant également à la taille du complexe III, il est possible que le transporteur ABC des ccm soit associé de manière transitoire à ce complexe. Cette hypothèse pourrait avoir du sens quand on prend en compte que le complexe III comporte le cytochrome *c*₁ et que le cytochrome *c* transporte les électrons du complexe III au complexe IV de la

chaîne respiratoire. Il est ainsi possible que les protéines impliquées dans l'assemblage du cytochrome *c* et du cytochrome *c₁* puissent être proches du lieu d'activité des cytochromes *c* et *c₁*.

Bien que ces résultats ne permettent pas d'établir la stœchiométrie exacte des protéines ccm, ils représentent des indices précieux concernant leur association et leurs partenaires potentiels.

1.4. Étude *in vivo* de AtCCMA

L'étude fonctionnelle d'AtCCMA a également consisté à étudier par génétique inverse les effets *in planta* d'une mutation de son gène.

1.4.1. Identifications des mutants *Atccma*

Par recherche dans les banques de données, cinq séquences FST (Flanking Sequence Tag) correspondant à *AtCCMA* ont été identifiées (Fig. 26). Deux de ces séquences, BZ353635 et BH250867 (correspondant respectivement aux lignées SALK_120966 et SALK_010633 renommées « AS1 » et « AS2 »), proviennent de mutants de la banque de mutants d'insertion d'ADN-T construite par le SALK Institute (La Jolla, USA). Les deux autres, 250C11 et 511F01 (correspondant respectivement aux lignées DRC29 et EGU279) renommées « Digi » et « Charat »), proviennent de l'INRA de Versailles. Pour construire cette banque, le SALK Institute a utilisé des plantes d'*Arabidopsis thaliana* écotype *Columbia* (*Col*) qui ont été transformées avec un ADN-T portant le gène *npt2* qui apporte une résistance à la kanamycine ainsi qu'une unité promoteur 35S-terminateur NOS. De son côté, la banque de l'INRA de Versailles a utilisé des plantes d'*Arabidopsis thaliana* écotype *Wassilievskija* (*WS*) qui ont été transformées avec un ADN-T portant deux marqueurs de sélection dérivés du pGSFR280 (Feitsma *et al.*, 1987) qui confèrent une résistance à l'antibiotique kanamycine et à l'herbicide Basta (phosphinothricine) (Fig. 13).

1.4.2. Analyse des locus d'insertion

Les deux mutants Charat et Digi possèdent un ADN-T inséré dans la phase codante du gène *AtCCMA*. Les deux autres mutants identifiés, AS1 et AS2, possèdent chacun une insertion dans la région située en aval (pour AS1) ou en amont (pour AS2) de la phase codante du gène *AtCCMA* (Fig. 26). Les séquences bordant l'ADN-T ont été déterminées par séquençage de fragments de PCR. Pour cela une amorce située dans la bordure gauche de l'ADN-T conjointement avec des amorces spécifiques d'*AtCCMA* ont été utilisées (cf. Tableau des amorces utilisées en annexe). Aucune amplification n'a pu être obtenue par l'utilisation d'amorces spécifiques de la bordure droite. Ces différentes amplifications permettent également de déterminer le génotype de la plante concernant l'insertion d'ADN-T. Ces données, combinées avec le séquençage de ces fragments de PCR, nous ont permis de d'obtenir les informations suivantes :

- Les mutants Charat et Digi ont tous deux une insertion double d'ADN-T au même locus, soit au niveau du nucléotide +104 par rapport à l'ATG initiateur du gène *AtCCMA*. Cela malgré des informations différentes fournies par les banques de données. En effet, l'insertion de l'ADN-T de Digi était attendue au niveau du nucléotide +530. Il n'a pas été possible de déterminer avec certitude la séquence située entre ces deux insertions. Le séquençage des séquences nucléotidiques situées de part et d'autre de la double insertion indique la possibilité d'une excision d'un fragment d'ADN génomique de 20 nucléotides pour ces mutants.
- Les mutants AS1 et AS2 ont également chacun une double insertion d'ADN-T respectivement au niveau du nucléotide -180 et 819 par rapport à l'ATG initiateur du gène *AtCCMA*. De même que pour les mutants Charat et Digi, il n'a pas été possible de déterminer avec certitude la séquence située entre ces deux insertions. De la même manière, l'analyse des séquences indique la possibilité d'une excision d'un fragment d'ADN génomique de 48 nucléotides pour le mutant AS1 et de 13 nucléotides pour le mutant AS2.

- L'insertion d'ADN-T dans toutes les lignées de plantes étudiées est double et disposée en « tête-bêche ». La formation de tels concatémères est un événement fréquent lors de transformations de plantes (Feldmann, 1987).
- Aucune des plantes mutantes Charat et Digi analysées ne dispose d'un génotype homozygote pour l'insertion. Cette information est particulièrement importante et suggère fortement qu'une insertion dans le gène *AtCCMA*.

Pour les mutants Charat, l'insertion cause l'expression d'une protéine ayant une séquence protéique incorrecte à partir du 35^{ème} résidu. Cette plante mutante a été désignée comme la meilleure candidate pour l'interruption de l'expression exacte d'*AtCCMA*. En effet, l'insertion se trouve dans la partie 5' du gène, en amont des motifs importants pour la fonction de la protéine (motifs Walker A et B, motif signature des transporteurs ABC).

1.4.3. Analyse de la ségrégation

Les ADN-T qui ont servi pour la création des mutants portent le gène de résistance à la kanamycine. La ségrégation de ce caractère reflète celle de ou des insertions d'ADN-T et dépend du caractère essentiel ou non-essentiel du gène dans lequel l'ADN-T est inséré. En effet, dans le cas d'une insertion unique dans un gène non essentiel, on s'attend à ce que la descendance d'une plante hétérozygote pour l'insertion ait une ségrégation de type 3/4 de plantes résistantes, représentant les hétérozygotes et les homozygotes pour l'insertion, et 1/4 de plantes sensibles, représentant les plantes au génotype sauvage. Dans le cas d'une insertion unique dans un gène essentiel, on attend une ségrégation de type 2/3 de plantes résistantes, correspondant aux seuls hétérozygotes pour l'insertion, et 1/3 de plantes sensibles représentant les plantes au génotype sauvage.

Pour analyser la ségrégation de la résistance à la kanamycine, des graines issues de plantes hétérozygotes *AtCCMA/Atccma* ont été semées sur un milieu de germination contenant de la kanamycine. Les graines résistantes germent et des plantules se développent normalement. Les graines sensibles (ayant un génotype sauvage) germent normalement, les cotylédons s'ouvrent puis blanchissent rapidement et le développement de la plantule s'arrête. Des graines issues de plantes hétérozygotes ont été semées sur un milieu de germination

Plante	Génotype PCR /AtCCMA	Total	Non germé	Non germé/Total	Kan ^R	Kan ^S	Kan ^R /(Kan ^R +Kan ^S)	Kan ^S /(Kan ^R +Kan ^S)
WT	Sauvage	>200	0	0	0	>200	0%	100%
C1	Hétérozygote	612	352	58%	187	73	72%	28%
C4	Hétérozygote	253	61	24%	141	51	73%	27%
C5	Hétérozygote	293	41	14%	179	73	71%	29%
C6	Hétérozygote	751	115	15%	457	179	72%	28%
C13	Hétérozygote	772	475	62%	205	92	69%	31%
C6 - 13	Hétérozygote	46	6	13%	29	11	73%	28%
C6 - 16	Hétérozygote	69	5	7%	45	19	70%	30%
C6 - 17	Hétérozygote	65	18	28%	26	21	55%	45%

Figure 27 : Exemple de ségrégations de résistance à la kanamycine effectuées sur les descendants de la lignée Charat. Charat est une plante mutante ayant une insertion dans le gène *AtCCMA*. Les plantes C1, C4, C5, C6 et C13 correspondent à des plantes de génération T4. Les plantes C6-13, C6-16 et C6-17 correspondent aux descendants de la plante C6 et sont donc de génération T5.

La présence de nombreuses graines non germées et les ségrégations suggèrent qu'il existe plusieurs insertions dans le génome des plantes mutées.

contenant de la kanamycine. Après deux semaines, le nombre de plantes résistantes (Kan^R) et de plantes sensibles (Kan^S) est compté.

Aucun ratio proche de « 3/4 ; 1/4 » ni de « 2/3 ; 1/3 » n'a été retrouvé après avoir semé des quantités représentatives de graines sur des milieux de germination comportant de la kanamycine (Fig. 27). Par ailleurs nous avons observé pour certaines plantes un pourcentage très élevé de graines non germées. Ces observations suggèrent la présence de multiples insertions dans le génome des plantes mutantes.

Le génotype des plantes concernant *AtCCMA* a été déterminé par des PCR effectuées sur de l'ADN extrait de ces plantes. Au cours de ces expériences, aucun homozygote viable pour l'insertion dans le gène *AtCCMA* n'a été retrouvé, indiquant fortement le caractère essentiel du gène *AtCCMA*.

Afin de confirmer l'hypothèse de multiple insertions dans le génome des mutants, une hybridation Southern blot a été effectuée sur des descendants de génération T5 des plantes Charat (C6-13, C6-16, C6-17).

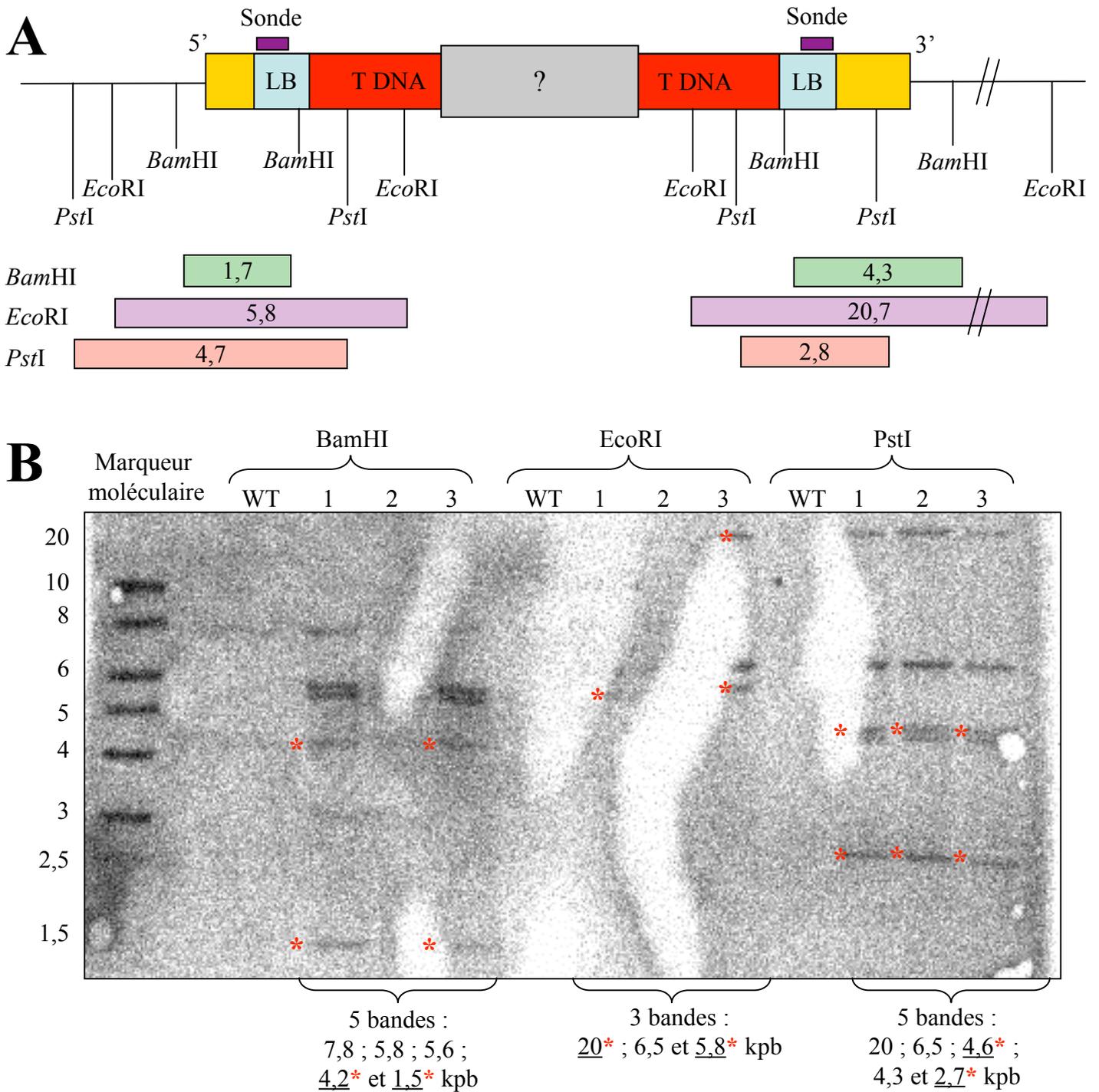


Figure 28 : Analyse par Southern blot de l'ADN de trois plantes mutantes d'insertion dans le gène AtCCMA. *A*, Cartographie du locus du gène AtCCMA tel qu'il est retrouvé dans la lignée Charat. La séquence exacte comprise entre les deux insertions tête-bêche est inconnue. Les sites de restriction utilisés pour le Southern sont indiqués. Les fragments obtenus par la digestion des enzymes de restriction *BamHI*, *EcoRI* et *PstI* et reconnus par la sonde sont également indiqués. *B*, Southern blot effectué sur l'ADN digéré de trois mutants d'insertion Charat (Notés 1, 2 et 3, correspondant respectivement aux plantes C6-13, C6-16 et C6-17). Le nombre et la taille en kDa des fragments reconnus par la sonde sont indiqués. Les fragments correspondants à ceux attendus sont indiqués par une astérisque (*).

1.4.4. Analyse du nombre d'insertion par Southern blot

Des fleurs des plantes C6-13, C6-16, C6-17, toutes de génération T5, descendantes de la lignée Charat et celles d'une plante WS sauvage, ont été récoltées. L'ADN contenu dans ces tissus a été extrait en utilisant la méthode d'extraction Plant DNAzol®. 12 µg de chaque échantillon est ensuite digéré par chaque enzyme de restriction choisie (*Pst*I, *Eco*RI et *Bam*HI).

La sonde est obtenue par une PCR effectuée avec le plasmide pDB10 en tant que matrice (pDB10 comporte un ADN-T ayant une bordure gauche à ceux des ADN-T utilisés par l'INRA de Versailles). L'utilisation d'un couple d'amorces spécifiques permet d'amplifier une séquence de 372 pb de la bordure gauche de l'ADN-T. La réaction de polymérisation intègre du α [³²P] dCTP marqué.

Utilisant les données obtenues par l'analyse du site d'insertion, une reconstitution du locus du gène *AtCCMA* avec la double insertion en tête-bêche a été réalisée (Fig. 28 A). Par l'analyse des sites de restriction, nous pouvons prévoir quels fragments seront hybridés lors du Southern.

Le résultat du Southern blot (Fig. 28 B), nous a fourni les informations suivantes :

- Les échantillons provenant des différentes plantes mutantes (C6-13, C6-16 et C6-17), toutes issues du même parent C6 hétérozygote *AtCCMA/Atccma*, présentent le même profil. Indiquant ainsi qu'elles possèdent toutes les mêmes insertions d'ADN-T au même endroit de leur génome.
- L'hybridation sur la digestion par l'enzyme *Bam*HI a révélé 5 bandes de taille 1,5 ; 4,2 ; 5,6 ; 5,8 et 7,8 kb. Seules les bandes de 1,5 et 4,2 kb correspondent à l'insertion dans *AtCCMA*.
- L'hybridation sur la digestion par l'enzyme *Eco*RI a révélé 3 bandes de taille 5,8 ; 6,5 et 20 kb. Seules les bandes de 5,8 et 12 kb correspondent à l'insertion dans *AtCCMA*.
- L'hybridation sur la digestion par l'enzyme *Pst*I a révélé 5 bandes de taille 2,7 ; 4,3 ; 4,6 ; 6,5 et 20 kb. Seules les bandes de 2,7 ; 4,6 et 12 kb correspondent à l'insertion dans *AtCCMA*.

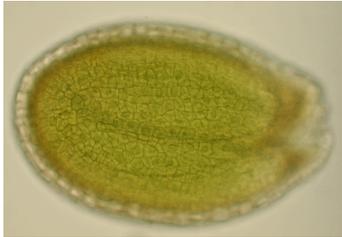
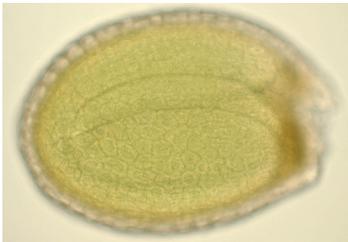
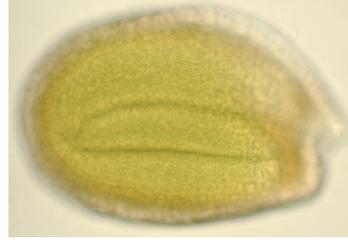
AParent hétérozygote
(*AtCCMA/Atccma*)**B**Parent homozygote complémenté
(*Atccma/Atccma* complémenté)**C**Parent sauvage
(*AtCCMA/AtCCMA*)

Figure 29 : Photographie des différents types d'embryons observés dans des siliques immatures en fonction du génotype du parent.

A, Embryons issus d'une plante hétérozygote *AtCCMA/Atccma*. Une proportion des embryons observés se développe normalement jusqu'à l'émergence des cotylédons (cliché de gauche) tandis que d'autres embryons sont bloqués au stade torpille (cliché de droite).

B, Embryon issu d'une plante homozygote *Atccma/Atccma* complémentée. Tous les embryons issus de ce type de plante présentent un phénotype semblable.

C, Embryon issu d'une plante sauvage.

Ces résultats confirment la présence d'au moins une autre insertion d'ADN-T dans les ADN étudiés. Ceci peut expliquer les ségrégations observées pour la résistance à la kanamycine.

1.4.5. Observation des siliques des plantes hétérozygotes

Aucune plante *Atccma/Atccma* n'a été retrouvée. L'observation des siliques a été effectuée pour mettre en évidence les graines contenant les embryons *Atccma/Atccma*. Des siliques issues de plantes hétérozygotes âgées de 4 à 6 semaines sont prélevées, fixées sur lamelle puis ouvertes pour observation à la loupe binoculaire. Les jeunes graines peuvent présenter une couleur verte ou blanche potentiellement révélatrice d'un phénotype embryon léthal, les graines blanches se desséchant pendant la maturation de la silique tandis que les graines vertes se développent normalement. Ce type d'observation avait déjà été effectué dans le cadre d'une étude de mutants d'insertion dans *AtCCMH* (Meyer *et al.*, 2005).

Dans toutes les siliques issues de plantes mutantes, un mélange de graines vertes (contenant un embryon au développement normal) et blanches (contenant un embryon bloqué au stade torpille) a pu être observé (Fig. 29A). Toutefois, les proportions de ces différentes populations de graines ne sont pas représentatives d'une ségrégation 1/3 2/3 ou 1/4 3/4. De plus, aucune PCR n'a pu être effectuée sur l'ADN des embryons.

Nous ne pouvons donc établir un lien entre le phénotype léthal fréquemment rencontré et l'insertion dans *AtCCMA*. Afin de prouver ce lien, nous avons complété ces plantes avec une construction exprimant la protéine AtCCMA.

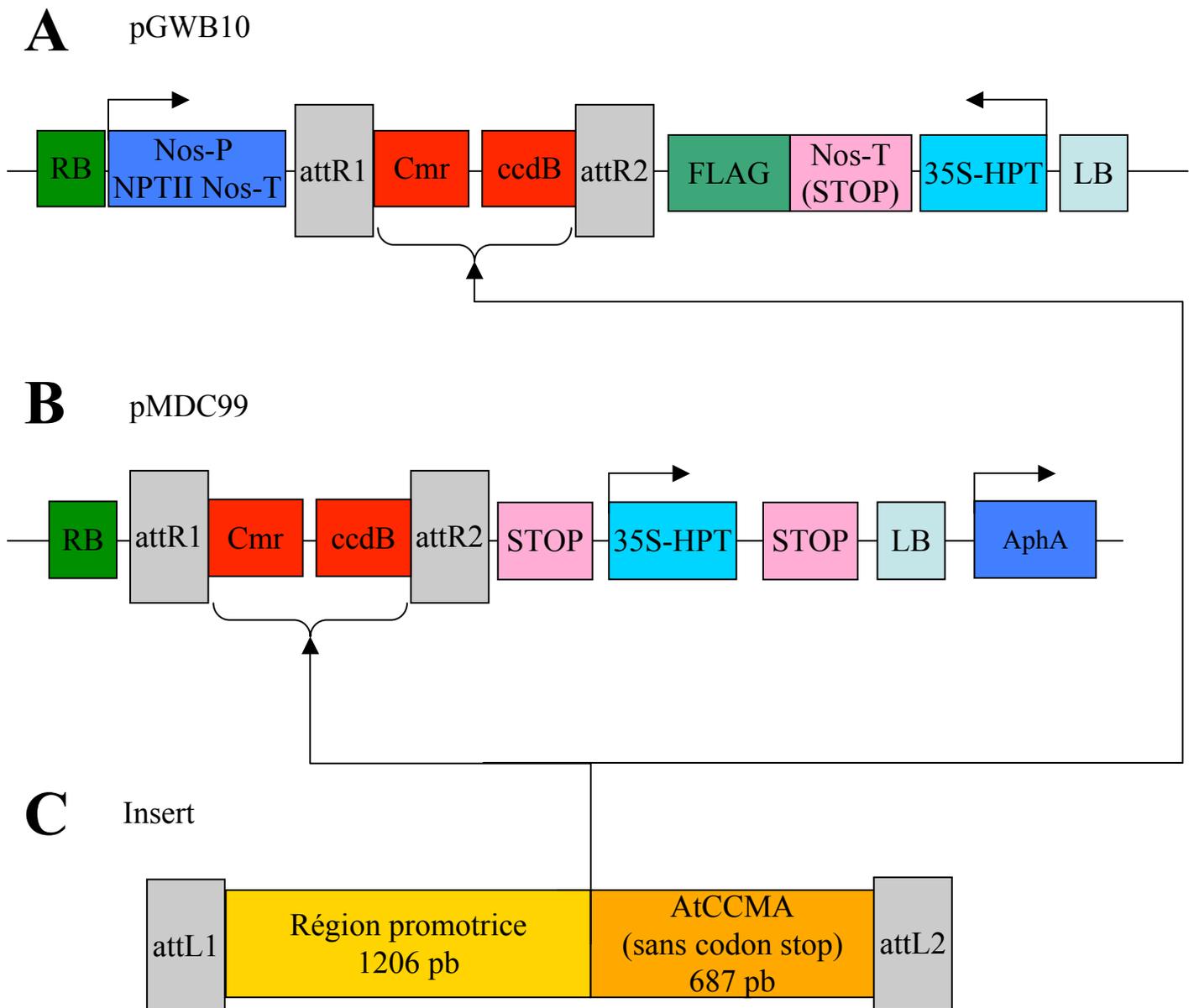


Figure 30 : Les vecteurs et constructions utilisés pour la complémentation des plantes mutantes *AtCCMA/Atccma*.

A, Le vecteur pGWB10, dérivé du vecteur pBI101, dispose d'une cassette de clonage Gateway contenant le gène de résistance au chloramphénicol *Cmr* et le "death domain" *ccdB*, le gène *NPTII* conférant une résistance à la kanamycine, le gène *HPT* conférant une résistance à l'hygromycine et une étiquette FLAG.

B, Le vecteur pMDC99, dérivé du vecteur pCambia, dispose de la même cassette de clonage Gateway que pGWB10, du gène *AphA* (aminoglycoside 3'-phosphotransférase) conférant une résistance à la kanamycine et du gène *HPT* conférant une résistance à l'hygromycine.

C, Insert conçu pour se recombiner au niveau du site compris entre attR1 et attR2. Il comporte les séquences attL1 et attL2 nécessaires à la recombinaison, la région promotrice prédite du gène *AtCCMA* et le gène *AtCCMA* dépourvu de son codon STOP.

1.4.6. Complémentation des mutants *Atccma*

Conception des vecteurs de complémentation

Différents paramètres sont à prendre en compte pour la complémentation des lignées d'insertion dans *AtCCMA*. L'absence de mutants homozygotes *Atccma/Atccma* viables, ainsi la présence de graines blanches dans les siliques des plantes hétérozygotes pour l'insertion dans *AtCCMA* nous indiquent une forte probabilité qu'une mutation de ce gène soit embryon létale. Cette hypothèse exclue donc l'utilisation du promoteur 35S pour l'expression du gène complémenté, ce type de promoteur n'étant actif qu'à des stades post-germination (Custers, 1999). Nous avons donc choisi de cloner *AtCCMA* avec son promoteur endogène. Pour cela, nous avons pris en compte une région de 1 kb en amont de l'ATG initiateur du gène (Fig. 30).

L'autre intérêt de cette expérience réside dans la possibilité de complémenter les plantes homozygotes mutantes *Atccma/Atccma* avec une construction exprimant la protéine AtCCMA fusionnée à une étiquette. L'utilisation d'anticorps dirigés contre cette étiquette pourrait permettre la purification d'AtCCMA. Faites dans des conditions natives, cette purification pourrait également permettre d'extraire le complexe protéique auquel appartient AtCCMA dont la composition est à ce jour inconnu. Néanmoins, l'ajout d'une étiquette présente également le risque de perturber le repliement correct de la protéine et pourrait ainsi compromettre sa fonction et/ou son assemblage au sein de son complexe natif *in vivo*.

Pour parer à ce risque, deux vecteurs binaires, pGWB10 et pMDC99, ont été choisis pour complémenter les lignées mutantes C6-13, 16 et 17. pGWB10 fusionne la protéine exprimée à une étiquette de type FLAG tandis que pMDC99 exprime la protéine sous sa forme native (Fig. 30). L'insert a été amplifié par PCR sur de l'ADN total d'*Arabidopsis*. Cette amplification correspond au gène *AtCCMA* ainsi que de sa région promotrice (soit 1206 pb en amont de l'ATG initiateur d'*AtCCMA*) bornée par des séquences de recombinaison mais dépourvu de son codon stop. L'insertion de ce fragment dans les vecteurs se fait par recombinaison *in vitro* (méthode Gateway, Fig. 17).

Transformation des lignées mutantes

Un total de 8 plantes hétérozygotes *AtCCMA/Atccma* (4 plantes C6-13, 3 plantes C6-16 et 1 plante C6-17) a été transformé par la méthode du « floral dip » (Clough et Bent, 1998). Pour cela, les plantes adultes mentionnées sont immergées dans une culture d'*Agrobacterium*

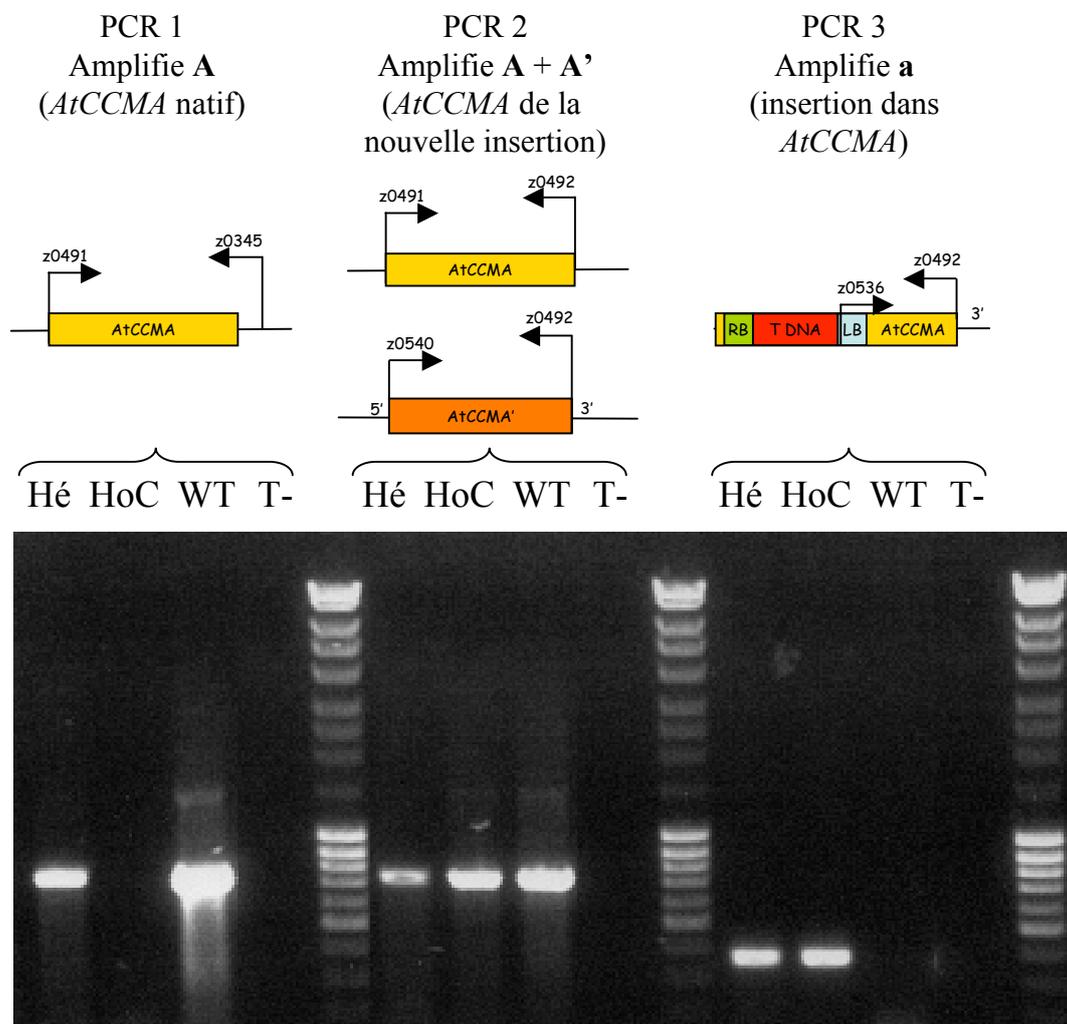


Figure 31 : PCR de génotypage sur l'ADN extrait des plantes. La PCR 1 révèle la présence du gène *AtCCMA* natif complet (A), la PCR 2 la présence du gène *AtCCMA* natif complet (A) et du gène *AtCCMA* nouvellement introduit par la complémentation (A') et la PCR 3 teste la présence d'une insertion dans *AtCCMA* (a).

Hé : ADN d'une plante hétérozygote pour l'insertion dans *AtCCMA* ; HoC : ADN d'une plante homozygote pour l'insertion dans *AtCCMA* complémentée ; WT : ADN d'une plante sauvage ; T- : Eau.

contenant le vecteur recombiné pGWB10 ou pMDC99. Les graines des plantes ainsi transformées sont récoltées et semées sur des milieux de germination contenant les antibiotiques appropriés (kanamycine pour la sélection des plantes portant l'insertion dans *AtCCMA* et hygromycine pour la sélection des plantes portant la nouvelle insertion d'ADN-T des vecteurs recombinés pGWB10 et pMDC99).

Génotypage des plantes transformées

L'ADN extrait d'une jeune feuille des plantes T1 descendantes des plantes transformées T0 est utilisé comme matrice pour une PCR de génotypage. Le but est de déterminer le statut hétérozygote ou homozygote pour l'insertion d'ADN-T au niveau du gène *AtCCMA*. Sur les 87 plantes T1 analysées, nous avons pu observer pour la première fois 5 plantes homozygotes pour l'insertion dans *AtCCMA* (Fig. 31). L'observation de la croissance de ces plantes ainsi que l'observation de leurs siliques (Fig. 29 B) indiquent la disparition du phénotype léthal observé habituellement dans les siliques des mutants homozygotes *Atccma/Atccma*. Ces expériences démontrent que le phénotype léthal observé ces plantes était bien dû à l'insertion d'un ADN-T dans le gène *AtCCMA*. Ceci démontre donc le caractère essentiel du gène *AtCCMA*.

1.5. Conclusions

Les premières études visant à retrouver l'orthologue de la protéine CcmA chez *Arabidopsis* ont désigné la protéine AtNAP10 comme meilleure candidate sur la base de similarités de séquence. Par la suite, des expériences d'immunodetection effectuées sur des fractions mitochondriales ont confirmé la localisation d'AtNAP10 au niveau de la membrane interne des mitochondries. Les expériences de double hybride effectuées au cours de cette thèse, en démontrant qu'AtNAP10 interagit avec certains domaines spécifiques d'AtCcmB, suggèrent fortement que la protéine AtNAP10 correspond bien à AtCCMA, l'homologue des protéines CcmA trouvées chez les bactéries. AtCCMA fait bien partie d'un transporteur de type ABC, probablement de stœchiométrie A_2B_2 impliqué dans la maturation des cytochromes de type *c*. De plus, l'étude effectuée sur les lignées de plantes mutantes AtCCMA et leur complémentation démontre le caractère essentiel de cette protéine.

2. Les interactions entre protéines AtCcmC et AtCCME impliquées dans la voie de livraison de l'hème

Les tests d'interactions double hybride suggèrent que le transporteur ABC impliqué dans la maturation des cytochromes de type *c* chez *Arabidopsis* se compose des protéines AtCCMA et AtCcmB. On peut se poser la question du rôle de la protéine AtCcmC si celle-ci est exclue du transporteur. Une des hypothèses suppose une coopération entre cette protéine et le chaperon d'hème AtCCME (Spielewoy *et al.*, 2001).

Des expériences d'immunodétection des sous-unités CcmA, CcmB et CcmC fusionnées avec une étiquette menées chez *E. coli* afin d'étudier la composition du transporteur ABC, ont eu pour conclusion que ce transporteur était de structure A₂BC (Feissner *et al.*, 2006a). D'autres expériences se basant sur l'étude de mutants d'*E. coli* déficients pour certaines protéines Ccm, concluaient plutôt en une structure A₂B₂ (Christensen *et al.*, 2007). Ce modèle est en accord avec d'autres résultats obtenus par Schutz *et al.* qui ont démontré qu'une surexpression de CcmC chez *E. coli* permettait l'incorporation de l'hème à CcmE en l'absence de CcmA et CcmB (Schulz *et al.*, 1999). Les tests double hybride présentés dans la première partie de ces travaux de thèse sont en faveur de cette dernière hypothèse.

Nous nous sommes alors intéressés au rôle possible d'AtCcmC dans la livraison de l'hème en étudiant ses interactions avec AtCCME. Il a été démontré chez *E. coli* que CcmE est un chaperon d'hème (Schulz *et al.*, 1998). De plus, d'autres expériences de co-immunoprécipitation ont déjà démontré qu'une interaction entre CcmC et CcmE existe chez *E. coli* (Ahuja et Thöny-Meyer, 2003; Schulz *et al.*, 2000). Utilisant les outils déjà utilisés avec succès pour tester l'interaction entre AtCCMA et AtCcmB, nous avons testé l'interaction entre AtCcmC et AtCCME par double hybride Gal4.

2.1. Conception des constructions

Le système de clonage Gateway a été également utilisé pour le clonage des séquences d'ADN codant pour les différents domaines d'AtCcmC et d'AtCCME.

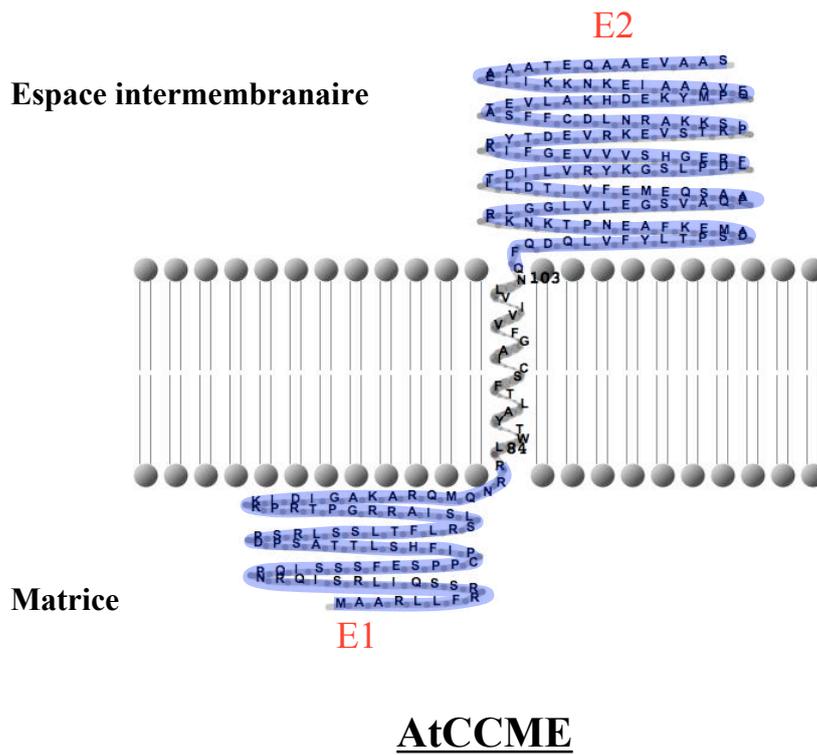


Figure 32 : Topologie prédite d'AtCCME. Les domaines clonés E1 et E2 pour les expériences double hybride représentent les domaines extramembranaires d'AtCCME et sont surlignés en bleu.

AtCcmC

Le choix des domaines s'est basé sur la topologie expérimentalement déterminée pour RcCcmC (Goldman *et al.*, 1998) et prédite pour EcCcmC (Ahuja et Thöny-Meyer, 2003) ainsi que sur les prédictions des domaines transmembranaires effectuées par les programmes DAS et TOP PRED. AtCcmC a une topologie prédite semblable à celle de AtCcmB soit une protéine avec 6 domaines transmembranaires et 7 domaines extramembranaires. Les clones utilisés sont les mêmes que ceux employés précédemment pour le test d'interaction avec AtCCMA.

AtCCME

Le choix des domaines s'est basé sur la topologie déterminée par des immunodétections effectuées sur différentes fractions mitochondriales (Spielewoy *et al.*, 2001). AtCCME est une protéine périphérique de la membrane interne, capable de lier l'hème et dont la partie N-terminale comprend un peptide signal qui est clivé au moment de l'import. Les séquences codant pour ces deux domaines, nommés respectivement E1 et E2 ont été clonées (Fig. 32 et tableau ci dessous). Par l'utilisation du clonage Gateway, ces fragments ont été introduits par recombinaison *in vitro* dans le vecteur d'entrée pDONR207 puis introduit, également par recombinaison *in vitro*, dans les vecteurs de destination pGADT7 et pGBKT7. L'exactitude du clonage est vérifiée par séquençage avec une amorce spécifique du promoteur T7.

Fragment cloné	Domaine codé	Taille du domaine (en acide aminé)
AtCCME1	M1 à R83	83
AtCCME2	Q104 à S256	153

2.2. Contrôles du test d'interaction

Comme pour les tests d'interaction précédemment effectués, des contrôles ont été réalisés sur les levures transformées afin de vérifier l'expression des constructions AtCCME1 et E2 fusionnées à AD et BD dans la levure et l'absence d'auto-activation des gènes rapporteurs. Les contrôles concernant les domaines d'AtCcmC sont présentés dans la partie précédente 1.2.5.

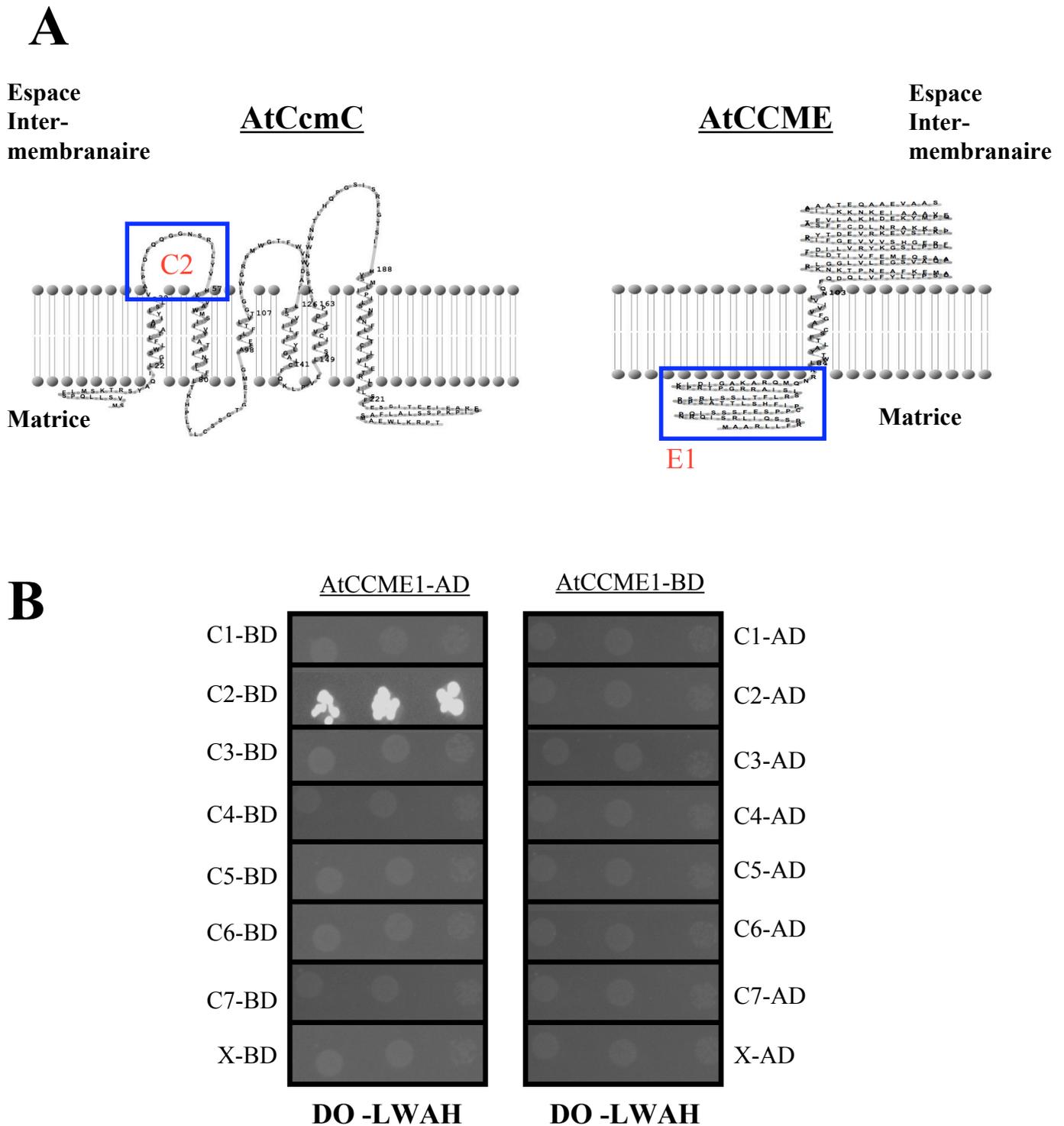


Figure 33 : Résultats du test d'interaction entre AtCcmC et AtCCME.

A, Représentation schématique de la topologie d'AtCcmC et d'AtCCME. Les domaines interagissant ensemble selon le test double hybride sont encadrés en bleu.

B, Les sept domaines hydrophiles d'AtCcmC et les deux domaines hydrophiles d'AtCCME ont été fusionnés avec la partie AD ou BD du facteur de transcription Gal4. Ces constructions ont été transformées dans la levure. Les doubles transformants sont déposés selon différentes dilutions (de 1, 10 et 100 fois en partant de la droite) sur un milieu DO-LWAH qui teste l'activation des gènes rapporteurs *ADE2* et *HIS3*.

La présence dans les levures transformées des différentes constructions a été vérifiée par PCR.

L'expression de ces constructions a été vérifiée par immunodétection des étiquettes HA et c-Myc. Aucune bande correspondant à la taille attendue des protéines de fusions n'a été détectée (Résultats non présenté). Il est possible que ces protéines aient été dégradées dans la levure ou que leur expression soit trop faible.

Des cotransformations de cellules de levure ont été effectuées avec les constructions AtCCME1 et E2 fusionnées soit à l'AD ou BD d'une part et les vecteurs correspondant vides d'autre part. Le résultat de ces contrôles étant négatif (Fig. 33 B) cela confirme l'absence d'autoactivation des protéines de fusions sous réserve que celles-ci soient effectivement exprimé.

2.3.Résultats

L'ADN plasmidique des vecteurs de destination est utilisé pour la transformation de cellule de levures PJ694A. Les cellules cotransformées avec les deux vecteurs codant pour les protéines dont l'on souhaite tester l'interaction sont déposées sur du milieu sélectif de type DO-LWAH (Fig. 33).

Seules les cellules transformées avec AtCcmC2-BD et AtCCME1-AD sont capables de pousser sur le milieu sélectif DO-LWAH. Ceci montre que ces deux domaines peuvent interagir au cours d'une expérience de type double hybride dans la levure. Toutefois, cette interaction ne semble pas être biologiquement significative pour deux raisons :

- Les domaines interagissant sont situés *in vivo* dans des compartiments cellulaires différents. AtCcmC2 étant orienté du côté de l'espace intermembranaire et AtCCME étant une protéine extrinsèque orientée vers l'espace intermembranaire.

- Le domaine E1 utilisé ici correspond à la partie N-terminale du précurseur d'AtCCME. Il comporte l'intégralité du peptide signal, d'une taille estimé d'environ 5 kDa qui pourrait correspondre à la séquence comprise entre les résidus M1 à R47, clivé au moment de l'import de cette protéine (Spielewoy *et al.*, 2001). Le domaine E1 est donc partiellement absent dans la protéine mature.

2.4. Conclusions

Bien qu'une interaction entre CcmC et CcmE ait été détectée chez la bactérie *E. coli*, la technique du double hybride « Gal4 » ne nous a pas permis de détecter une interaction biologiquement significative entre les protéines homologues chez *Arabidopsis*. Toutefois, des tests d'expression des différents domaines clonés devront être réalisés afin de conclure à l'absence d'autres interactions détectables par double hybride. Dans tous les cas, la conception d'autres constructions double hybride classique ou split-ubiquitin nous permettrait peut-être de détecter une interaction entre AtCcmC et AtCCME.

3. Test d'interaction entre les protéines AtCcmFs et AtCCMH impliquées dans l'assemblage du cytochrome *c*

On prédit pour CcmF une fonction dans l'assemblage du cytochrome *c* et pour CcmH une fonction dans la voie de réduction des apocytochromes *c*. Des expériences de co-immunoprécipitation ont démontré chez *E. coli* l'existence d'un complexe réunissant CcmF et CcmH, sans toutefois prouver qu'il ait une interaction directe entre ces deux protéines (Ren *et al.*, 2002). De même d'autres expériences de co-immunoprécipitation réalisées sur des extraits de mutants Δ CcmH d'*E. coli* complémentés avec AtCCMH ont démontré une association entre EcCcmF et AtCCMH (Meyer *et al.*, 2005).

Toutefois l'homologue de EcCcmF est particulier dans les mitochondries d'*Arabidopsis* dans le sens où ce gène a été divisé en 3 parties (*AtCcmF_{N1}*, *AtCcmF_{N2}* et *AtCcmF_C*) au cours de l'évolution (Unsold *et al.*, 1997). Ces 3 gènes sont tous exprimés (Giegé et Brennicke, 1999) et produisent après traduction des protéines membranaires avec un total de 11 à 13 hélices transmembranaires (Rayapuram *et al.*, 2008). Le gène *AtCcmF_{N2}* est particulier par l'absence de codon d'initiation, sans toutefois être un pseudogène (Giegé et Brennicke, 1999). La protéine exprimée dispose d'un domaine conservé WWD (tryptophane rich motif) (Ahuja et Thöny-Meyer, 2003; Kranz *et al.*, 1998) au niveau de son domaine extramembranaire orienté vers l'espace intermembranaire (Fig. 34). Il a été proposé que ce motif puisse servir de plateforme hydrophobe nécessaire pour la liaison avec l'hème (Goldman *et al.*, 1998), mais d'autres études suggèrent que ce motif serve à l'interaction entre CcmC et CcmE (Ren et Thony-Meyer, 2001; Schulz *et al.*, 2000).

3.1. Conception des constructions

Le système de clonage Gateway a été également utilisé pour le clonage des séquences d'ADN codant pour différents domaines d'*AtCcmF_{N1}*, *AtCcmF_{N2}*, *AtCcmF_C* et AtCCMH.

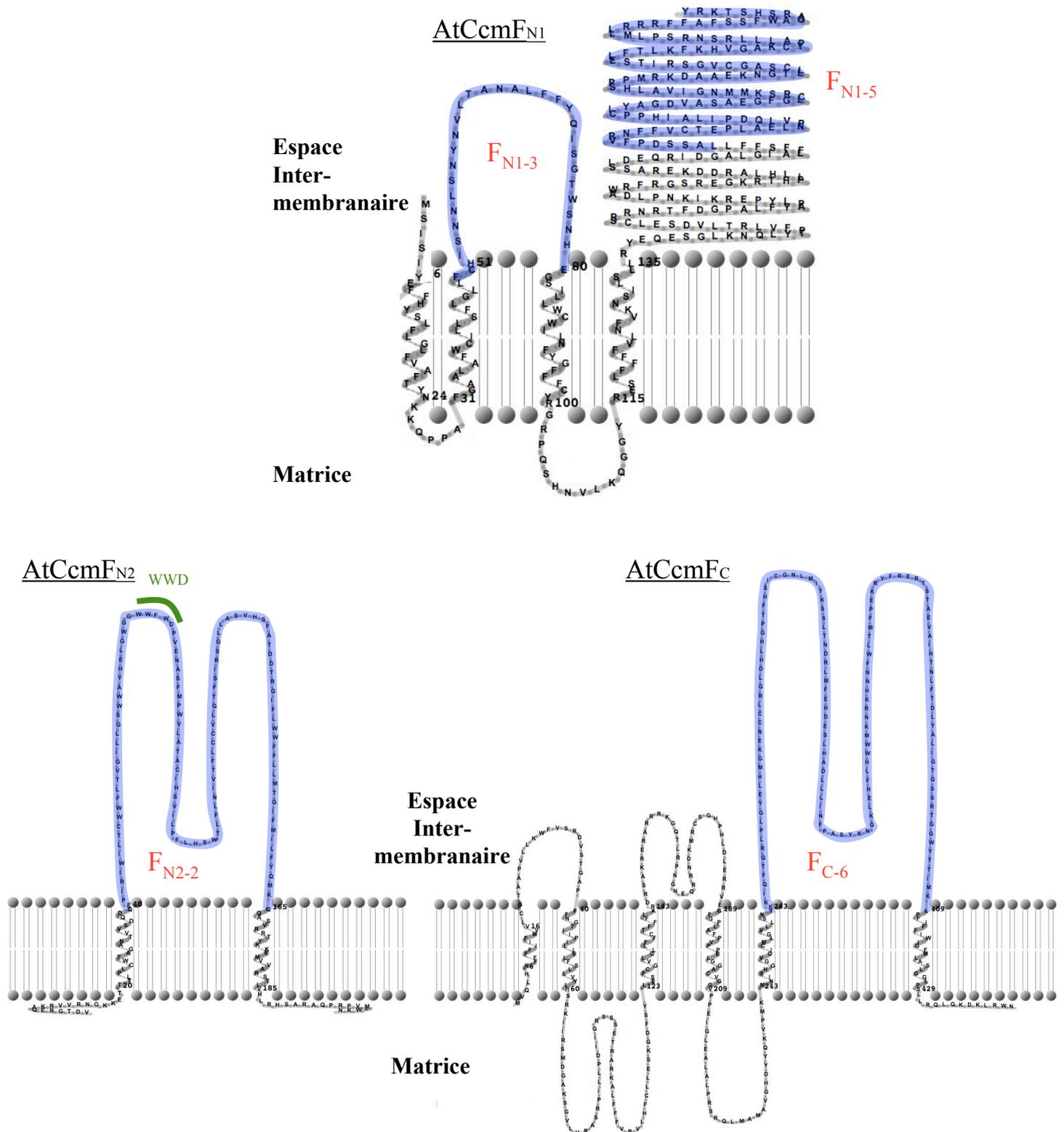


Figure 34 : Topologie prédite d'AtCcmF_{N1}, AtCcmF_{N2} et AtCcmF_C basée sur des programmes de prédiction et en accord avec des expériences de digestion à la trypsine. Le domaine transmembranaire d'AtCcmF_{N1-5} pourrait contenir un domaine transmembranaire additionnel (Rayapuram *et al*, 2008). Les domaines clonés pour les expériences double hybride sont surlignés en bleu. Le motif riche en tryptophane WWD est indiqué en vert.

AtCcmF_{N1}, AtCcmF_{N2}, AtCcmF_C

La topologie des protéines AtCcmF_{N1}, AtCcmF_{N2}, AtCcmF_C est basée sur les données expérimentales fournies par la fusion de PhoA et LacZ dans les domaines prédits solubles de CcmF dans *Rhodobacter* suivi de la mesure des activités enzymatiques correspondantes (Goldman *et al.*, 1998; Rios-Velazquez *et al.*, 2003). Un autre type d'expérience, utilisant des immunodétections effectuées sur différentes fractions de mitoplastes d'*Arabidopsis* digérés par la trypsine, ont permis d'étudier la topologie de ces protéines dans les mitochondries de plantes (Rayapuram *et al.*, 2008). Ces données, combinées à l'utilisation du programme de prédiction de topologie ConPred II, nous ont permis de construire un modèle topologique de ces trois protéines (Fig. 34). Le choix des domaines à cloner a été décidé sur la base des domaines hydrophiles les plus étendus (meilleurs candidats pour une interaction) et les plus conservés (en particulier le domaine riche en tryptophane WWD d'AtCcmF_{N2}). Deux domaines d'AtCcmF_{N1}, un domaine d'AtCcmF_{N2} et un domaine d'AtCcmF_C ont été clonés et ont été nommés respectivement F_{N1-3}, F_{N1-5}, F_{N2-2} et F_{C-6} (cf. tableau ci-dessous).

AtCCMH

AtCCMH a été identifié comme la protéine orthologue de CcmH/CycL retrouvée chez les bactéries (Meyer *et al.*, 2005). Chez les bactéries, CcmH et la thioredoxine CcmG sont les composants d'une voie de thioréduction supposée maintenir les cystéines de l'apocytochrome *c* en un état réduit. AtCCMH est une protéine intégrale de la membrane interne des mitochondries d'*Arabidopsis*, disposant d'un seul domaine transmembranaire. Sa partie N-terminale possède un motif RCXXC conservé orienté du côté de l'espace intermembranaire où l'assemblage des cytochromes *c* a lieu (Meyer *et al.*, 2005). C'est précisément ce domaine, nommé H-D1, qui a été cloné (cf. tableau ci-dessous).

Fragment cloné	Domaine codé	Taille du domaine (en acide aminé)
AtCcmF _{N1-3}	F48 à E80	33
AtCcmF _{N1-5}	L239 à Y382	144
AtCcmF _{N2-2}	E39 à Q165	127
AtCcmF _{C-6}	K262 à L409	148
AtCCMH-D1	M1 à F81	81

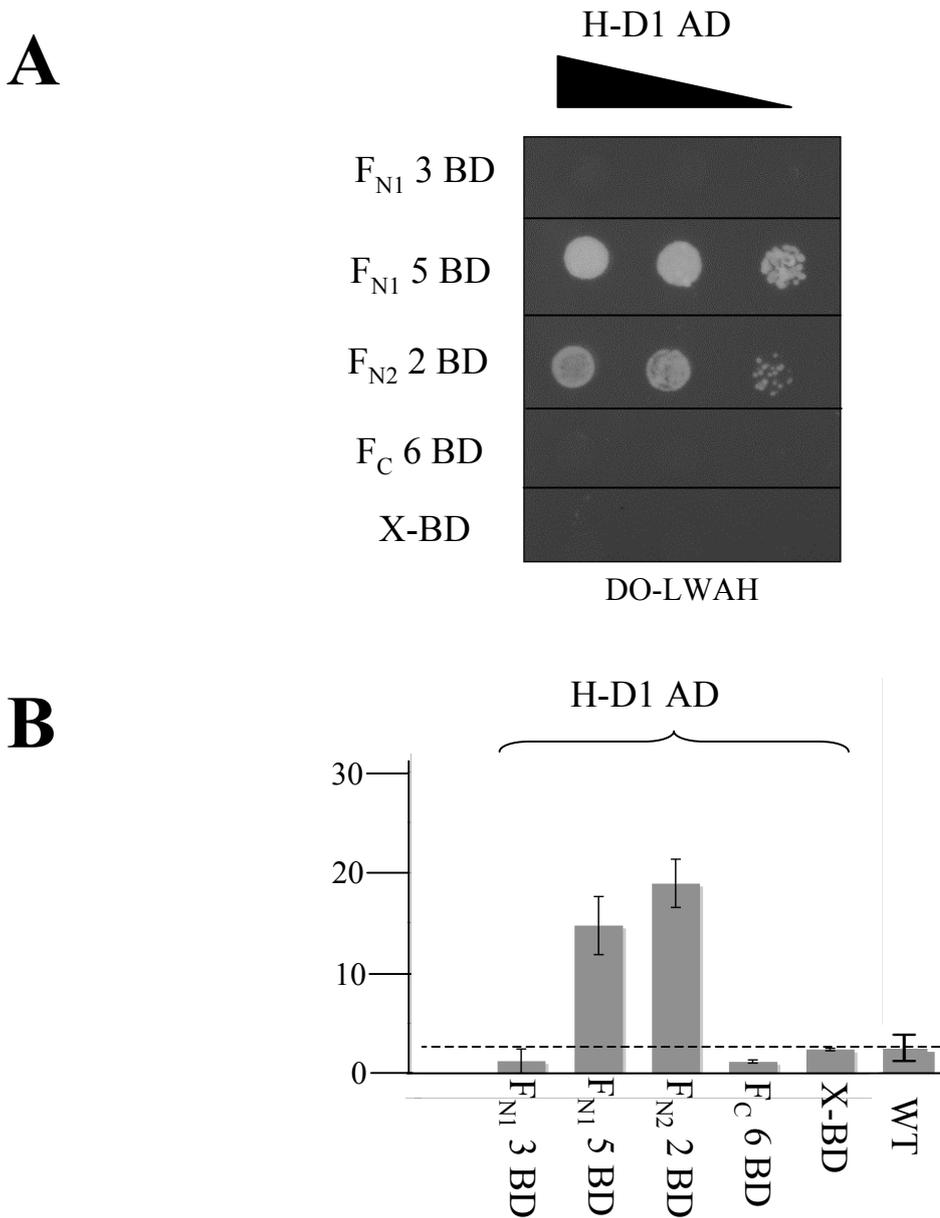


Figure 35 : Résultat du test d'interaction double hybride entre AtCCMH et les différents domaines clonés des protéines AtCcmF. Ce test indique qu'il existe une interaction entre le domaine D1 d'AtCCMH avec le domaine 5 d'AtCcmF_{N1} et le domaine 2 d'AtCcmF_{N2} mais pas avec le domaine 3 d'AtCcmF_{N1} ni le domaine 6 d'AtCcmF_C.

A, L'interaction est visualisée par l'expression des gènes rapporteurs *ADE2* et *HIS3*. Ces constructions ont été transformées dans la levure. Les doubles transformants sont déposés selon différentes dilutions (de 1 à 100 fois en partant de la gauche) sur un milieu DO-LWAH.

B, Test d'activité β -galactosidase par l'utilisation du substrat o-NPG. L'activité β -galactosidase est mesurée en unité (1 unité = 1 nmol/min). Les valeurs présentées correspondent à la moyenne de l'activité β -galactosidase. Le bruit de fond de l'activité β -galactosidase est estimé en mesurant cette activité dans les levures sauvages (WT). Les contrôles négatifs ont été obtenus en transformant les levures avec les constructions AD ou BD avec le vecteur vide complémentaire pGAD ou pGBK.

3.2. Contrôles du test d'interaction

Des contrôles ont été réalisés sur les levures transformées afin de vérifier l'exactitude des constructions utilisées et l'absence d'auto-activation des gènes rapporteurs.

Les séquences des constructions ont été vérifiées et leurs présences dans les levures transformées ont été confirmées par PCR.

Des cotransformations de cellules de levure ont été effectuées avec les constructions comportant les domaines protéiques testés fusionnés soit à l'AD ou BD d'une part et les vecteurs correspondant vides d'autre part. Le résultat de ces contrôles étant négatif (Fig. 35) cela confirme l'absence d'autoactivation des protéines de fusions.

3.3. Résultats

L'ADN plasmidique des vecteurs de destination est extrait et utilisé pour la transformation de cellules de levure PJ694A. Les cellules cotransformées avec les deux vecteurs codant pour les protéines dont l'on souhaite tester l'interaction sont déposées sur un milieu sélectif de type DO-LWAH (Fig. 35).

L'activation des gènes rapporteurs a été observée quand la construction H-D1-AD a été co-transformé avec F_{N1-5} -BD et F_{N2-2} -BD mais pas avec F_{N1-3} ni F_{C-6} -BD. Ceci suggère qu'AtCCMH peut interagir avec certaines protéines AtCcmF au niveau de domaines extramembranaires particuliers orientés du côté de l'espace intermembranaire d'AtCcmF_{N1} et AtCcmF_{N2}. Ce résultat suggère que le domaine F_{N1-5} est, au moins en partie, localisé dans l'espace intermembranaire.

Conclusions

Ces résultats confirment les conclusions de précédentes expériences sur le sujet. D'autres manipulations ont démontrés par co-immunoprécipitation que la protéine AtCCMH d'*Arabidopsis* exprimée dans des cellules d'*E. coli* interagit la protéine EcCcmF. Ils confirment également des tests d'interactions de type split-ubiquitin dans la levure effectués par Philippe Giegé (cf. discussion). Ces tests ont démontré qu'il existe une interaction entre la protéine de fusion AtCCMH-Cub d'une part et AtCcmF_{N1}-Nub ou AtCcmF_{N2}-Nub d'autre

part. Bien que testée, aucune interaction entre AtCCMH-Cub et AtCcmFc n'a été détecté (Rayapuram *et al.*, 2008).

Ces résultats suggèrent fortement l'existence d'une interaction fonctionnelle entre les protéines AtCcmFs ayant un rôle putatif d'hème lyase et AtCCMH ayant un rôle supposé dans la réduction des cystéines de l'apocytochrome *c*.

4. Recherche des partenaires d'AtCCMH

Chez les bactéries, les apocytochromes *c* sont exportés dans le périplasme où la protéine oxydante DsbA forme un pont disulfure entre les cystéines du motif CXXCH des apocytochromes de type *c*. Contrairement aux mitochondries de plantes où les apocytochromes de type *c* ne peuvent se lier qu'à un seul hème, les apocytochromes *c* de bactéries peuvent lier plusieurs hèmes dans le système bactérien. Cette réduction des cystéines est supposée empêcher la liaison avec un nombre illégitime d'hèmes. CcmG, une thioredoxine membranaire, et CcmH, une thiol-disulfure oxidoreductase, réduisent ce pont disulfure intramoléculaire avant l'attachement de l'hème en transférant les électrons de la thioredoxine cytosolique par la thioldisulfure oxidoreductase transmembranaire DsbD (Fabianek *et al.*, 2000; Reid *et al.*, 2001; Setterdahl *et al.*, 2000) (Fig. 8).

Chez *Arabidopsis*, seule l'orthologue d'un domaine de la protéine CcmH, AtCCMH, a été retrouvé (Meyer *et al.*, 2005). Dans les génomes mitochondriaux et nucléaires de plantes, les gènes *CcmD*, *CcmI* et *CcmG* n'ont pas été identifiés. Il est possible que la séquence de ces gènes ait divergé au cours de l'évolution, ces modifications rendant la reconnaissance par alignement de séquence impossible. On peut énoncer trois hypothèses pour expliquer l'absence d'identification de ces gènes chez les plantes : a) Les protéines codées par ces gènes sont bien présentes chez les plantes, mais sont similaires aux protéines bactériennes d'avantage au niveau de leur structure tridimensionnelle ou de leur fonction qu'au niveau de leur structure primaire. b) Les fonctions des protéines *CcmD*, *CcmI* et *CcmG* sont essentielles pour les plantes, mais ces fonctions ont été prises en charges par d'autres protéines. c) Les fonctions de ces protéines ne sont pas essentielles chez les plantes et n'ont donc pas été conservées.

Afin de mieux comprendre le rôle d'AtCCMH et de voir si une voie de réduction impliquant des protéines ayant les fonctions de DsbD et CcmG existe aussi chez les plantes, nous avons utilisé AtCCMH comme appât lors d'un criblage d'une banque d'ADNc. Nous espérons ainsi trouver des partenaires potentiels de cette protéine.

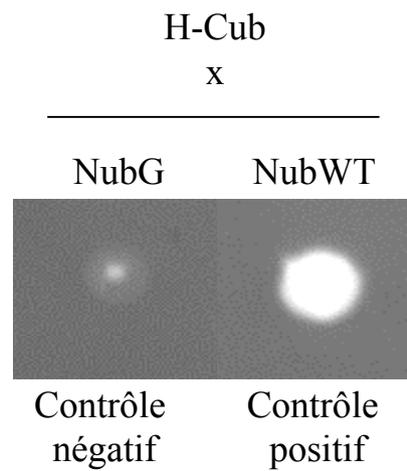


Figure 36 : Test d'autoactivation de l'appât AtCCMH-Cub-PLV utilisé pour le criblage split-ubiquitin de la banque d'ADNc d'*Arabidopsis*.

L'expression des gènes rapporteurs *ADE2* et *HIS3* est vérifiée par dépôts des levures cotransformées avec l'appât AtCCMH-Cub-PLV d'une part et les vecteurs NubG (mutés) et NubWT (sauvage) vides d'autre part sur le milieu sélectif DO-LWAH.

4.1. Criblage par la méthode du split-ubiquitin dans la levure

4.1.1. Construction de l'appât *AtCCMH*

AtCCMH étant une protéine membranaire, le système de criblage par la technique du split-ubiquitin a été choisi afin de détecter les interactions de la protéine entière.

Le clonage du gène *AtCCMH* a été effectué par PCR. La méthode de clonage est effectuée comme précédemment par recombinaison *in vivo* dans la levure. La séquence codant pour la protéine *AtCCMH* complète est fusionnée avec la séquence codant pour la partie C-terminale de l'ubiquitine ainsi qu'avec le facteur de transcription PLV. L'exactitude du clonage est vérifiée par séquençage en utilisant les mêmes amorces employées pour la PCR.

4.1.2. Contrôles

Contrôle négatif

Afin de vérifier si la construction *AtCCMH-Cub-PLV* n'interagit pas avec la partie Nub mutée, celle-ci a été cotransformée dans des cellules de levures de souche AP4 avec le vecteur pNXgate exprimant seulement la partie N-terminale mutée de l'ubiquitine. Le résultat de la transformation est déposé sur un milieu de sélection DO-LWAH (Fig 36).

Contrôle positif

Ce contrôle permet de vérifier que la protéine de fusion exprimée n'est pas dégradée et est correctement orientée dans les membranes biologiques de la levure. En effet, une orientation incorrecte, c'est-à-dire la partie comportant le facteur de transcription PLV n'étant pas orientée vers le cytosol, empêcherait le relargage du facteur de transcription et ne permettrait donc pas l'activation des gènes rapporteurs.

Pour vérifier qu'*AtCCMH-Cub-PLV* est bien capable d'activer les gènes rapporteurs en cas d'interaction avec une construction complémentaire, celle-ci est cotransformée avec le vecteur pNXgate exprimant seulement la partie N-terminale native de l'ubiquitine. Le résultat de la transformation est déposé sur un milieu de sélection DO-LWAH (Fig 36).

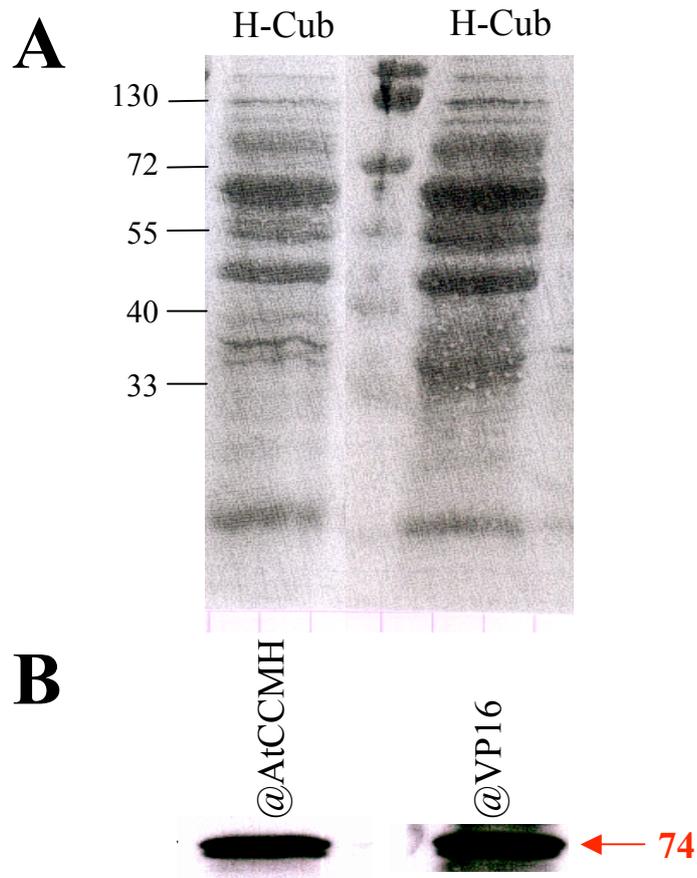


Figure 37 : Contrôle d'expression de l'appât AtCCMH-Cub-PLV utilisé pour le criblage split-ubiquitin de la banque d'ADNc d'*Arabidopsis*.

A, Coloration de la membrane sur laquelle a été transféré un gel de protéines. Ce gel comportait un extrait total de protéines issues d'1 ml de culture à saturation de levures transformées avec une construction exprimant AtCCMH-Cub-PLV. Les tailles sont exprimées en kDa.

B, Immunodétection avec des anticorps dirigés contre la protéine AtCCMH et VP16 (compris dans le facteur de transcription PLV). Dans les deux cas, une bande à la taille attendue de 74 kDa a été détectée.

Contrôle d'expression

Afin de déterminer si la protéine de fusion AtCCMH-Cub-PLV est correctement exprimée, une culture de cellule de levure transformée avec le vecteur exprimant cette protéine est traitée selon un protocole d'extraction protéique au TCA (cf. partie 2.2.6. de la section matériels et méthodes). Les protéines extraites sont analysées par une immunodétection en utilisant des anticorps anti-AtCCMH (Meyer *et al.*, 2005) et anti-PLV. Les résultats de cette immunodétection indiquent que la protéine de fusion est bien exprimée à la taille attendue (74 kDa) (Fig. 37).

4.1.3. Criblage pilote

Le résultat de la cotransformation de la construction AtCCMH-Cub-PLV et pNXgate est déposé sur des milieux DO-LWA et DO-LWAH comportant des concentrations de 0 ; 1 ; 2,5 ; 5 ; 7,5 et 10 mM de 3-AT (3-aminotriazole), un inhibiteur compétitif du produit du gène *HIS3*. Ainsi, augmenter la concentration de 3-AT dans un milieu de sélection augmente la stringence de la sélection *HIS3*.

On a pu observer que certaines colonies transformées pouvaient croître sur le milieu LWAH sans 3-AT, mais que les milieux contenant une concentration minimale de 1 mM de 3-AT ne permettaient pas cette croissance. La stringence suffisante est donc obtenue à partir de 1mM de 3-AT. C'est cette concentration qui a été utilisée dans le cadre du criblage de la banque d'ADNc.

4.1.4. Criblage de la banque d'ADNc

Les levures transformées avec la construction AtCCMH-Cub-PLV sont cultivées dans 200 mL de milieu liquide DO-L puis sont transformées avec 21 µg de la banque d'ADNc d'*Arabidopsis* (cf. détails de la banque dans la partie 1.4 de la section matériels et méthodes). Le résultat de cette transformation est déposé sur des boîtes de milieux DO-LWAH (afin de sélectionner les candidats interagissant avec AtCCMH) et 3 dilutions (1/100, 1/1000 et 1/10000) sont déposées sur une boîte de milieu DO-LW (afin d'estimer l'efficacité

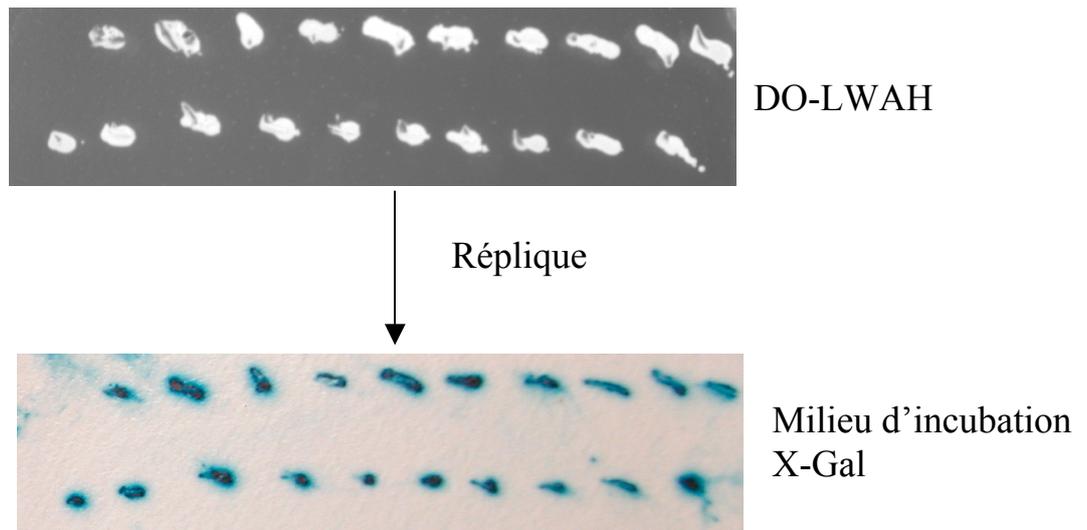


Figure 38 : Exemple d'un test β -Gal effectué à partir de 20 colonies de levures cotransformées avec un vecteur exprimant la protéine de fusion AtCCMH-Cub-PLV et avec un vecteur exprimant une protéine interagissant avec AtCCMH-Cub-PLV fusionnée avec la partie N-terminale mutée de l'ubiquitine. La coloration bleue obtenue pour l'ensemble des colonies testées démontre l'activation du gène rapporteur *LacZ*, témoin de l'interaction entre les protéines de fusion.

de transformation). L'efficacité de transformation est estimée à $5,23 \cdot 10^5$ colonies par μg d'ADN.

Environ $1,2 \cdot 10^4$ colonies transformées sont capables de pousser sur le milieu DO-LWAH 1mM 3-AT. Pour le moment, 320 colonies, prélevées parmi celle ayant poussées en premier sur le milieu sélectif et représentant potentiellement les meilleurs candidats, ont été repiquées et analysées.

Afin de déterminer si des colonies correspondent à des faux positifs, différents tests ont été effectués.

Test de forte concentration de 3-AT

Les 320 colonies testées ont été repiquées sur un milieu DO-LWAH contenant 10 mM de 3-AT. L'intégralité des colonies repiquées ont été capables de croître sur ce milieu.

Test d'activité de la β -galactosidase

En plus des gènes rapporteurs de croissance *HIS3* et *ADE2*, la souche AP4 contient également le gène rapporteur *LacZ*. Le gène *LacZ*, qui permet d'effectuer un test colorimétrique, code pour l'enzyme bactérienne β -galactosidase qui convertit le substrat X-Gal en un composé bleu. Les colonies de levures exprimant la β -galactosidase deviennent donc bleues quand elle sont incubées avec du X-Gal.

Afin d'analyser rapidement l'activité de la β -galactosidase, une réplique des boîtes DO-LWAH comportant les 320 colonies testées est réalisée sur feuille de papier Whatman 3MM. Cette réplique est ensuite incubée dans un milieu contenant du X-Gal.

L'intégralité des répliques des 320 colonies a donné une couleur bleue au bout de 24 heures d'incubation (Fig. 38).

Malgré le grand nombre de clones positifs, nous avons poursuivi notre analyse.

4.2. Analyse des clones positifs

Le criblage a révélé un très grand nombre de levures positives, de l'ordre de $1,2 \cdot 10^4$ colonies. Sur l'ensemble de ces colonies, 320 ont été repiquées et analysées. Ce grand nombre de colonies positives peut s'expliquer par la nature de la technique split-ubiquitin : Celle-ci permet potentiellement de tester les interactions de la protéine-appât avec l'ensemble des

Protéine candidate	AGI	Nombre d'occurrence	Localisation
APX1 (Ascorbate peroxidase 1)	At1g07890	3	Cytosol
GAPC-2 (Glyceraldehyde-3-phosphate deshydrogenase)	At1g13440	4	Cytosol/Noyau
GAUT1 (Galacturonosyltransferase 1)	At3g61130	3	Lumen du Golgi
EF1 (elongation factor 1-alpha)	At5g60390	1	Cytosol
Protéine ribosomale L33	AtCg00650	1	Chloroplaste
PIP1C (Protéine intrinsèque de la membrane plasmique)	At1g01620	1	Membrane plasmique
Protéine membranaire du peroxysome	At1g52870	1	Peroxisome
ATOFP16/OFP16 (<i>Arabidopsis thaliana</i> ovate family protein)	At2g32100	2	?
GLX2-2 (GLYOXALASE 2-2, hydroxyacylglutathione hydrolase)	AT3g10850	1	?
PAB4 (Poly(A) binding protein 4)	At3g19350 At2g36660 At2g23350	1	?
ENH1 (Enhancer de SOS3-1) protéine de liaison aux ions métalliques	At5g17170	1	?
mob1 (Protéine de la famille des phoceines)	At5g45550	1	?
PGK (Phosphoglycérate kinase)	At1g79550	1	?
CHLM (Magnésium-prtoporphyrine IX methyltransférase)	At4g25080	1	Chloroplaste
Protéine inconnue	At1g54740	1	?
Hydrolase	At3g24420	1	?

Figure 39 : Candidats de l'interaction avec AtCCMH détectés par criblage split-ubiquitin. Les trois principaux candidats sont indiqués en caractères gras.

protéines solubles et membranaires de tous les compartiments cellulaires exprimé par la banque d'ADNc. Ceci pourrait démontrer qu'AtCCMH est capable d'interagir avec un large spectre de protéines sans que ces interactions aient forcément une signification biologique, en particulier concernant les interactions avec les protéines non mitochondriales. De plus, la technique split-ubiquitin est capable de détecter des interactions transitoires (Johnsson et Varshavsky, 1994). Des précédents criblages par split-ubiquitin ont aussi révélé un nombre élevé d'interactions positives (Miller *et al.*, 2005).

4.2.1. Identification des candidats

Les plasmides cotransformés dans les 320 colonies testées sont analysés par une PCR avec les amorces spécifiques des bordures de la cassette d'insertion du vecteur pDSL-Nx utilisé par la banque d'ADNc. Cette PCR permet d'amplifier spécifiquement la séquence exprimée par la construction issue de la banque d'ADNc.

Certaines PCR ont généré plusieurs fragments. Ceci est dû à la transformation dans la levure de plusieurs clones. Afin de séquencer chaque vecteur, on procède à une extraction de l'ADN total d'une culture d'une levure multi-transformée. L'ADN extrait est ensuite utilisé pour transformer des cellules d'*E. coli*. Cette nouvelle transformation permet de séparer les multiples constructions présentes dans l'ADN extrait de la levure. Les cellules bactériennes transformées sont ensuite cultivées en milieu liquide et leur ADN plasmidique est extrait et séquencé.

Ces transformations multiples pourraient expliquer certains faux positifs.

4.2.2. Les principaux candidats

L'analyse par PCR des 320 colonies prélevées est toujours en cours. Il y a actuellement 74 séquençages exploitables de ces PCR, dont 32 présentent une phase de lecture incorrecte du candidat (et représente donc les faux positifs), 21 présentent une phase de lecture correcte et les 21 restantes présentent une ambiguïté au niveau de la phase de lecture. Les 21 candidats ayant une phase de lecture correcte sont présentés dans le tableau en Fig. 39.

Sur l'ensemble des candidats analysés, trois d'entre eux se démarquent du criblage par leurs occurrences fréquentes :

APX1 (Ascorbate peroxydase) : L'ascorbate peroxydase est une hème peroxydase faisant partie des enzymes anti-oxydantes chargées de détoxifier les radicaux oxygénés libres (ROS) chez les plantes (Noctor *et al.*, 2000). Les APX forment une famille de huit enzymes localisées dans différents compartiments cellulaires chargés de la détoxification des molécules d'eau oxygénée H₂O₂ (Shigeoka *et al.*, 2002). APX1 représente une des isoformes cytosoliques (Santos *et al.*, 1996), mais il existe d'autres isoformes mitochondriales et chloroplastiques. Dans la mitochondrie, l'APX agit essentiellement au niveau de l'espace intermembranaire comme l'ont démontré des expériences d'import et des mesures d'activités enzymatiques effectuées sur différentes fractions mitochondriales d'*Arabidopsis* (Chew *et al.*, 2003). D'autres mesures enzymatiques effectuées sur des mutants de l'APX suggèrent que cette protéine pourrait correspondre à une protéine cible des thioredoxines (Marchand *et al.*, 2004) et des glutaredoxines (Rouhier *et al.*, 2005).

AtCCMH ayant des caractéristiques propres aux thioredoxines, il est compréhensible de retrouver une l'interaction entre une APX et AtCCMH dans le cadre de notre criblage. Il serait intéressant de vérifier si une telle interaction existe entre une des isoformes mitochondriales de l'ascorbate peroxydase et AtCCMH.

GAPC2 (Glyceraldehyde-3-phosphate déshydrogénase ou GAPDH) : Les GAPDH sont des enzymes cytosoliques de la glycolyse et catalysent la conversion du glyceraldehyde-3-phosphate (Ga3P) en 1,3-bisphosphoglycérate. Des expériences de fusion de GAPC à la GFP ont permis de déterminer sa localisation dans le noyau (Holtgreffe *et al.*, 2008), mais elle est aussi associée à d'autres enzymes de la glycolyse au niveau du cytosquelette et de la membrane externe de la mitochondrie (Giegé *et al.*, 2003a; Holtgrawe D, 2005).

Certaines études suggèrent que la conservation dans sa séquence protéique d'un motif conservé de type CXXXC est susceptible d'être la cible de modifications et d'oxydations, entre autres par glutathionylation (Holtgreffe *et al.*, 2008; Zaffagnini *et al.*, 2007). Ce motif, qui *in vivo* pourrait avoir une fonction dans la régulation de certains produits métaboliques ou dans certaines voies de signalisation, est peut-être impliqué dans notre cas dans l'interaction avec AtCCMH au niveau de son motif conservé RCXXXC.

GAUT1 (Galacturonosyltransferase 1) : Les galacturonosyltransferases sont des protéines membranaires qui catalysent le transfert d'un monosaccharide à partir d'un donneur glycosyl vers une molécule accepteuse, généralement un alcool. Des expériences réalisées chez *Pisum sativum* ont localisé l'activité de ces protéines dans le lumen des appareils de Golgi (Sterling *et al.*, 2001). *In vitro*, les galacturonosyltransferases transfèrent l'acide galacturonique vers un accepteur endogène pour la production de pectines (Doong *et al.*, 1995). Des études de mutants de ces enzymes ont déterminé que leur motif peptidique commun DXD est essentiel pour leur l'activité (Wiggins et Munro, 1998).

Bien qu'il soit possible que l'interaction avec AtCCMH soit due à l'une des huit cystéines composant la séquence de la protéine AtGAUT1, aucune de ces cystéines ne sont conservés chez les 15 autres galacturonosyltransferases d'*Arabidopsis* ou leurs orthologues retrouvés dans les autres plantes (Sterling *et al.*, 2006). Il semble donc improbable que l'interaction entre GAUT1 et AtCCMH détectée soit due à des réactions de thio reductions. Si le motif DXD de GAUT1, supposé être impliqué dans le transfert de l'acide galacturonique, est fonctionnellement impliqué dans l'interaction avec AtCCMH, ceci ouvrirait de nouvelles perspectives concernant les partenaires potentiels d'AtCCMH.

Les programmes de prédiction n'ont pas donné de réponses claires quant à la localisation de ces protéines. Néanmoins, leurs localisations ont été établies via des moyens expérimentaux par d'autres équipes. Aucune des protéines candidates n'est retrouvée dans la mitochondrie (à l'exception notable de l'ascorbate peroxidase APX dont il existe une isoforme mitochondriale), ce qui suggère que les interactions détectées au cours du criblage ne pourraient avoir lieu *in vivo* dans les mitochondries d'*Arabidopsis*.

AtCCMH comporte un motif conservé RCXXC capable de réduire le motif CXXCH de l'apocytochrome *c in vitro*. De plus, de précédents tests double hybride ont démontré qu'AtCCMH peut interagir avec les apocytochromes de type *c* (Meyer *et al.*, 2005). Il n'est pas exclu d'imaginer que les interactions détectées lors du criblage soient dues à une reconnaissance entre les cystéines conservées d'AtCCMH et les cystéines des protéines candidates.

Toutefois, des mutations touchant les cystéines de ce motif n'empêchent pas l'interaction détectée par double hybride entre AtCCMH et l'apocytochrome *c* (Hammani, 2006). Il est donc possible que l'interaction entre AtCCMH et ses partenaires se fasse via un autre domaine que le motif conservé RCXXC.

L'analyse des autres candidats de ce criblage nous permettra peut-être d'obtenir des informations complémentaires concernant les domaines et fonctions importants pour les partenaires d'AtCCMH.

SU DHC	CCMA	CcmB	CcmC	CCME	CcmF _{N1}	CcmF _{N2}	CcmF _C	CCMH
CCMA	+	Faux positif	Faux positif					
CcmB	+							
CcmC	-							
CCME			+					
CcmF _{N1}								+
CcmF _{N2}								+
CcmF _C								-
CCMH					+	+	-	

Figure 40 : Récapitulatif des interactions testées par double hybride entre les protéines AtCCM retrouvées chez *Arabidopsis thaliana*. Les tests d'interaction effectués par split-ubiquitin (SU) sont indiqués dans la partie supérieure du tableau. Les tests d'interaction effectués par double hybride classique (DHC) sont indiqués dans la partie inférieure du tableau.

Discussion et perspectives

L'interaction entre protéines est un élément primordial dans le fonctionnement d'un système biologique. Le système I de maturation des cytochromes de type *c* retrouvé dans les mitochondries d'*Arabidopsis* regroupe au moins 8 protéines différentes, ayant toutes un rôle à jouer pour mener à terme le processus de maturation chez les plantes. L'étude des protéines ccm chez les plantes s'est souvent basée sur des résultats obtenus avec les protéines orthologues trouvées chez les bactéries. La présence d'un système similaire de maturation des cytochromes de type *c* chez les bactéries et chez mitochondries de plantes, avec la présence d'un grand nombre de protéines homologues, mais aussi avec des protéines trouvées uniquement chez les bactéries, suggèrent que les deux systèmes partagent des fonctions communes mais ont aussi leurs propres spécificités.

En utilisant principalement des techniques du double hybride dans la levure, les expériences présentées dans cette thèse (dont la synthèse des interactions testées est présentée en fig. 40) ont permis d'apporter des réponses aux questions concernant le fonctionnement de ce système dans les mitochondries d'*Arabidopsis*.

La protéine AtNAP10 correspond bien à AtCCMA

Il existe 15 gènes codant pour des protéines AtNAPs dans le génome d'*Arabidopsis*. Ces protéines correspondent à un domaine de liaison à l'ATP (NBD) non-intrinsèque. L'une d'entre elles, AtNAP10, correspond à l'orthologue de la protéine bactérienne CcmA chez les plantes. Chez les bactéries Gram négatives, CcmA est la partie NBD du transporteur ABC impliqué dans la maturation des cytochromes de type *c*. Des résultats expérimentaux obtenus par N. Rayapuram (Rayapuram, 2003) ont permis de démontrer qu'*AtNAP10*, un gène unique localisé sur le chromosome 1 d'*Arabidopsis thaliana*, code pour AtCCMA, une protéine mitochondriale de 28 kDa. Les expériences réalisées au cours de cette thèse par utilisation de la technique double hybride dans la levure ont permis de démontrer qu'AtCCMA interagit avec sa contrepartie TMD, AtCcmB, codée dans la mitochondrie. L'expression correcte des différentes protéines de fusion impliquant les domaines extramembranaires d'AtCcmC n'ayant pu être clairement établie, l'existence d'interactions ou d'absence d'interaction de cette protéine avec AtCCMA reste à démontrer.

Quelle que soit sa composition exacte, le transporteur étudié constitue le seul exemple connu de transporteur ABC codé par deux génomes différents. Les seuls autres AtNAPs d'organelles étudiés (AtNAP1, 7 et 6, correspondant respectivement à SufB, C et D) sont chloroplastiques, impliquées dans la mobilisation du soufre et ne sont pas associées à un TMD (Balk et Lobreaux, 2005). Il est toutefois possible que d'autres AtNAPs d'*Arabidopsis* soient importées dans les organelles et spécifiquement associées avec des TMD particuliers ou soient impliquées dans un autre processus ne nécessitant pas une structure de transporteur ABC typique en quatre domaines.

Comme l'ATP est disponible des deux cotés de la membrane interne mitochondriale, les transporteurs mitochondriaux pourraient adopter deux orientations différentes en ayant leur domaine NBD situé d'un côté ou de l'autre de cette membrane. Concernant le transporteur étudié, la nécessité d'un potentiel membranaire pour l'import ainsi que la résistance d'AtCCMA lors des traitements à la trypsine des mitoplastes indiquent clairement une orientation établie, soit la partie NBD, AtCCMA, orientée du côté de la matrice. Cette orientation vers le côté négatif de la membrane est retrouvée aussi chez les bactéries. En ce qui concerne les autres protéines ccm, la conservation de leurs topologies respectives chez les bactéries et les mitochondries de plantes est en faveur d'un système I fonctionnel partageant certaines similarités.

Les protéines CcmA mitochondriales et bactériennes possèdent toutes deux des domaines fortement conservés comme les motifs Walker A et B et la séquence signature des transporteurs ABC et ont toutes deux une activité ATPase. Concernant la protéine AtCCMA, son attachement à la membrane interne est fragilisé en présence d'ATP/Mg²⁺ et d'urée. Cette expérience, originellement réalisée sur les sous-unités NBD du transporteur ABC du maltose (Mourez *et al.*, 1998), suggérait déjà qu'AtCCMA soit la partie NBD fonctionnelle du transporteur. Néanmoins, AtCCMA n'est pas capable de compléter la production d'holocytochrome dans les mutants de délétion $\Delta ccmA$ d'*E. coli*. Une spécificité particulière concernant les interactions entre protéines Ccm du système I de maturation chez les bactéries pourrait expliquer ce résultat. À ce jour, aucune des tentatives de complémentation de mutants ccm chez *E. coli* par des protéines d'*Arabidopsis* ne sont parvenues à rétablir un phénotype sauvage. Une autre possibilité est que les protéines AtCCMA et EcCcmB sont incapables d'interagir l'une avec l'autre *in vivo*. Or, l'interaction entre le NBD et TMD est essentielle pour le bon fonctionnement des transporteurs ABC (Mourez *et al.*, 1998).

C'est précisément cette interaction entre deux protéines d'*Arabidopsis* qui a été testée par double hybride au cours de mes travaux. Il a ainsi été démontré par cette technique

qu'AtCCMA peut interagir avec les domaines d'AtCcmB orientés *in vivo* spécifiquement du côté de la matrice mitochondriale alors qu'aucune interaction n'a été détectée avec les domaines orientés du côté de l'espace intermembranaire. Ces données sont en accord avec la topologie prédite d'AtCcmB et la localisation déterminée expérimentalement d'AtCCMA.

Une autre technique double hybride, dite split-ubiquitin, a été employée afin de détecter les interactions entre protéines entières sans se limiter aux domaines extramembranaires des protéines hydrophobes. Bien que des problèmes d'auto-activation des gènes rapporteurs pour les constructions exprimant AtCcmB et AtCcmC ne nous ont pas permis de tester l'interaction de ces protéines avec AtCCMA, les résultats de ces tests indiquent une interaction d'AtCCMA avec elle-même. Ce résultat est en accord avec l'organisation en quatre sous-unités des transporteurs ABC où les NBD agissent en dimère.

L'ensemble de ces résultats indiquent donc qu'au moins deux protéines, AtCCMA et AtCcmB, sont impliquées dans un même transporteur ABC et que celles-ci représentent des composants conservés du système I bactérien chez les plantes.

Structure du transporteur ABC de la maturation des cytochromes *c*

La stœchiométrie exacte de ce transporteur est toujours sujette à débat. Une première hypothèse supposait que le transporteur ABC impliqué dans la maturation des cytochromes *c* trouvé chez *R. capsulatus* soit composé des protéines CcmA, CcmB et CcmC avec CcmD en tant que protéine accessoire (Goldman *et al.*, 1997) en une stœchiométrie de type A₂BC. Cette hypothèse se basait sur la co-immunoprécipitation de CcmA avec CcmB et CcmC. Toutefois, de plus récentes expériences d'immunodétection effectuées chez des mutants de délétion d'*E. coli* ont démontré que CcmA est uniquement associé à la membrane si CcmB et non CcmC est présent dans la membrane plasmique (Christensen *et al.*, 2007).

Des tests d'interaction double hybride classique dans la levure entre AtCCMA et AtCcmC ont été réalisés au cours de cette thèse. Bien qu'aucune interaction entre ces deux protéines n'ait été détectée, des tests visant à déterminer l'expression correcte des différents domaines d'AtCcmC utilisés pour le double hybride devront être effectués afin de confirmer l'absence d'interaction entre AtCCMA et AtCcmC.

Voie de livraison de l'hème : Une interaction possible entre AtCcmC et le chaperon d'hème AtCCME

Si la protéine AtCcmC ne fait pas partie du transporteur ABC des ccm, on peut se poser la question de sa fonction dans le système I de maturation des cytochromes de type *c*.

Des expériences de complémentation chez *E. coli* ont démontrées que l'holoAtCCME est formé quand EcCcmC est exprimé (Spielewoy *et al.*, 2001), indiquant un lien fonctionnel entre ces deux protéines. De plus, des co-immunoprécipitations effectuées chez *E. coli* ont démontré une interaction entre CcmC et CcmE et que cette interaction dépend du motif WWD (Ren et Thony-Meyer, 2001) et de deux histidines conservés (H⁶⁰ et H¹³⁰) (Schulz *et al.*, 1999; Schulz et Thony-Meyer, 2000). Des études sur des mutations ponctuelles de CcmC chez *E. coli* ont permis de déterminer deux autres résidus essentiels (G¹¹¹ et H¹⁸⁴) pour l'interaction entre CcmC et CcmE (Ahuja et Thöny-Meyer, 2003). Il est important de mentionner que tous ces résidus conservés, à l'exception de H¹³⁰, sont retrouvés à des positions équivalentes dans la protéine AtCcmC, indiquant qu'une interaction CcmC-CcmE semblable à celle retrouvée chez les bactéries pourrait se retrouver dans les mitochondries d'*Arabidopsis*.

Mais on peut aussi imaginer que, malgré ce lien fonctionnel au niveau de la livraison de l'hème, il soit possible qu'elles n'aient pas d'interaction directe l'une avec l'autre et n'interagissent que par l'intermédiaire de l'hème. Outre la fonction supposée de CcmC comme composant du transporteur ABC précédemment décrit, l'étude de certaines mutations de la protéine EcCcmC suggère fortement que celle-ci ait un rôle à jouer dans le transfert de l'hème à CcmE et sa livraison à l'apocytochrome *c*. Cette hypothèse est en particulier soutenue par l'étude de l'expression dans *E. coli* de la protéine de fusion EcCcmCE qui cause une chute d'environ 90% de la production des cytochromes de type *c* (Ahuja et Thöny-Meyer, 2003).

Afin de tester chez *Arabidopsis* l'existence d'une interaction directe entre ces deux protéines, un test d'interaction double hybride entre les sept domaines extramembranaires d'AtCcmC et les deux domaines extramembranaires d'AtCCME a été effectué. Malheureusement, la seule interaction positive relevée a peu de signification biologique car elle concerne des domaines situés *in vivo* dans des compartiments mitochondriaux différents.

On peut imaginer que les protéines de fusion des différents domaines d'AtCcmC, agissant hors de leurs contextes *in vivo*, n'ont pas la structure tridimensionnelle nécessaire pour interagir avec leur(s) partenaire(s). Il est possible également que l'interaction entre AtCcmC et AtCCME se fasse au niveau des domaines transmembranaires, bien que cela ne semble pas être le cas chez les bactéries. En effet, la protéine EcCcmE dépourvue de son domaine membranaire est capable de se lier à l'hème et de participer à la production de cytochrome *c*, bien qu'en quantité moindre comparé à la protéine EcCcmE non mutée (Ahuja et Thony-Meyer, 2006).

Afin de prendre en compte ces domaines hydrophobes, il serait intéressant d'effectuer un nouveau test d'interaction double hybride de type split-ubiquitin. Si une interaction est détectée, l'utilisation d'un mutant d'AtCcmC au niveau de son motif conservé WWD pourrait nous renseigner sur son importance pour l'interaction.

Fonction du transporteur ABC de la maturation des cytochromes *c*

Le fait que les parties NBD et TMD de ce transporteur ABC soient codées séparément est caractéristique des importeurs. Toutefois, les analyses phylogénétiques classent CcmA dans la sous-famille des exporteurs de type ABC-A2 qui contiennent des modules de transporteurs ABC non fusionnés avec la partie TMD (Saurin *et al.*, 1999). Ce transporteur a une fonction supposée dans la livraison de l'hème, mais pas nécessairement dans son transport à travers la membrane. En effet, des expériences menées sur des mutants $\Delta ccmA$ chez *E. coli*, ont montré que cette mutation n'empêchait pas la formation des cytochromes de type *b* dans le périplasme (Throne-Holst *et al.*, 1997) ni le transfert de l'hème à CcmE (Schulz *et al.*, 1999).

Un autre type de substrat possible pour ce transporteur serait un donneur d'électron, essentiel pour maintenir le fer de l'hème en un état réduit après son transfert à CcmE pour permettre le relargage de l'hème avant sa liaison à l'apocytochrome. Des expériences *in vivo* et *in vitro* ont démontré que le fer de l'hème doit être en un état réduit pour qu'une liaison covalente puisse être effectuée (Daltrop *et al.*, 2002a; Daltrop *et al.*, 2002b; Nicholson et Neupert, 1989). Dans les mitochondries de levures, un transfert d'électron effectué par des nucléotides NADH et flavine est supposée effectuer la réaction de liaison à l'hème (Nicholson et Neupert, 1989) et la flavoprotéine Cyc2p est supposée réduire le fer de l'hème avant son attachement à l'apocytochrome *c* par l'hème lyase du système III (Bernard *et al.*, 2005). Il n'est pas encore certain qu'un système similaire existe chez les mitochondries de plantes et si le transporteur ABC des *ccm* pourrait être impliqué.

Il est également envisageable que ce transporteur ABC ne transporte aucun substrat. Bien que l'absence d'une fonction de transport soit rare pour les transporteurs ABC ayant deux NBD et deux TMD, des exemples de ce type existent. Les protéines SapABCDF, par exemple, forment un transporteur ABC dont la fonction est inconnue mais qui est impliqué dans le système de régulation du taux de potassium chez *E. coli* sans être impliqué dans son transport (Harms *et al.*, 2001). On peut imaginer dans ce cas de figure que le transporteur ABC des *ccm* utilise l'énergie issue de la lyse de l'ATP afin de changer de conformation pour déclencher *in fine* le relargage de l'holo-AtCCME.

Ces deux dernières hypothèses sont rendues d'autant plus probable selon une étude effectuée chez *E. coli* qui a démontré que des mutants dépourvus d'activité ATPase au niveau du transporteur ABC des ccm disposent toujours d'holoAtCCME mais que celui-ci est incapable de transférer son hème à l'apocytochrome *c* (Christensen *et al.*, 2007; Feissner *et al.*, 2006a).

AtCCMA est une protéine essentielle

Afin de vérifier les effets *in vivo* d'une mutation dans le gène *AtCCMA* et afin d'en étudier le caractère essentiel, une étude a été menée sur des mutants de ce gène par insertion d'ADN-T. Aucune plante homozygote pour l'insertion dans le gène *AtCCMA* n'a été retrouvée au cours des ségrégations effectuées. Les siliques des plantes hétérozygotes *AtCCMA/Atccma* contiennent des graines blanches, ayant un embryon bloqué au stade torpille, ainsi que des graines vertes, ayant un embryon se développant normalement. Bien qu'il n'ait pas été possible de définir le génotype de ces embryons, ces observations suggèrent très fortement le caractère essentiel de ce gène chez *Arabidopsis thaliana*.

Afin de confirmer cette hypothèse, une complémentation par insertion dans le génome des plantes mutées d'un nouvel ADN-T, portant la séquence du gène *AtCCMA* ainsi que sa région promotrice, a alors été effectuée. Parmi ces plantes complémentées, des homozygotes portant l'insertion dans le gène natif *AtCCMA* ont été retrouvés, démontrant que le gène *AtCCMA* nouvellement inséré complémente la première mutation. Ceci démontre que l'effet léthal observé est bien dû à l'insertion dans *AtCCMA*. Ces résultats indiquent également qu'il n'existe pas d'autres protéines pouvant remplir le rôle d'AtCCMA dans les mitochondries de plantes.

Certaines des plantes mutantes *Atccma* ont été complémentées avec succès par une nouvelle insertion d'ADN-T exprimant la protéine AtCCMA fusionnée à une étiquette de type FLAG. Ceci démontre que la protéine de fusion AtCCMA-FLAG est fonctionnelle. L'extraction des complexes protéiques mitochondriaux en condition native de ces plantes, suivie d'une chromatographie d'immunoaffinité, pourrait permettre d'isoler efficacement le complexe auquel appartient AtCCMA et d'en analyser la composition.

Des expériences utilisant le bleu natif PAGE suggèrent que les protéines ccm sont organisées en au moins deux complexes : Un complexe d'environ 480 kDa auquel appartient AtCCMA et un complexe d'environ 500 kDa auxquelles appartiennent les protéines AtCcmFs et AtCCMH. Ces tailles sont trop grandes pour ne correspondre respectivement qu'au seul

transporteur ABC constitué de ses quatre sous-unités ou aux seules protéines AtCcmFs et AtCCMH.

Le complexe auquel appartient AtCCMA pourrait comporter les protéines suivantes : AtCcmB, ce qui confirmerait les résultats précédemment obtenus par double hybride ; AtCcmC, son interaction avec AtCCMA restant possible ; AtCCME, le chaperon d'hème, son interaction avec le transporteur ABC en fonction de sa stœchiométrie étant une hypothèse à vérifier ; des protéines ou des sous-complexes de la chaîne respiratoire, ce qui permettrait de livrer directement les cytochromes de type *c* nouvellement assemblés sur leur lieu d'activité.

Voie de liaison de l'hème et de l'apocytochrome : Une interaction entre l'hème lyase putative CcmF et AtCCMH

Le gène nucléaire *AtCCMH* est l'orthologue des gènes bactériens *ccmH/cycL/ccl2*. AtCCMH est une protéine membranaire monotopique de type I avec un motif RCXXC conservé dans sa partie N-terminale orienté du côté de l'espace intermembranaire des mitochondries. Cette protéine est aussi le seul composant de la voie de réduction de l'apocytochrome retrouvé dans les mitochondries d'*Arabidopsis*. Chez les bactéries, plusieurs résultats indiquent que CcmH a un rôle dans des réactions redox (Fabianek *et al.*, 1999; Monika *et al.*, 1997). Les cystéines du domaine D1 d'AtCCMH, orientées *in vivo* vers l'espace intermembranaire, peuvent former un pont disulfure réduit par différents réducteurs enzymatiques *in vitro*. De plus une forme réduite du domaine D1 est capable de réduire un pont disulfure intramoléculaire au niveau du motif de liaison à l'hème d'un modèle peptidique de l'apocytochrome *c in vitro* (Meyer *et al.*, 2005).

Chez les bactéries, CcmH est supposé avoir un rôle structurel conjointement avec CcmF, dont le domaine WWD et certaines histidines conservées sont fonctionnellement requises, afin de présenter l'hème et l'apocytochrome en une conformation permettant leur assemblage (Ren *et al.*, 2002). Chez *E. coli*, des expériences de co-immunoprécipitation ont permis de déterminer qu'AtCCMH interagit avec EcCcmF bien que cette interaction n'ait pas permis une complémentation fonctionnelle (Meyer *et al.*, 2005).

Les tests d'interaction de type double hybride réalisés dans le cadre de cette thèse ont confirmé l'interaction entre le domaine comportant le motif WWD d'AtCcmF_{N2} et le domaine D1 comportant le motif conservé RCXXC d'AtCCMH. Ces résultats, combinés aux interactions détectées entre le cytochrome *c* d'une part et AtCCMH et AtCcmF_{N2} d'autre part (Meyer *et al.*, 2005; Rayapuram *et al.*, 2008), vont dans le sens d'une coopération entre ces deux protéines pour la formation d'un complexe hème lyase.

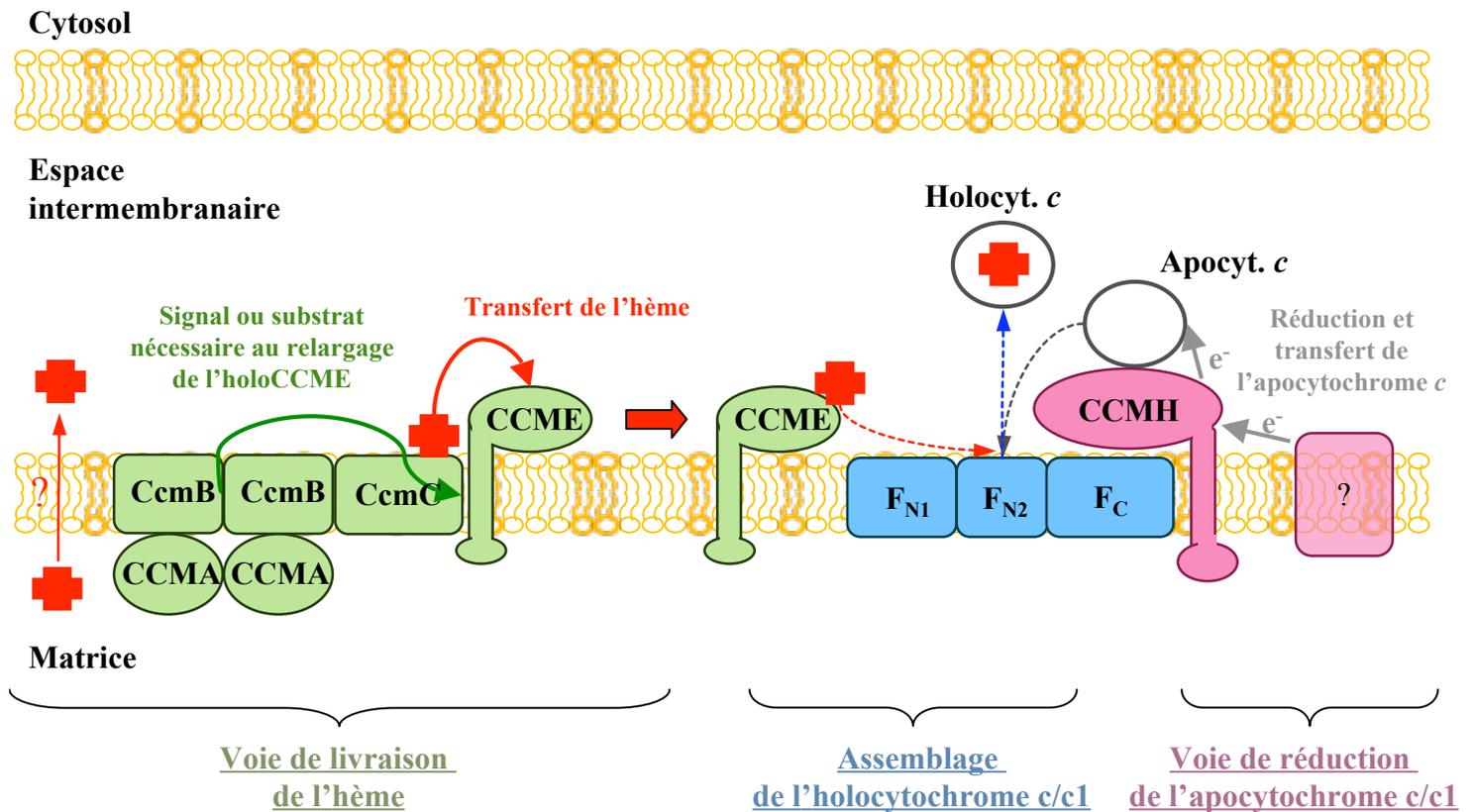


Figure 41 : Modèle fonctionnel et séquentiel pour l'assemblage des cytochromes de type *c* dans la mitochondrie d'*Arabidopsis*.

L'hème est importé dans l'espace intermembranaire par un processus inconnu. L'hème s'associe à AtCcmC puis est transféré à AtCCME. Grâce à un changement de conformation ou à un substrat transporté par le transporteur ABC constitué d'AtCCMA et d'AtCcmB (et peut-être AtCcmC), l'holoAtCCME livre l'hème aux protéines AtCcmF.

De son côté, AtCCMH et peut-être d'autres protéines partenaires, réduisent l'apocytochrome de type *c*.

Les protéines AtCcmF procèdent alors à l'assemblage de l'apocytochrome et de l'hème pour former l'holocytochrome.

De plus, les nombreux partenaires potentiels d'AtCcmF_{N2} (avec AtCcmF_{N1}, AtCcmF_C, AtCCMH, le cytochrome *c* et *c*₁) révélés par les tests d'interaction split-ubiquitin rendent d'autant plus plausible l'hypothèse que les protéines AtCcmFs soient le point de convergence de deux voies métaboliques : La voie de livraison de l'hème (effectuée par les protéines AtCCMA, B, C et E) et la voie de réduction/liaison de l'apocytochrome (AtCCMH et AtCcmFs) (Fig. 41).

Il serait intéressant d'étudier davantage les interactions entre ces protéines. Il serait par exemple possible de reproduire le test d'interaction entre des versions mutés d'AtCCMH et d'AtCcmF_{N2}, essentiellement au niveau de leurs domaines conservés (RCXXC pour AtCCMH et WWD pour AtCcmF_{N2}) afin de vérifier leur importance pour les interactions entre protéines. En effet, des tests d'interaction double hybride précédemment effectués entre des mutants AtCCMH et les apocytochromes de type *c* suggèrent que l'interaction entre AtCCMH et l'apocytochrome *c* se fait en dehors du motif RCXXC (Hammani, 2006). Il faudra vérifier si la mutation de l'une ou l'autre de ces cystéines conservées a une influence sur l'interaction entre AtCCMH et AtCcmF_{N2}.

De même, afin de confirmer que les protéines AtCcmFs représentent bien le point de convergence de la voie de livraison de l'hème et de liaison à l'apocytochrome, un test d'interaction entre le chaperon d'hème AtCCME et les différentes protéines AtCcmFs pourrait être réalisé. Si une interaction est effectivement détectée entre AtCCME et AtCcmF_{N2}, il serait intéressant de reproduire ce test d'interaction avec des versions mutées d'AtCcmF_{N2} au niveau du motif WWD.

Recherche des partenaires d'AtCCMH dans la voie de réduction de l'apocytochrome *c*

Chez les bactéries, la formation d'holocytochromes *c* nécessite une réduction de l'apocytochrome dans laquelle sont impliquées trois types de protéines : les oxidoreductases périplasmiques Dsb, la thioredoxine CcmG et la thiol-disulfure oxidoreductase CcmH (Fabianek *et al.*, 2000). À ce jour, seul l'orthologue de CcmH a été retrouvé chez les mitochondries de plantes. Nous avons voulu rechercher si des protéines orthologues ou ayant repris des fonctions similaires existent dans les mitochondries d'*Arabidopsis*.

Pour réaliser ce projet, nous avons procédé au criblage de type double hybride split-ubiquitin d'une banque d'ADNc en utilisant la protéine AtCCMH comme appât. Ce criblage a révélé un très grand nombre de candidats positifs, un cas de figure fréquent dans ce type d'expérience (von Mering *et al.*, 2002).

Bien que ce nombre élevé de faux positifs puisse être la conséquence d'un problème technique, ce résultat pourrait s'expliquer par le fait qu'AtCCMH, exprimée chez la levure et ancrée dans d'autres membranes que la membrane interne des mitochondries d'*Arabidopsis*, puisse interagir avec un large spectre de protéines. Une partie des faux positifs peuvent aussi s'expliquer par le fait que certaines cellules de levures ont été cotransformés avec plusieurs constructions de la banque d'ADNc au lieu d'une seule.

La grande majorité des candidats positifs révélés ne correspondent pas à des protéines mitochondriales. De ce fait, ces candidats ont certainement peu de signification biologique, car n'étant pas dans le même compartiment cellulaire qu'AtCCMH *in vivo*. Néanmoins, certains de ces candidats ont peut-être une signification fonctionnelle. Trois protéines, retrouvées plusieurs fois parmi les candidats positifs, ont retenu notre attention. L'ascorbate peroxydase (APX1), la glyceraldehyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) et la galacturonosyltransférase (GAUT1) sont des protéines ayant toutes des fonctions et des localisations cellulaires différentes. Néanmoins, toutes présentent des caractéristiques qui pourraient expliquer leur interaction avec AtCCMH dans les cellules de levures.

L'ascorbate peroxydase représente un candidat particulièrement intéressant car certaines de ses isoformes sont retrouvées dans les mitochondries et elle est une cible potentielle des thioredoxines. Il serait donc intéressant de vérifier si une interaction est détectée entre une des isoformes mitochondriales de l'ascorbate peroxydase et AtCCMH.

De même, il serait également intéressant de tester les interactions d'AtCCMH avec d'autres protéines connues pour être des cibles de thioredoxines ou de glutaredoxines, comme la phosphoglycerate kinase, afin de déterminer les caractéristiques des partenaires d'AtCCMH. De plus, la cotransformation dans une cellule de levure de mutants d'AtCCMH au niveau du motif RCXXC d'une part et les candidats précédemment décrits d'autre part nous permettrait d'évaluer le rôle des résidus cystéines pour ces interactions.

Les précédentes expériences utilisant le double hybride classique pour la détection des cibles des thioredoxines n'ont permis de révéler qu'un faible nombre de candidats (Junn *et al.*, 2000; Matsumoto *et al.*, 2002; Nishiyama *et al.*, 1999; Yamanaka *et al.*, 2000). Mais il existe un système double hybride particulier développé par le groupe d'Yves Meyer, utilisant des souches de levures CY306, permettant une identification spécifique et efficace des cibles des thioredoxines (Vignols *et al.*, 2005). Cette souche particulière comporte une mutation au niveau des thioredoxines cytosoliques endogènes de la levure et permet de stabiliser les interactions effectuées via un pont disulfure avec une thioredoxine mutante. L'emploi de ce

système en utilisant AtCCMH comme appât pourrait permettre la détection d'autres candidats dans le cadre d'un nouveau criblage et permettre de confirmer certains candidats.

Conclusion

De multiples constructions double hybride, classique et split-ubiquitin, ont été produites au cours de cette thèse. Seules quelques constructions manquent pour couvrir l'ensemble des protéines ccm. Cette collection de constructions permettra de tester d'autres interactions potentielles intéressantes. Par exemple : AtCCME contre AtCCME afin vérifier si une dimérisation de cette protéine est possible, comme cela a été observé pour EcCcmE chez les bactéries (Christensen, 2005). Toujours chez les bactéries, des expériences de type GST pull down ont montré une interaction entre EcCcmB et EcCcmC (Feissner *et al.*, 2006a) sans toutefois démontrer que cette interaction soit directe. L'utilisation des constructions double hybride nous permettrait peut-être de vérifier si une telle interaction existe dans les mitochondries d'*Arabidopsis* et éventuellement par quels domaines.

Les protéines impliquées dans la maturation des cytochromes de type *c* disposent de différents motifs typiques conservés dont le rôle dans les interactions inter-protéines reste à confirmer : certains résidus conservés chez AtCcmB, le motif WWD porté par AtCcmC et AtCcmF_{N2}, le motif RCXXC d'AtCCMH, certains domaines de l'apocytochrome *c* etc... Une mutation ponctuelle visant ces motifs dans le cadre d'un test d'interaction double hybride permettrait de caractériser leurs importances pour l'interaction entre protéines.

On peut aussi envisager l'emploi d'autres techniques, permettant de tester les interactions entre protéines, qui pourraient être utilisées pour confirmer certains résultats ou se substituer aux cas où les techniques double hybride se révèlent incompatible.

Ces études d'interaction permettraient à terme d'apporter des éléments de réponses concernant la composition et les fonctions de l'ensemble des protéines ccm. Des immunodétections sur des complexes protéiques natifs nous ont appris qu'AtCCMA est retrouvée dans un complexe proche de celle du complexe III de la chaîne respiratoire, soit environ 480 kDa, et qu'AtCCMH et les protéines AtCcmF sont retrouvées dans un complexe de plus grande taille (estimé à environ 500 kDa). Ces données démontrent que les protéines ccm sont présentes dans au moins deux complexes qui pourraient correspondre respectivement à la voie de la livraison de l'hème et à la voie de l'hème lyase (Fig. 41).

À terme, nous espérons fournir des éléments qui aideront à répondre aux questions majeures de la biogenèse des cytochromes de type *c* dans les mitochondries de plantes telles :

L'import des apocytochromes *c* et de certaines protéines ccm (ex. : AtCCMA et AtCCMH sont codées par le génome nucléaire, mais leur mécanisme d'importation dans l'IMS est encore inconnu) ; La synthèse de l'hème et son import dans l'espace intermembranaire ; L'origine des hèmes lyases du système III ; Les divergences du système I retrouvé dans les mitochondries de plantes par rapport au système I retrouvé chez les bactéries ; Les raisons évolutives qui sont à l'origine de la rétention du système I dans les mitochondries de plantes et sa coexistence avec le système II utilisé par les chloroplastes.

Annexes

ccmX : Gène bactérien ou mitochondrial

CCMX : Gène nucléaire

CcmX : protéine bactérienne ou codée par le génome mitochondrial

CCMX : Protéine codée par le génome nucléaire

Annexe 1 : Nomenclature

Code	Gène	Taille	Séquence	Description
Z0466	AICcMB	33	GGAGATAGAACCAATGAGACGACTTTTTTGGAA	oligo forward pour le clonage de la boucle extramembranaire 1 de AICcMB
Z0467	AICcMB	33	TCCACCTCCGGATACAGATGGTGGGAGGAGAA	oligo reverse pour le clonage de la boucle extramembranaire 1 de AICcMB
Z0468	AICcMB	30	GGAGATAGAACCAATGCGCTTAATGCTAGTGT	oligo forward pour le clonage de la boucle extramembranaire 2 de AICcMB
Z0469	AICcMB	30	TCCACCTCCGGATACACAAATCAAACTAA	oligo reverse pour le clonage de la boucle extramembranaire 2 de AICcMB
Z0472	AICcMB	33	GGAGATAGAACCAATGTTTACACTTTTGTACCAA	oligo forward pour le clonage de la boucle extramembranaire 4 de AICcMB
Z0473	AICcMB	33	TCCACCTCCGGATACCACTAATAAATGTTTAA	oligo reverse pour le clonage de la boucle extramembranaire 4 de AICcMB
Z0476	AICcMB	33	GGAGATAGAACCAATGCTAACCGTTTGTGAC	oligo forward pour le clonage de la boucle extramembranaire 6 de AICcMB
Z0477	AICcMB	33	TCCACCTCCGGATACCACTAATAAATGTTTAAAG	oligo reverse pour le clonage de la boucle extramembranaire 6 de AICcMB
Z0478	AICcMB	33	GGAGATAGAACCAATGTTTGTGCTGATCTCT	oligo forward pour le clonage de CCMA avec Gateway
Z0491	AICcMB	33	GGAGATAGAACCAATGAGGCTCAAAATCCCTCGG	oligo reverse pour le clonage de CCMA avec Gateway
Z0492	AICcMB	33	TCCACCTCCGGATACCACTAATAAATGTTTAAAG	oligo anti sens pour le clonage de CCMA avec Gateway
Z0493	AICcMB	33	GGAGATAGAACCAATGATTTGGTTATTTCTTTGG	oligo sens pour le clonage de CCMB avec Gateway
Z0494	AICcMB	33	GGAGATAGAACCAATGGGTATGATCTTTGTTGG	oligo sens pour le clonage de CCMB avec Gateway
Z0495	AICcMB	33	TCCACCTCCGGATACATAGGGGCAATAAAGTGGG	oligo anti sens pour le clonage de CCMB avec Gateway
Z0496	AICcMB	33	GGAGATAGAACCAATGACTTTTCTTCTGACTCT	oligo sens pour le clonage de CCMB avec Gateway
Z0497	AICcMB	33	TCCACCTCCGGATACATTTTGAATAAACCCAGTGG	oligo anti sens pour le clonage de CCMB avec Gateway
Z0511	technique	25	TCCGCTTAACCGTAGCATGGATGGATCTC	oligo antisense pour le clonage de CCMB avec Gateway
Z0513	AICcMB	35	TCCACCTCCGGATACCACTTGTAAACAATACTGAGA	SEQUENCE FLANQUANTE DU POLYLINKER DU PLASMIDE pDONR207
Z0535	1-DNA	24	AGGCACATGGGATGCTGCTTGCGAC	Séquence 3' codant pour le 7ème domaine extramembranaire de la protéine AICcMB
Z0536	1-dna	23	AAGCTGAGACAAACCCCTCAACTGG	Oligo LB de 1-DNA pGKB5 calculé par maovevector pour genotypage charant avec Z0537
Z0537	CCMA	24	GTCGTGAGCAATGCCAAAGGATTTTC	Oligo reverse de CCMA (position 219 / ATG)
Z0538	CCMA	18	AAACATCCCTGTTGCTTTGG	Oligo sens situé dans la région 3' de CCMA (utilisé pour PCR avec comme matrice l'ADN du mutant SALK_120966, spécifique du FST correspondant)
Z0539	CCMA	20	CTTTGCTTTGGAGTCAATC	Oligo sens situé dans la région 5' d'UTR de CCMA (utilisé pour PCR avec comme matrice l'ADN des mutants SALK_010633 et SALK_010921, spécifique des FST correspondant)
Z0541	CCMA	57	ACAAGTGTGTACAAAGCGGCTCCAAACCACTGTCTATCAGGAGGCTCCAAATC	Oligo destiné à la fabrication d'une protéine de fusion pour le split ubiquitine comprenant la partie 5' anti sens de CCMA plus un linker adapté
Z0542	CCMB	61	TCGCGCACACCAACACTTGTGACAGAAAGCTGGGTGAGAAATGCTTCGACGAGTCAAGC	Oligo destiné à la fabrication d'une protéine de fusion pour le split ubiquitine comprenant la partie 5' anti sens de CCMA plus un linker adapté
Z0543	CCMB	55	ACAAGTGTGTACAAAGCGGCTCCAAACCACTGTCTATCAGGAGGCTCCAAATC	Oligo destiné à la fabrication d'une protéine de fusion pour le split ubiquitine comprenant la partie 5' anti sens de CCMB plus un linker adapté
Z0544	CCMC	62	TCCGCGCACACCAACACTTGTGACAGAAAGCTGGGTGAGAAATGCTTGTAAACAATACTGAGACCG	Oligo destiné à la fabrication d'une protéine de fusion pour le split ubiquitine comprenant la partie 5' anti sens de CCMB plus un linker adapté
Z0545	CCMC	56	ACAAGTGTGTACAAAGCGGCTCCAAACCACTGTCTATCAGGAGGCTCCAAATC	Oligo destiné à la fabrication d'une protéine de fusion pour le split ubiquitine comprenant la partie 5' anti sens de CCMB plus un linker adapté
Z0546	1-dna	20	CGGATTTCTGGGCTGCTGGC	Oligo antisens situé à l'extrémité du LB du pGKB5 (Versailles) avant le site de jonction border signal. Mismatch tt = AA dans la séquence du 1-DNA.
Z0547	CCMA	23	GAGTCGCGCAATACAACTCCCT	Oligo antisens situé à 526 nt en aval du stop codon de CCMA (utilisé pour tester la présence ou l'absence d'une insertion d'un mutant SALK)
Z0548	CCMA	21	ACTTTGAGGGGTGTTTCTGTCAG	Oligo antisens situé à 564 nt / ATG de CCMA (utilisé pour tester la présence ou l'absence d'une insertion d'un mutant SALK)
Z0635	CemC	33	GGAGATAGAACCAATGCTTCTGTTATACAA	Oligo anti sens pour le clonage du premier domaine extramembranaire de CemC en vu d'expérience double hybride
Z0636	CemC	33	TCCACCTCCGGATACATGGCGTAGAGCTTGTGTT	Oligo anti sens pour le clonage du 2ème domaine extramembranaire de CemC en vu d'expérience double hybride
Z0637	CemC	33	GGAGATAGAACCAATGGGAGTGGACCACTAGAT	Oligo anti sens pour le clonage du 3ème domaine extramembranaire de CemC en vu d'expérience double hybride
Z0638	CemC	33	TCCACCTCCGGATACAAATGATACATAGAGAAAT	Oligo anti sens pour le clonage du 4ème domaine extramembranaire de CemC en vu d'expérience double hybride
Z0639	CemC	33	GGAGATAGAACCAATGATTAACCACTTTCTGTTC	Oligo anti sens pour le clonage du 5ème domaine extramembranaire de CemC en vu d'expérience double hybride
Z0640	CemC	33	TCCACCTCCGGATACAAAAGCCCACTTCTAT	Oligo anti sens pour le clonage du 6ème domaine extramembranaire de CemC en vu d'expérience double hybride
Z0641	CemC	33	GGAGATAGAACCAATGGGGTTTGGGGAAGACA	Oligo anti sens pour le clonage du 7ème domaine extramembranaire de CemC en vu d'expérience double hybride
Z0642	CemC	33	TCCACCTCCGGATACAGTTCAAAGGAGATCCCA	Oligo anti sens pour le clonage du 8ème domaine extramembranaire de CemC en vu d'expérience double hybride
Z0643	CemC	33	GGAGATAGAACCAATGCTGGTGCAGCTGTGTT	Oligo anti sens pour le clonage du 9ème domaine extramembranaire de CemC en vu d'expérience double hybride
Z0644	CemC	33	TCCACCTCCGGATACAAATTAATAAATAGAAAGC	Oligo anti sens pour le clonage du 10ème domaine extramembranaire de CemC en vu d'expérience double hybride
Z0645	CemC	33	GGAGATAGAACCAATGTCAGTCACTGGTGAAT	Oligo anti sens pour le clonage du 11ème domaine extramembranaire de CemC en vu d'expérience double hybride
Z0646	CemC	33	TCCACCTCCGGATACAAAGCAACATGTAATGAT	Oligo anti sens pour le clonage du 12ème domaine extramembranaire de CemC en vu d'expérience double hybride
Z0650	CemC	33	GGAGATAGAACCAATGACAGCTCTTATCTA	Oligo anti sens pour le clonage du 13ème domaine extramembranaire de CemC en vu d'expérience double hybride
Z0651	CemC	33	TCCACCTCCGGATACAGTTTGGTATCTCTC	Oligo anti sens pour le clonage du 14ème domaine extramembranaire de CemC en vu d'expérience double hybride
Z0658	CemE	36	GGAGATAGAACCAATGGAGTGTGTTATGTCGGT	Oligo anti sens pour le clonage du 15ème domaine extramembranaire de CemE en vu d'expérience double hybride
Z0659	CemE	36	TCCACCTCCGGATACAAAGCCGCTTGTGATGTCAGG	Oligo anti sens pour le clonage du 16ème domaine extramembranaire de CemE en vu d'expérience double hybride
Z0660	CemE	39	GGAGATAGAACCAATGCAATTCAGGATGCTGCTTC	Oligo anti sens pour le clonage du 17ème domaine extramembranaire de CemE en vu d'expérience double hybride
Z0661	CemE	36	TCCACCTCCGGATACAAAGCCGCAACTCAGCAGC	Oligo anti sens pour le clonage du 18ème domaine extramembranaire de CemE en vu d'expérience double hybride
Z0671	atCemF	33	GGAGATAGAACCAATGCTGTGATATTTCAAT	Oligo anti sens pour le clonage du domaine extramembranaire 3 de CemFNI en double hybride
Z0678	atCemF	33	GGAGATAGAACCAATGCTGTGATACCAATGAT	Oligo anti sens pour le clonage du domaine extramembranaire 3 de CemFNI en double hybride
Z0679	atCemF	33	GGAGATAGAACCAATGCTGTGATACCAAGAA	Oligo anti sens pour le clonage du domaine extramembranaire 5 de CemFNI en double hybride
Z0680	atCemF	33	TCCACCTCCGGATACAGATAGAACGCTCTCTC	Oligo anti sens pour le clonage du domaine extramembranaire 5 de CemFNI en double hybride
Z0681	atCemF	33	GGAGATAGAACCAATGATAGGAGTTCGATCTCT	Oligo anti sens pour le clonage du domaine extramembranaire 6 de CemFNI en double hybride
Z0682	atCemF	33	TCCACCTCCGGATACAGTACTTGTGAGTGGT	Oligo anti sens pour le clonage du domaine extramembranaire 6 de CemFNI en double hybride
Z0685	atCemF	33	GGAGATAGAACCAATGAAAGAGATACAGTCTACT	Oligo anti sens pour le clonage du domaine extramembranaire 6 de CemFNI en double hybride
Z0691	atCemF	33	TCCACCTCCGGATACAAAAGGCACTTCAAT	Oligo anti sens pour le clonage du domaine extramembranaire 6 de CemFNI en double hybride
Z0692	atCemF2	33	GGAGATAGAACCAATGATTTGATGATGTTGGTGG	Oligo anti sens pour le clonage du domaine extramembranaire 2 de CemF2 en double hybride
Z0693	atCemF2	33	TCCACCTCCGGATACAAAAGTCAATAATAATGCG	Oligo anti sens n°3 pour le clonage du domaine extramembranaire 2 de CemF2 en double hybride
Z0694	AICcMA	49	GGGGCAAGTTTGTACAAAAGAGGCTTGCCTTGGTGAACCTGCT	Oligo sens pour le clonage de AICcMA en vu d'une complémentation in planta (contient 1206 nucléotides en amont de l'ATG ini de AICcMA)
Z0695	AICcMA	51	GGGGCAAGTTTGTACAAAAGAGGCTGGTTCAGAAATGCTGCAGCATCAAG	Oligo anti sens pour le clonage de AICcMA en vu d'une complémentation in planta (contient 1206 nucléotides en amont de l'ATG ini de AICcMA)
Z0700	AICcMB	39	GGAGATAGAACCAATGCTTCTTCAACCTTCTCCGATCTCTC	Oligo sens en vu d'un clonage pour un test double hybride. Le domaine hydrophobe de CCMB est reconstruit afin de cloner les domaines les mieux conservés.
Z0701	pGWB10	18	TCTAGAGTATCAACAAG	Oligo sens destiné au séquençage de la cassette de clonage gateway du vecteur pGWB10
Z0702	pGWB10	18	GAGCTTAGCTCTGTGCA	Oligo anti sens destiné au séquençage de la cassette de clonage gateway du vecteur pGWB10
Z0703	pMDC99	18	GAATTCGAGCTCCACCTG	Oligo anti sens destiné au séquençage de la cassette de clonage gateway du vecteur pMDC99
Z0704	pMDC99	18	GAATTCGAGCTCCACCTG	Oligo anti sens destiné au séquençage de la cassette de clonage gateway du vecteur pMDC99
Z0717	AICcMH	60	ACAAGTGTGTACAAAAGAGGCTTCCAAACCACTGGGAAACAGAGAGAGAGG	Oligo forward pour le clonage de AICcMH en vue d'un criblage split ubiquitine
Z0718	AICcMH	57	TCCGCGCACACCAACACTTGTACAGAAAGCTGGTATCCGCTTCCCT	Oligo reverse pour le clonage de AICcMH en vue d'un criblage split ubiquitine
Z0719	NubG	20	GTGGAATAATCAAGCAAGG	Oligo forward utilisé pour le criblage split ubiquitine (séquençage des clones positifs)
Z0720	NubG	24	GTACTCAAGCAAGAAATTTTCG	Oligo reverse utilisé pour le criblage split ubiquitine (séquençage des clones positifs)
Z0721	pMDC	18	TCCGAGGCGGCCAAGCTAT	Oligo forward utilisé pour tester la présence d'un t-DNA issu du vecteur pMDC99 dans l'ADN d'une plante transformée
Z0722	pMDC	18	GAATTCGAGCTCCACCGC	Oligo reverse utilisé pour tester la présence d'un t-DNA issu du vecteur pMDC99 dans l'ADN d'une plante transformée
Z0723	PR3	18	AAGCGTGCATAACTAATATAC	Oligo reverse utilisé pour le criblage split ubiquitine (séquençage des clones positifs)

Annexe 2 : Liste des amorces utilisés

Protéine	Localisation	Organisme	Type	Dilution	Références/sources
AtCCMA	Mitochondrie - Membrane interne	<i>A. thaliana</i>	Polyclonal, lapin	1000	Rayapuram et Hagenmuller, 2007
AtCcmB	Mitochondrie - Membrane interne	<i>A. thaliana</i>	Polyclonal, lapin	2000	Rayapuram, 2005
AtCcmC	Mitochondrie - Membrane interne	<i>A. thaliana</i>	Polyclonal, lapin	5000	Bonnard et Faivre-Nitschke, 2001
AtCCMH	Mitochondrie - Membrane interne	<i>A. thaliana</i>	Polyclonal, lapin	500	Meyer, 2005
Anti-VP16	Tag	/	Monoclonal, lapin	2000	SIGMA
Anti-Myc	Tag	/	Monoclonal, lapin	5000	SIGMA
Anti-HA	Tag	/	Monoclonal, souris	40000	SIGMA

Annexe 3 : Liste des anticorps utilisés

Valorisation des compétences
« Un Nouveau Chapitre de la Thèse »

Sujet

**"Étude d'interactions fonctionnelles de protéines mitochondriales
de la plante *Arabidopsis thaliana*"**

Jérémi HAGENMULLER

École Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé de STRASBOURG

**Directeurs de thèse : Jean-Michel GRIENENBERGER
Philippe GIEGE**

Mentor du NCT: Pascale KLEIN

Date probable de soutenance : octobre 2008

I. Cadre général et enjeux

1. Introduction

Ma thèse, dont l'intitulé exact est « Etude des interactions fonctionnelles des protéines impliquées dans la maturation des cytochromes de type *c* chez *Arabidopsis thaliana* », constitue un travail de recherche centré sur un élément essentiel de la cellule : la mitochondrie. Cette organelle, retrouvée dans les cellules eucaryotes de toutes les espèces du monde animal et végétal, est souvent comparée à une unité de production d'énergie nécessaire à l'organisme. Mais son rôle au sein de la cellule est bien plus étendu. Son implication directe dans des processus biologiques tels l'apoptose (mort cellulaire programmée), la stérilité mâle cytoplasmique (utilisée en agronomie pour créer des lignées hybrides) et diverses maladies (Syndrome de Leigh, myopathie mitochondriale) font de la mitochondrie un sujet d'étude important au niveau scientifique fondamental, agroalimentaire et pharmaceutique.

La mitochondrie fournit de l'énergie sous forme d'ATP (adénosine triphosphate). La fabrication de cette molécule nécessite un transfert d'électron au sein de complexes protéiques de la mitochondrie. Ce transfert est assuré, entre autres, par des pigments cellulaires appelés cytochromes. Il existe un type de cytochrome, les cytochromes de type *c*, essentiel à la survie de l'organisme. Les cytochromes de type *c* se composent de 2 parties : une partie étant le groupement prosthétique (un hème comportant un atome de fer) et une partie étant une protéine, l'apocytochrome *c*. Mon laboratoire s'intéresse tout particulièrement à l'assemblage de ces 2 parties, ce qui constitue le processus biologique appelé « maturation ». Un ensemble de protéines, appelées CCM (Cytochrome *c* Maturation), est directement impliqué dans cet assemblage. En étudiant les différentes interactions entre ces protéines et leurs partenaires, j'ai obtenu au cours de mes 3 années de thèse des résultats concrets qui ont permis une meilleure compréhension du fonctionnement de la maturation de ces cytochromes.

2. Résultats attendus

Originellement, ma thèse se focalisait sur 2 protéines particulières impliquées dans la maturation des cytochromes *c*. Les résultats obtenus ont permis de confirmer leur interaction et le fait qu'elles forment un transporteur dans la membrane interne des mitochondries. L'étape suivante aurait dû être la caractérisation du substrat de ce transporteur. Mais des expériences effectuées par d'autres laboratoires chez les bactéries m'ont poussé à changer de stratégie : la possibilité que ce transporteur remplisse son rôle dans le processus de maturation en changeant de conformation et non en transportant un substrat.

En accord avec mon directeur de thèse, la suite de ma thèse s'est focalisée sur les interactions fonctionnelles des autres protéines CCM. Dans cette optique, j'ai ainsi obtenu des résultats couvrant l'ensemble de ces protéines dans la mitochondrie de la plante modèle *Arabidopsis*.

Parallèlement à ces études d'interaction, l'importance d'une des protéines CCM a aussi été analysée par le biais de lignées de plantes génétiquement modifiées. Ceci afin d'apporter un point de vue génétique à l'étude.

3. Les enjeux scientifiques, techniques et socio-économiques

3.1. Les enjeux scientifiques

Ces travaux de thèse ont été réalisés dans une optique de recherche fondamentale. Mais toute recherche appliquée se fonde sur les résultats de ce type de recherche. La compréhension du mécanisme d'assemblage des cytochromes *c* permettrait à terme de mieux comprendre la manière dont les hémoprotéines sont synthétisées. Cela pourrait avoir des applications dans le domaine médical par la synthèse d'hémoprotéines artificielles comme l'hémoglobine. De façon plus générale, ces travaux apportent des informations sur la manière dont l'organisme gère le trafic, la livraison et l'assemblage des protéines. Une partie de mes travaux a par exemple porté sur un exemple unique de transporteur transmembranaire composé de 2 protéines issues de génomes différents (l'une étant codé par noyau et l'autre par la mitochondrie).

3.2. Les enjeux techniques

Techniquement, mon travail a nécessité beaucoup de clonages. Certains effectués selon des méthodes classiques (digestion puis religation de vecteurs de clonage) ou plus récentes (méthode Gateway). J'ai essentiellement employé des techniques visant à tester l'interaction de protéines. Certaines étant bien connues du monde scientifique (double hybride et criblage chez la levure) et d'autres étant moins employées (split ubiquitine). J'ai également utilisé des techniques de génétique *in vivo* en étudiant des lignées de plantes mutantes. Dans l'ensemble, j'ai eu recours à des méthodes variées afin d'obtenir mes propres résultats ainsi que compléter certaines expériences de mes prédécesseurs.

3.3. Les enjeux socio - économiques

Il faut savoir que le système de maturation retrouvé dans les mitochondries d'animaux est très différent de celui retrouvé chez les mitochondries de plantes. Confronter les recherches étudiant ces différents systèmes pourrait permettre de comprendre comment des protéines ou complexes protéiques différents sont parvenus à des fonctions similaires. Il n'est pas non plus exclu d'imaginer à moyen terme que ces recherches aboutissent à l'invention d'un désherbant total interagissant spécifiquement au niveau de l'assemblage du cytochrome chez la plante sans être toxique pour les animaux et l'homme.

4. Le contexte scientifique

4.1. Au sein du laboratoire

Mes travaux ont été effectués au sein l'IBMP (Institut de Biologie Moléculaire des Plantes) de Strasbourg. Plus précisément dans le laboratoire dont la thématique est « Biogenèse des mitochondries dans la cellule végétale » sous la direction de Mme Bonnard. Ce même laboratoire travaille conjointement avec les autres laboratoires de l'étage autour de l'étude des mitochondries végétales. Bien que chaque équipe ait un sujet de recherche précis, tous utilisent des techniques et du matériel en commun.

4.2. Sur le plan international

Bien que plusieurs laboratoires travaillent sur la maturation des cytochromes de type *c*, mon laboratoire d'accueil est le seul étudiant ce sujet chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*. En effet, ce thème de recherche est beaucoup plus approfondi chez les bactéries (tout particulièrement la bactérie modèle *E. coli*). De ce fait, nos rapports avec ces laboratoires sont beaucoup plus d'ordre collaboratif que compétitif.

Au niveau de l'avancement global des travaux, le processus de maturation est donc bien mieux compris chez les bactéries que chez les plantes du fait du nombre d'équipes plus important travaillant sur ce sujet. Néanmoins, les recherches effectuées par ces équipes représentent des informations précieuses pour mes travaux. Il n'est pas rare que les protéines trouvées chez les plantes aient un comportement similaire chez les protéines homologues des bactéries.

Bien qu'étant la seule équipe à travailler sur ce thème précis, ses participations à de nombreux congrès et ses publications régulières dans des journaux à fort facteur d'impact lui ont valu une reconnaissance au niveau international.

5. Moyens disponibles

5.1. Les moyens scientifiques

L'IBMP organise chaque semaine un séminaire en rapport avec ses thématiques (mitochondries, biologie cellulaire, virologie, isoprénoides etc...) présenté par des intervenants aussi bien externes qu'internes. Ces présentations permettent de se tenir au courant des dernières évolutions à la fois au niveau scientifique et technique. De manière également hebdomadaire, un autre séminaire est donné entre les membres des équipes travaillant sur les mitochondries végétales. Y sont présentés de manière plus spécifique les dernières manipulations et résultats ainsi qu'une discussion ouverte sur les résultats, les différents problèmes rencontrés et les solutions possibles.

Les membres de l'institut ont accès aux différentes bibliothèques du campus ainsi qu'aux versions électroniques des dernières publications scientifiques. Ces différents outils m'ont été d'une aide capitale afin de cerner mon sujet.

5.2. Les moyens techniques

L'IBMP dispose d'un grand panel de matériels et plates-formes techniques. Mes travaux de thèse ont nécessité l'utilisation d'appareils classiques tels que centrifugeuses, machines à PCR, machine d'électrophorèse, hottes stériles etc... Mais aussi de matériels biologiques plus rares (banques d'ADN, souches de levures, lignées spécifiques de plantes, plasmides particuliers) ainsi que le recours aux services des serres et des plateformes de microscopie et de séquençage. La plateforme de séquençage d'ADN a été particulièrement précieuse pour l'avancement de mes recherches afin de vérifier l'exactitude de mes clonages. L'appareil, financé conjointement par la région Alsace, le CNRS, l'ULP et Tépral, m'a permis d'obtenir rapidement les séquences de différents échantillons, étape souvent essentielle pour procéder à la suite des manipulations. Le financement apporté par l'ANR (Agence Nationale de la Recherche) et par les différents contrats remportés par l'institut permettent le renouvellement régulier du matériel.

5.3. Les moyens humains

Ma thèse a été réalisée avec la collaboration des membres permanents de mon équipe, soit deux directeurs de recherche et un chargé de recherche. Leur savoir-faire technique ainsi que leurs connaissances dans mon domaine de recherche ont été essentiels pour la réussite de mes expériences. J'ai également profité durant les deux premières années de l'assistance d'une technicienne pour tout ce qui concernait la préparation de différentes solutions et milieux. Les ingénieurs responsables des différentes plates-formes ainsi que les jardiniers en charge des serres ont également contribué au bon déroulement de mes travaux. Parallèlement, notre laboratoire a accueilli pour des périodes déterminées des chercheurs externes qui nous ont transmis leurs propres connaissances, à la fois scientifiques et techniques, dans le cadre de collaborations internationales.

5.4. Appartenance a des réseaux et collaborations

Notre laboratoire a su créer au fil des années de multiples collaborations avec d'autres laboratoires nationaux et internationaux. Au plan local, les membres de notre institut et des autres unités de recherche du campus de l'université Louis Pasteur se retrouvent régulièrement au cours de séminaires et ont la possibilité de participer à des formations organisées par leurs collègues dans des domaines techniques particuliers. Au plan national, nous travaillons avec l'équipe de Jean-Pierre Jacquot de l'Université Henri Poincaré de Nancy ainsi que l'équipe d'Yves Meyer de l'Université de Perpignan. Autre exemple de collaboration nationale : Une partie du matériel biologique utilisé dans le cadre de ma thèse m'a été fournie par Geneviève Ephritikine de l'UFR biologie et science de la nature de Paris.

Dans le cadre d'une collaboration internationale, citons le programme d'échange, auquel j'ai participé dans le cadre d'un transfert de technologie, entre notre laboratoire et celui de Daniel Gonzalez de l'université du littoral de Santa Fe en Argentine. Ce programme permet d'envoyer pour une certaine période un membre permanent ou non permanent au sein du laboratoire partenaire. Citons également le laboratoire de Patrice Hamel de l'Ohio University et Robert Kranz de Washington University tous deux basés aux Etats-Unis avec qui différents articles ont été publiés.

6. Mes convictions vis-à-vis de la thèse

Mon premier contact avec mon laboratoire d'accueil a eu lieu durant l'été 2003. Ayant alors complété ma licence, je souhaitais effectuer un stage de 2 mois en laboratoire afin de réaliser concrètement ce qu'était la recherche scientifique et pouvoir ainsi déterminer la suite de mon cursus. Après plusieurs demandes, j'ai effectué mon stage dans ce qui allait être mon laboratoire de DEA puis de thèse. Pendant ce stage, j'ai été séduit par le sujet, par l'intérêt des techniques employées ainsi que la qualité de l'équipe. C'est aussi pendant cette période que j'ai acquis la conviction de faire un doctorat, convaincu, comme je le suis encore maintenant, que ce diplôme serait un atout pour mon avenir. Une fois mon DEA achevé, je fus suffisamment bien classé

parmi la promotion de l'année pour obtenir une bourse du ministère de la recherche, ce qui me permis de débiter la thèse dès la rentrée suivante.

J'avais choisi de poursuivre une thèse dans le même laboratoire de DEA pour différentes raisons : Cela me permis de compléter les résultats prometteurs obtenus durant cette année (ce qui fit l'objet d'une publication en co-premier auteur dans le Journal of Biological Chemistry). En ce qui concernait le sujet de thèse, il se situait dans la continuité des travaux amorcés par les précédents doctorants. Même si je n'ai eu que peu d'influence sur le choix du sujet, étant déjà très intéressé à l'université par tout ce qui touchait aux méthodes biochimiques, j'ai eu beaucoup de plaisir à réfléchir aux différents protocoles et manipulations nécessaires à ces travaux de recherche. Il est en effet rare qu'une expérience fonctionne au premier essai, elle demande donc des ajustements tant au niveau de la manipulation proprement dite qu'au niveau des réactifs utilisés. Et surtout, c'est la qualité de l'équipe qui me donna confiance en le succès de la thèse. J'avais bien souvent entendu parler de mésententes entre le doctorant et son directeur ce qui pouvait être désastreux pour la conduite du doctorat. À présent en fin de thèse, je peux dire que ma confiance envers l'équipe a été justifiée et que j'y ai toujours trouvé le soutien et la motivation qui m'ont permis d'aller de l'avant.

II. Déroulement, gestion et coût

1. Préparation et cadrage du projet

1.1. Facteurs de succès et de risques, partenariat

Le fait de faire partie de l'unique équipe travaillant sur la maturation des cytochromes *c* chez les plantes ne signifiait pas que rien n'était connu à ce sujet. En effet, il a été démontré que la maturation chez les plantes est restée proche du système bactérien. Le point de départ des nouvelles manipulations partait souvent de données issues d'expériences sur les bactéries. Un des buts de mon équipe est de déterminer les limites des similitudes entre ces deux systèmes de maturation. De même, les laboratoires partenaires mentionnés précédemment sont parfois une source d'information importante quant à l'orientation judicieuse de notre recherche.

Dans la théorie, j'avais donc de bons espoirs d'aboutir à des résultats concrets. Néanmoins, et cela est toujours le cas dans le cadre de la recherche fondamentale, le risque n'est pas absent pour autant. Je me suis plusieurs fois heurté à des problèmes propres aux types de manipulations employées (contaminations, faux positifs etc...). Un autre paramètre important pour confirmer un résultat, surtout en vue d'une publication, est sa reproductibilité par l'utilisation d'une technique différente. Là aussi, il peut arriver que seul un type de technique donne des résultats. Globalement, l'utilisation de techniques complémentaires ainsi qu'une approche à la fois *in vivo* et *in vitro* ont donné des résultats très satisfaisants.

1.2. Propriété intellectuelle

Au moment de la publication des résultats, ces derniers tombent automatiquement dans le domaine public comme cela est toujours le cas pour les travaux de recherches fondamentales. De ce fait il n'y a pas de clauses de confidentialité comme cela est la règle en recherche et développement. Mais il faut garder à l'esprit que la RD se base bien souvent sur des données issues de la recherche fondamentale.

2. Gestion du projet

2.1. Au sein de l'équipe

Un « lab meeting » est organisé de façon bihebdomadaire entre les membres de l'équipe. Le but de ces réunions est d'exposer les tout derniers résultats obtenus ainsi que les problèmes rencontrés. Chaque membre de l'équipe est responsable d'une partie spécifique du projet commun. Notre équipe travaille actuellement sur deux projets majeurs : La maturation des cytochromes *c* et plus récemment l'étude des protéines PPR (pentatricopeptides repeat). Mais cela n'entrave en rien l'unité de l'équipe. Occasionnellement, des collaborations plus ponctuelles ont lieu et impliquent la plupart du temps la participation active d'un membre d'une

autre équipe de recherche.

Les problèmes rencontrés au cours de ma thèse ont été essentiellement d'ordre technique. Comme précédemment mentionné, beaucoup de manipulations nécessitent des ajustements et c'est bien souvent un des sujets centraux abordés lors des réunions de laboratoires. Si une technique reste sans succès après plusieurs variantes, elle est abandonnée au profit d'une technique alternative ou d'une nouvelle orientation de recherche. L'orientation de la recherche est également un sujet important abordé. En discutant des dernières publications concernant les protéines CCM, ma thèse a pris une nouvelle orientation au cours de sa seconde année. Ayant d'abord prévu de focaliser ma recherche sur le transporteur présent dans le système de maturation, j'ai choisi de m'intéresser à l'ensemble des protéines CCM. Il m'était apparu que les chances d'obtenir des résultats publiables en poursuivant l'étude de ce transporteur étaient devenues trop faibles.

La communication au sein de l'équipe en dehors des réunions est excellente. Je ne me suis jamais vu refusé un entretien au moment où survenait une difficulté. Quant à la communication hors équipe, elle se fait souvent par courrier électronique interne. C'est une solution qui s'est avérée être très pratique lors de recherche de manuels, protocoles ou produits chimiques particuliers, la réponse arrivant le plus souvent dans la demi-heure.

3. Coût du projet

3.1. Ressources humaines

Catégorie du personnel	Temps passé pour le projet	Coût total pour le projet
Doctorant	100 %	59.565 euros
Directeur de recherche	25 %	37.500 euros
Chargé de recherche CNRS	25 %	30.000 euros
Technicienne	10% (sur 2 ans)	5.000 euros
TOTAL		132.065 euros

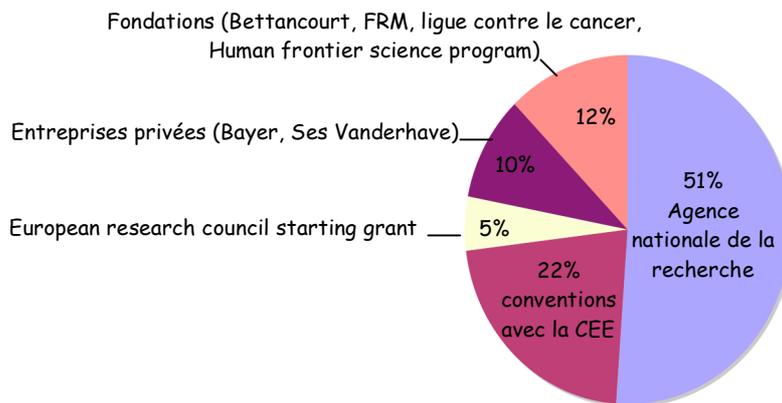
3.2. Autres dépenses associées au projet

Type de dépenses	Coût pour le projet
Matériel courant de laboratoire	4.500 euros
Culture cellulaire	1.300 euros
Produits chimiques	1.500 euros
Kits de préparation	575 euros
Petit matériel	6.000 euros
Banque ADN	1700 euros
Enzymes	500 euros
Composés radioactifs	100 euros
Séquençage	450 euros
Plantes	360 euros
Abonnements revues scientifiques	1.560 euros
Photocopies	60 euros
Infrastructures	6.495 euros
Frais de mission	1600 euros
TOTAL	26.700 euros

Coût total du projet : 132.065 + 26.700 = 158.765 euros

3.3. Origine des financements

Mon classement au terme de mon année de DEA m'a permis d'obtenir une bourse MRT attribuée par le ministère de la Recherche. Les fonds du laboratoire proviennent de sources diverses (dotation de base du CNRS et de l'ULP, contrats avec des industriels, contrats européens, financement du ministère, dons de fondations...). Le laboratoire redistribue une partie du financement aux différents départements et l'utilise pour toutes les dépenses communes (magasin, produits chimiques, infrastructures...).



III. Compétences, savoir-faire, qualités professionnelles et personnelles

1. Domaines d'expertise scientifique

Ma thèse a représenté 3 années d'étude sur un sujet précis : la maturation des cytochromes de type c dans les mitochondries de plantes. Ce sujet requiert des connaissances dans différents domaines de la biochimie moléculaire : La mitochondrie, les interactions entre protéines et les transporteurs ABC. La lecture de nombreux articles et thèses ainsi que ma participation à différents séminaires spécialisés ont affiné mon expertise dans ces domaines.

2. Domaines d'expertise technique

Mes travaux ont nécessité l'utilisation de multiples techniques de biologie moléculaire et de biochimie. Certaines étant bien connues (clonage, amplification PCR, Western/southern blot, gel Bleu Natif, double hybride chez la levure, microscopie etc...) et d'autres plus spécialisées (Double hybride en split ubiquitine, criblage de protéines...). Travaillant sur les mitochondries, je me suis familiarisé avec la culture de cellules végétales et l'extraction de mitochondries. La création de différents organismes génétiquement modifiés (bactéries, levures, plantes) a représenté une partie conséquente de mes recherches. J'ai donc appris à manipuler et entretenir ces organismes en respectant les normes relatives aux organismes génétiquement modifiés.

3. Connaissances acquises dans le champ de la discipline

L'échange au sein de l'équipe et du département étant très riche, j'ai acquis de nombreuses connaissances concernant la mitochondrie comme la manipulation de son génome ou sa machinerie traductionnelle. De même, la collaboration de notre équipe avec le laboratoire de l'université du littoral à Santa Fe m'a permis d'en apprendre d'avantage sur une thématique proche de la mienne : l'assemblage du complexe de la « cytochrome c oxydase ».

5. Savoir-faire administratif

Le travail de laboratoire nécessite également son lot d'efforts administratifs. En particulier effectuer les commandes de produits chimiques, « kit » d'enzymes et lignées de graines. Les différentes missions effectuées au cours de ces 3 dernières années m'ont également enseigné à organiser ce type de dossier.

6. Compétences linguistiques

Ayant déjà une très bonne maîtrise de la langue anglaise au début de mon cursus universitaire, cette compétence me fut précieuse pendant toute la durée de ma thèse. Une partie non négligeable des membres de l'institut n'étant pas francophone, les séminaires internes sont obligatoirement présentés en anglais, tout comme la rédaction des publications scientifiques. De même, les différents congrès internationaux sont anglophones. J'ai donc pu affiner davantage ma maîtrise de la langue et, grâce au financement de l'École Doctorale, ai passé honorablement l'examen du TOEIC (score : 975).

IV. Résultats et impacts de la thèse

1. Pour le laboratoire et l'équipe

Mes travaux de thèse ont permis de compléter des expériences amorcées par Naganand Rayapuram, un ancien doctorant du laboratoire. Nos résultats conjoints nous ont permis de voir notre article publié dans le *Journal of Biological Chemistry*, un journal à haut facteur d'impact. Les publications dans des journaux scientifiques prestigieux étant un des aboutissements essentiels de la recherche fondamentale, mon laboratoire a ainsi bénéficié de l'impact international de cette publication. De plus, une partie de mes résultats de thèse a servi à la rédaction d'une nouvelle publication actuellement soumise aux éditeurs.

Mes expériences portant sur les plantes génétiquement modifiées ont également ouvert de nouvelles perspectives de manipulation portant sur l'étude d'un mutant particulier ainsi que sur la purification de complexes de protéines CCM.

2. Pour la recherche et la société

Les résultats obtenus ont permis d'appréhender l'assemblage du cytochrome de type *c* dans les mitochondries de plantes sous une optique particulière : par l'étude d'interaction entre protéines.

Bien qu'il soit difficile d'envisager une application concrète de ces recherches dans un avenir proche, on peut imaginer que ces travaux contribueront à mieux comprendre l'assemblage des hétéroprotéines. À terme, il n'est pas exclu que des hétéroprotéines artificielles (en particulier l'hémoglobine) puisse être synthétisées grâce au travail de mon laboratoire d'accueil.

D'autre part, l'assemblage du cytochrome de type *c* étant spécifique des plantes, des applications dans le domaine agricole seraient également possibles.

V. Conclusions

Au cours de ces 3 dernières années, la thèse m'a permis de développer de nombreuses compétences professionnelles et techniques et de mieux définir mon projet professionnel.

J'ai ainsi appris à gérer les différentes phases du projet de thèse : La mise en place d'une stratégie à long terme (3 ans, soit la durée de ma bourse) avec une date butoir bien définie. Une stratégie qui se devait d'être assez souple pour s'adapter aux difficultés rencontrées et assez audacieuse pour faire avancer la thématique.

Les nombreuses discussions avec mon équipe, ainsi qu'avec les intervenants extérieurs, m'ont appris à échanger efficacement les informations relatives à différents sujets scientifiques et techniques. J'ai eu à présenter mes résultats sous différentes formes (poster, séminaires) auprès d'audiences variées lors de congrès nationaux et internationaux, développant ainsi mes capacités de communication.

Faisant partie d'une équipe s'intéressant à une thématique proche de celle d'autres laboratoires, j'ai procédé tout au long de ma thèse à un travail de veille scientifique et technique. Scientifique afin d'être à jour sur l'état des connaissances sur mon domaine d'étude et technique afin d'enquêter sur les techniques compatibles avec mes objectifs de recherche.

Le travail de laboratoire en lui-même m'a inculqué une rigueur de travail indispensable pour l'obtention de résultats publiables.

Le développement de ces compétences fait de la thèse une expérience professionnelle très enrichissante. De plus, grâce aux nombreuses formations proposées par mon Ecole Doctorale, j'ai appris à mieux connaître le monde d'entreprise, ses buts, ses structures, ses attentes. Dans ce cadre, j'ai participé à une formation sur l'insertion professionnelle, aux Doctoriales d'Alsace 2007 (où j'ai remporté en équipe le 2^{ème} prix de l'innovation organisé par l'incubateur SEMIA), au forum Biotechno 2008... Ces différentes manifestations ont forgé en moi une conviction : bien qu'ayant apprécié ma thèse au sein d'un laboratoire de recherche fondamentale, je suis extrêmement motivé par la possibilité d'obtenir un poste en recherche et développement au sein d'une entreprise privée. Le dynamisme et la diversité de l'entreprise, et surtout la possibilité de travailler sur des projets ayant une application concrète m'interpellent tout particulièrement. Actuellement en cours de rédaction de ma thèse, je poursuis ma prospection du marché et l'entretien de mon réseau afin d'obtenir un emploi dans ce domaine.

Alors que la date de soutenance de doctorat approche, je pense avoir gagné le pari de la thèse : Avoir accompli, dans un laps de temps défini et respecté, un travail scientifique reconnu et avoir acquis des compétences qui me seront précieuses dans mon avenir professionnel.

Signalement bibliographique ajouté par le :

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG
Service Commun de la Documentation

AtCCMA Interacts with AtCcmB to Form a Novel Mitochondrial ABC Transporter Involved in Cytochrome c Maturation in Arabidopsis

Naganand RAYAPURAM, Jérémie HAGENMULLER, Jean-Michel GRIENENBERGER, Philippe GIEGÉ, and Géraldine BONNARD

Journal of Biological Chemistry, 2007, vol. 282, n° 29, pages 21015-21023

Annexes pages 11-19 :

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

Les utilisateurs de l'UdS peuvent consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M704091200>

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://www-sicd.u-strasbg.fr/services/peb/>

Signalement bibliographique ajouté par le :

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG
Service Commun de la Documentation

The Three Mitochondrial Encoded CcmF Proteins Form a Complex That Interacts with CCMH and c-Type Apocytochromes in Arabidopsis

Naganand RAYAPURAM, Jérémie HAGENMULLER, Jean-Michel GRIENENBERGER, Philippe GIEGÉ and Géraldine BONNARD

Journal of Biological Chemistry, 2008, vol. 283, n° 37, pages 25200-25208

Annexes pages 21-29 :

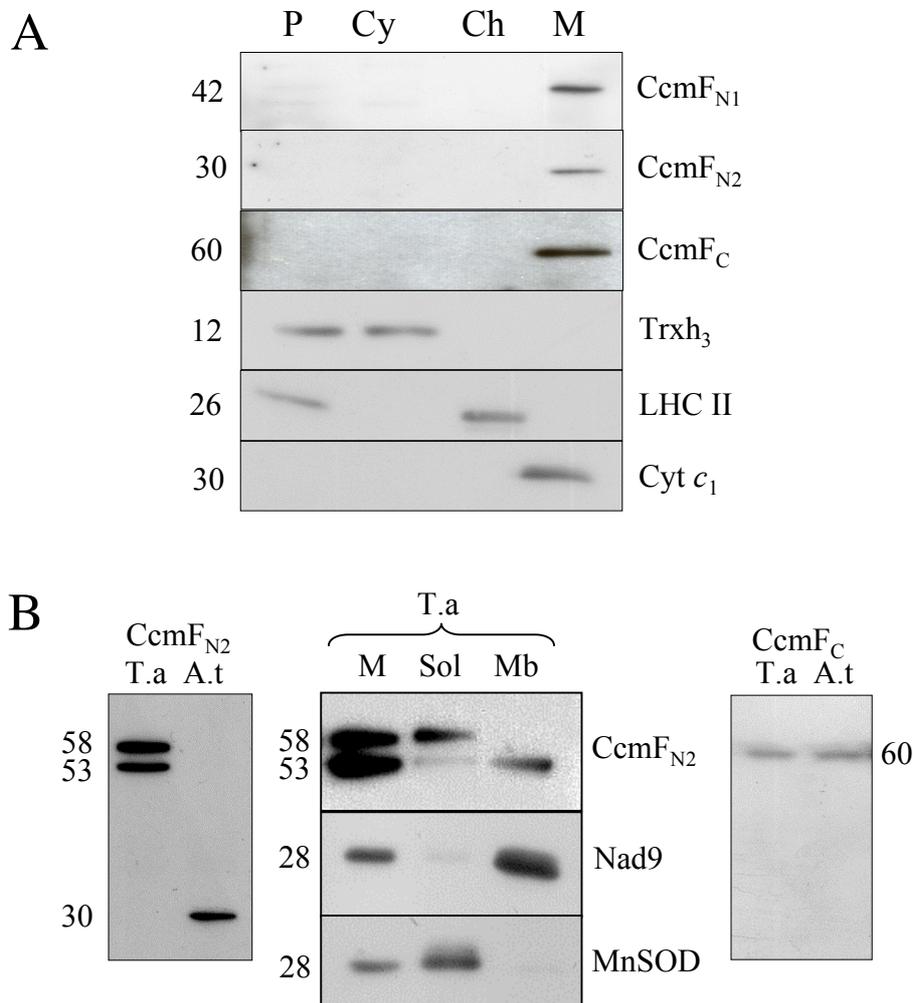
La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Les utilisateurs de l'UdS peuvent consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M802621200>

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://www-sicd.u-strasbg.fr/services/peb/>



Supplementary Figure S1

The 3 CcmF proteins are translated in *Arabidopsis* mitochondria. **A.** immunodetection of the 3 CcmF proteins on cell fractions representing protoplasts (P), cytosol (Cy), chloroplasts (Ch) and mitochondria (M). The quality of the fractionation is assessed with antibodies directed against the cytosolic thioredoxin (Trx_{h3}), the chloroplastic light harvesting complex II (LHC II) and the mitochondrial cytochrome *c*₁ (Cyt *c*₁). **B.** Differential organisation of CcmF proteins between wheat (T.a) and *Arabidopsis* (A.t). CcmF_{N2} and CcmF_C antibodies are used on mitochondrial fractions from the two species. In wheat, the 53 kDa signal is detected in a mitochondrial membrane fraction (Mb), whereas the 58 kDa signal is mostly found in a mitochondrial soluble fraction (Sol). The quality of the fractionation is assessed with antibodies directed against the membrane protein Nad9 and the soluble protein MnSOD. Molecular weights are indicated in kDa.

Bibliographie

- Abdrakhmanova, A., Zickermann, V., Bostina, M., Radermacher, M., Schagger, H., Kerscher, S., and Brandt, U. (2004) Subunit composition of mitochondrial complex I from the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biochim Biophys Acta* **1658**: 148-156.
- 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.
- Ahuja, U., and Thöny-Meyer, L. (2003) Dynamic features of a heme delivery system for cytochrome *c* maturation. *J Biol Chem* **278**: 52061-52070.
- Ahuja, U., and Thony-Meyer, L. (2005) CcmD is involved in complex formation between CcmC and the heme chaperone CcmE during cytochrome *c* maturation. *J Biol Chem* **280**: 236-243.
- Ahuja, U., and Thony-Meyer, L. (2006) The membrane anchors of the heme chaperone CcmE and the periplasmic thioredoxin CcmG are functionally important. *FEBS Lett* **580**: 216-222.
- Allen, J.W., Tomlinson, E.J., Hong, L., and Ferguson, S.J. (2002) The Escherichia coli cytochrome *c* maturation (Ccm) system does not detectably attach heme to single cysteine variants of an apocytochrome *c*. *J Biol Chem* **277**: 33559-33563.
- Allen, J.W., Ginger, M.L., and Ferguson, S.J. (2004) Maturation of the unusual single-cysteine (XXXCH) mitochondrial *c*-type cytochromes found in trypanosomatids must occur through a novel biogenesis pathway. *Biochem J* **383**: 537-542.
- Allen, J.W., and Ferguson, S.J. (2006) What is the substrate specificity of the System I cytochrome *c* biogenesis apparatus? *Biochem Soc Trans* **34**: 150-151.
- Allen, J.W., Harvat, E.M., Stevens, J.M., and Ferguson, S.J. (2006) A variant System I for cytochrome *c* biogenesis in archaea and some bacteria has a novel CcmE and no CcmH. *FEBS Lett* **580**: 4827-4834.
- Allen, J.W., Jackson, A.P., Rigden, D.J., Willis, A.C., Ferguson, S.J., and Ginger, M.L. (2008) Order within a mosaic distribution of mitochondrial *c*-type cytochrome biogenesis systems? *Febs J* **275**: 2385-2402.
- Anthony, C. (1992) The *c*-type cytochromes of methylotrophic bacteria. *Biochim Biophys Acta* **1099**: 1-15.
- Bairoch, A. (1992) PROSITE: a dictionary of sites and patterns in proteins. *Nucleic Acids Res* **20 Suppl**: 2013-2018.
- Balk, J., and Lobreaux, S. (2005) Biogenesis of iron-sulfur proteins in plants. *Trends Plant Sci* **10**: 324-331.
- Bardischewsky, F., and Friedrich, C.G. (2001) Identification of *ccdA* in *Paracoccus pantotrophus* GB17: disruption of *ccdA* causes complete deficiency in *c*-type cytochromes. *J Bacteriol* **183**: 257-263.
- Barrett, E.L., and Clark, M.A. (1987) Tetrathionate reduction and production of hydrogen sulfide from thiosulfate. *Microbiol Rev* **51**: 192-205.
- Baston, E., and Leroux, F.R. (2007) Inhibitors of steroidal cytochrome p450 enzymes as targets for drug development. *Recent Patents Anticancer Drug Discov* **2**: 31-58.
- Beckett, C.S., Loughman, J.A., Karberg, K.A., Donato, G.M., Goldman, W.E., and Kranz, R.G. (2000) Four genes are required for the system II cytochrome *c* biogenesis pathway in *Bordetella pertussis*, a unique bacterial model. *Mol. Microbiol.* **38**: 465-481.
- Bernard, D.G., Gabilly, S.T., Dujardin, G., Merchant, S., and Hamel, P.P. (2003) Overlapping

- specificities of the mitochondrial cytochrome *c* and *c*₁ heme lyases. *J Biol Chem* **278**: 49732-49742.
- Bernard, D.G., Quevillon-Cheruel, S., Merchant, S., Guiard, B., and Hamel, P.P. (2005) Cyc2p, a Membrane-bound Flavoprotein Involved in the Maturation of Mitochondrial *c*-Type Cytochromes. *J Biol Chem* **280**: 39852-39859.
- Berry, E.A., Guergova-Kuras, M., Huang, L.S., and Crofts, A.R. (2000) Structure and function of cytochrome *bc* complexes. *Annu Rev Biochem* **69**: 1005-1075.
- Berry, E.A., Huang, L.S., Saechao, L.K., Pon, N.G., Valkova-Valchanova, M., and Daldal, F. (2004) X-Ray Structure of Rhodobacter Capsulatus Cytochrome *bc*₁: Comparison with its Mitochondrial and Chloroplast Counterparts. *Photosynth Res* **81**: 251-275.
- Bonnard, G., and Grienberger, J.M. (1995) A gene proposed to encode a transmembrane domain of an ABC transporter is expressed in wheat mitochondria. *Mol. Gen. Genet.* **246**: 81-99.
- Boos, W., and Shuman, H. (1998) Maltose/maltodextrin system of *Escherichia coli* : transport, metabolism, and regulation. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 204-229.
- Bott, M., Ritz, D., and Hennecke, H. (1991) The *Bradyrhizobium japonicum* cycM gene encodes a membrane-anchored homolog of mitochondrial cytochrome *c*. *J Bacteriol* **173**: 6766-6772.
- Bouige, P., Laurent, D., Piloyan, L., and Dassa, E. (2002) Phylogenetic and functional classification of ATP-binding cassette (ABC) systems. *Curr Protein Pept Sci* **3**: 541-559.
- Boyer, P.D. (1997) The ATP synthase, a splendid molecular machine. *Annu Rev Biochem* **66**: 717-749.
- Brandina, I., Graham, J., Lemaitre-Guillier, C., Entelis, N., Krasheninnikov, I., Sweetlove, L., Tarassov, I., and Martin, R.P. (2006) Enolase takes part in a macromolecular complex associated to mitochondria in yeast. *Biochim Biophys Acta* **1757**: 1217-1228.
- Braun, H.P., Emmermann, M., Kruff, V., and Schmitz, U.K. (1992) Cytochrome *c*₁ from potato : a protein with a presequence for targeting to the mitochondrial intermembrane space. *Mol. Gen. Genet.* **231**: 217-225.
- Braun, H.P., and Schmitz, U.K. (1999) The protein-import apparatus of plant mitochondria. *Planta* **209**: 267-274.
- Brown, W. (1985) The mitochondrial genome of animals. *Molecular Evolutionary Genetics*: pp. 95–13.
- Buchanan, B.B., Gruissem, W., and Russell, L.J. (2000) *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. Rockville, Maryland: American Society of Plant Physiologists.
- Burger, G., Zhu, Y., Littlejohn, T.G., Greenwood, S.J., Schnare, M.N., Lang, B.F., and Gray, M.W. (2000) Complete sequence of the mitochondrial genome of *Tetrahymena pyriformis* and comparison with *Paramecium aurelia* mitochondrial DNA. *J Mol Biol* **297**: 365-380.
- Cervera, A.M., Gozalbo, D., McCreath, K.J., Gow, N.A., Martinez, J.P., and Casanova, M. (1998) Molecular cloning and characterization of a *Candida albicans* gene coding for cytochrome *c* haem lyase and a cell wall-related protein. *Mol Microbiol* **30**: 67-81.
- Chen, S., Sanchez-Fernandez, R., Lyver, E.R., Dancis, A., and Rea, P.A. (2007) Functional characterization of AtATM1, AtATM2, and AtATM3, a subfamily of Arabidopsis half-molecule ATP-binding cassette transporters implicated in iron homeostasis. *J Biol Chem* **282**: 21561-21571.
- Chew, O., Whelan, J., and Millar, A.H. (2003) Molecular definition of the ascorbate-glutathione cycle in *Arabidopsis mitochondria* reveals dual targeting of antioxidant defenses in plants. *J Biol Chem* **278**: 46869-46877.
- Christensen, O. (2005) CcmA and CcmB, an ABC transporter involved in cytochrome *c*

- maturation. *Thesis, University of Berne*.
- Christensen, O., Harvat, E.M., Thony-Meyer, L., Ferguson, S.J., and Stevens, J.M. (2007) Loss of ATP hydrolysis activity by CcmAB results in loss of *c*-type cytochrome synthesis and incomplete processing of CcmE. *Febs J* **274**: 2322-2332.
- Cianciotto, N.P., Cornelis, P., and Baysse, C. (2005) Impact of the bacterial type I cytochrome *c* maturation system on different biological processes. *Mol Microbiol* **56**: 1408-1415.
- Clough, S.J., and Bent, A.F. (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **16**: 735-743.
- Colombini, M. (2004) VDAC: the channel at the interface between mitochondria and the cytosol. *Mol Cell Biochem* **256-257**: 107-115.
- Cook, G.M., and Poole, R.K. (2000) Oxidase and periplasmic cytochrome assembly in *Escherichia coli* K-12: CydDC and CcmAB are not required for haem-membrane association. *Microbiology* **146 (Pt 2)**: 527-536.
- Covello, P.S., and Gray, M.W. (1993) On the evolution of RNA editing. *Trends Genet.* **9**: 265-268.
- Crofts, A.R., Lhee, S., Crofts, S.B., Cheng, J., and Rose, S. (2006) Proton pumping in the bc1 complex: a new gating mechanism that prevents short circuits. *Biochim Biophys Acta* **1757**: 1019-1034.
- Custers, J.B.M. (1999) The 35S-CaMV promoter is silent during early embryogenesis but activated during nonembryogenic sporophytic development in microspore culture. *Protoplasma*: 257-264.
- Daltrop, O., Allen, J.W., Willis, A.C., and Ferguson, S.J. (2002a) In vitro formation of a *c*-type cytochrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 7872-7876.
- Daltrop, O., Stevens, J.M., Higham, C.W., and Ferguson, S.J. (2002b) The CcmE protein of the *c*-type cytochrome biogenesis system: unusual in vitro heme incorporation into apo-CcmE and transfer from holo-CcmE to apocytochrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 9703-9708.
- Dassa, E., and Bouige, P. (2001) The ABC of ABCS: a phylogenetic and functional classification of ABC systems in living organisms. *Res Microbiol* **152**: 211-229.
- Davidson, A.L., and Chen, J. (2004) ATP-binding cassette transporters in bacteria. *Annu Rev Biochem* **73**: 241-268.
- Dawson, R.J., and Locher, K.P. (2007) Structure of the multidrug ABC transporter Sav1866 from *Staphylococcus aureus* in complex with AMP-PNP. *FEBS Lett* **581**: 935-938.
- de Vitry, C., Desbois, A., Redeker, V., Zito, F., and Wollman, F.A. (2004) Biochemical and spectroscopic characterization of the covalent binding of heme to cytochrome *b6*. *Biochemistry* **43**: 3956-3968.
- Dean, M., Hamon, Y., and Chimini, G. (2001) The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J Lipid Res* **42**: 1007-1017.
- Decottignies, A., and Goffeau, A. (1997) Complete inventory of the yeast ABC proteins. *Nat Genet* **15**: 137-145.
- Deshmukh, M., Bresseur, G., and Daldal, F. (2000) Novel *Rhodobacter capsulatus* genes required for the biogenesis of various *c*-type cytochromes. *Mol. Microbiol.* **35**: 123-138.
- Dieterle, M., Thomann, A., Renou, J.P., Parmentier, Y., Cognat, V., Lemonnier, G., Muller, R., Shen, W.H., Kretsch, T., and Genschik, P. (2005) Molecular and functional characterization of *Arabidopsis* Cullin 3A. *Plant J* **41**: 386-399.
- Doong, R.L., Liljebjelke, K., Fralish, G., Kumar, A., and Mohnen, D. (1995) Cell-Free Synthesis of Pectin (Identification and Partial Characterization of Polygalacturonate 4-[alpha]-Galacturonosyltransferase and Its Products from Membrane Preparations of

- Tobacco Cell-Suspension Cultures). *Plant Physiol* **109**: 141-152.
- Douce, R., and Neuburger, M. (1989) The uniqueness of plant mitochondria. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **40**: 371-414.
- Dreyfuss, B.W., Hamel, P.P., Nakamoto, S.S., and Merchant, S. (2003) Functional analysis of a divergent system II protein, Ccs1, involved in *c*-type cytochrome biogenesis. *J Biol Chem* **278**: 2604-2613.
- Drygas, M.E., Lambowitz, A.M., and Nargang, F.E. (1989) Cloning and analysis of the *Neurospora crassa* gene for cytochrome *c* heme lyase. *J Biol Chem* **264**: 17897-17906.
- Dumont, M.E., Ernst, J.F., Hampsey, D.M., and Sherman, F. (1987) Identification and sequence of the gene encoding cytochrome *c* heme lyase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* **6**: 235-241.
- Durst, F., and Nelson, D.R. (1995) Diversity and evolution of plant P450 and P450-reductases. *Drug Metabol Drug Interact* **12**: 189-206.
- Durst, F., and O'Keefe, D.P. (1995) Plant cytochromes P450: an overview. *Drug Metabol Drug Interact* **12**: 171-187.
- Edwards, K., Johnstone, C., and Thompson, C. (1991) A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res* **19**: 1349.
- Erlendsson, L.S., and Hederstedt, L. (2002) Mutations in the thiol-disulfide oxidoreductases BdbC and BdbD can suppress cytochrome *c* deficiency of CcdA-defective *Bacillus subtilis* cells. *J Bacteriol* **184**: 1423-1429.
- Erlendsson, L.S., Acheson, R.M., Hederstedt, L., and Le Brun, N.E. (2003) *Bacillus subtilis* ResA is a thiol-disulfide oxidoreductase involved in cytochrome *c* synthesis. *J Biol Chem* **278**: 17852-17858.
- Eubel, H., Jansch, L., and Braun, H.P. (2003) New insights into the respiratory chain of plant mitochondria. Supercomplexes and a unique composition of complex II. *Plant Physiol* **133**: 274-286.
- Fabianek, R.A., Hofer, T., and Thony-Meyer, L. (1999) Characterization of the *Escherichia coli* CcmH protein reveals new insights into the redox pathway required for cytochrome *c* maturation. *Arch Microbiol* **171**: 92-100.
- Fabianek, R.A., Hennecke, H., and Thöny-Meyer, L. (2000) Periplasmic protein thiol:disulfide oxidoreductases of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**: 303-316.
- Faivre-Nitschke, E., Nazoa, P., Gualberto, J.M., Grienenberger, J.M., and Bonnard, G. (2001) Wheat mitochondria ccmB encodes the membrane domain of a putative ABC transporter involved in cytochromes *c* biogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* **1519**: 199-208.
- Feissner, R.E., Beckett, C.S., Loughman, J.A., and Kranz, R.G. (2005) Mutations in cytochrome assembly and periplasmic redox pathways in *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol* **187**: 3941-3949.
- Feissner, R.E., Richard-Fogal, C.L., Frawley, E.R., and Kranz, R.G. (2006a) ABC transporter-mediated release of a haem chaperone allows cytochrome *c* biogenesis. *Mol Microbiol* **61**: 219-231.
- Feissner, R.E., Richard-Fogal, C.L., Frawley, E.R., Loughman, J.A., Earley, K.W., and Kranz, R.G. (2006b) Recombinant cytochromes *c* biogenesis systems I and II and analysis of haem delivery pathways in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **60**: 563-577.
- Feitsma, R.I., Blok, D., Wasser, M.N., Nieuwenhuizen, W., and Pauwels, E.K. (1987) A new method for ⁹⁹Tcm-labelling of proteins with an application to clot detection with an antifibrin monoclonal antibody. *Nucl Med Commun* **8**: 771-777.
- Feldmann, K.A.a.M., M.D. (1987) *Agrobacterium* mediated transformation of germinating

- seeds of *Arabidopsis thaliana*: A non-tissue culture 'approach. *Mol. Gen. Genet.* **208**, 1-9.
- Ferguson, S.J. (2001) Keilin's cytochromes: how bacteria use them, vary them and make them. *Biochem Soc Trans* **29**: 629-640.
- Fernie, A.R., Roscher, A., Ratcliffe, R.G., and Kruger, N.J. (2001) Fructose 2,6-bisphosphate activates pyrophosphate: fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase and increases triose phosphate to hexose phosphate cycling in heterotrophic cells. *Planta* **212**: 250-263.
- Fernie, A.R., Tauberger, E., Lytovchenko, A., Roessner, U., Willmitzer, L., and Trethewey, R.N. (2002) Antisense repression of cytosolic phosphoglucomutase in potato (*Solanum tuberosum*) results in severe growth retardation, reduction in tuber number and altered carbon metabolism. *Planta* **214**: 510-520.
- Fields, S., and Song, O. (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**: 245-246.
- Flory, J.E., and Donohue, T.J. (1995) Organization and expression of the *Rhodobacter sphaeroides* cycFG operon. *J Bacteriol* **177**: 4311-4320.
- Friedrich, T., and Bottcher, B. (2004) The gross structure of the respiratory complex I: a Lego System. *Biochim Biophys Acta* **1608**: 1-9.
- Garcia, O., Bouige, P., Forestier, C., and Dassa, E. (2004) Inventory and comparative analysis of rice and *Arabidopsis* ATP-binding cassette (ABC) systems. *J Mol Biol* **343**: 249-265.
- Gellissen, G., and Michaelis, G. (1987) Gene transfer. Mitochondria to nucleus. *Ann N Y Acad Sci* **503**: 391-401.
- Giegé, P., and Brennicke, A. (1999) RNA editing in *Arabidopsis* mitochondria effects 441 C to U changes in ORFs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 15324-15329.
- Giegé, P., Hoffmann, M., Binder, S., and Brennicke, A. (2000) RNA degradation buffers asymmetries of transcription in *Arabidopsis* mitochondria. *EMBO Rep* **1**: 164-170.
- Giegé, P., Heazlewood, J.L., Roessner-Tunali, U., Millar, A.H., Fernie, A.R., Leaver, C.J., and Sweetlove, L.J. (2003a) Enzymes of glycolysis are functionally associated with the mitochondrion in *Arabidopsis* cells. *Plant Cell* **15**: 2140-2151.
- Giegé, P., Sweetlove, L.J., and Leaver, C.J. (2003b) Identification of mitochondrial protein complexes in *Arabidopsis* using two-dimensional Blue-Native polyacrylamide gel electrophoresis. *Plant Mol. Biol. Reporter* **21**: 133-144.
- Giegé, P., Rayapuram, N., Meyer, E.H., Grienberger, J.M., and Bonnard, G. (2004) CcmF(C) involved in cytochrome *c* maturation is present in a large sized complex in wheat mitochondria. *FEBS Lett* **563**: 165-169.
- Goldman, B.S., Beckman, D.L., Bali, A., Monika, E.M., Gabbert, K.K., and Kranz, R.G. (1997) Molecular and immunological analysis of an ABC transporter complex required for cytochrome *c* biogenesis. *J Mol Biol* **268**: 724-738.
- Goldman, B.S., Beckman, D.L., Monika, E.M., and Kranz, R.G. (1998) Transmembrane heme delivery systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 5003-5008.
- Goldman, B.S., and Kranz, R.G. (2001) ABC transporters associated with cytochrome *c* biogenesis. *Res Microbiol* **152**: 323-329.
- Gonzalez, D.H., Bonnard, G., and Grienberger, J.M. (1993) A gene involved in the biogenesis of *c*-type cytochromes is co-transcribed with a ribosomal protein gene in wheat mitochondria. *Curr. Genet.* **21**: 248-255.
- Goodall, G.J., Wiebauer, K., and Filipowicz, W. (1990) Analysis of pre-mRNA processing in transfected plant protoplasts. *Methods Enzymol.* **181**: 148-161.
- Goodwin, P.M., and Anthony, C. (1995) The biosynthesis of periplasmic electron transport proteins in methylotrophic bacteria. *Microbiology* **141 (Pt 5)**: 1051-1064.

- Gottesman, M.M., and Ambudkar, S.V. (2001) Overview: ABC transporters and human disease. *J Bioenerg Biomembr* **33**: 453-458.
- Graham, J.W., Williams, T.C., Morgan, M., Fernie, A.R., Ratcliffe, R.G., and Sweetlove, L.J. (2007) Glycolytic enzymes associate dynamically with mitochondria in response to respiratory demand and support substrate channeling. *Plant Cell* **19**: 3723-3738.
- Gray, M.W., and Doolittle, W.F. (1982) Has the endosymbiot hypothesis been proven ? *Microbiol. Rev.* **46**: 1-42.
- Gray, M.W. (1992) The endosymbiont hypothesis revisited. In *Mitochondrial genomes*. Vol. 141. Wolstenholme, D.R. and Jeon, K.W. (eds). New-York: Academic Press, pp. 233-357.
- Grimberg, A., Ferry, R.J., Jr., Kelly, A., Koo-McCoy, S., Polonsky, K., Glaser, B., Permutt, M.A., Aguilar-Bryan, L., Stafford, D., Thornton, P.S., Baker, L., and Stanley, C.A. (2001) Dysregulation of insulin secretion in children with congenital hyperinsulinism due to sulfonylurea receptor mutations. *Diabetes* **50**: 322-328.
- Grove, J., Tanapongpipat, S., Thomas, G., Griffiths, L., Croke, H., and Cole, J. (1996) *Escherichia coli* K-12 genes essential for the synthesis of *c*-type cytochromes and a third nitrate reductase located in the periplasm. *Mol. Microbiol.* **19**: 467-481.
- Guenebaut, V., Schlitt, A., Weiss, H., Leonard, K., and Friedrich, T. (1998) Consistent structure between bacterial and mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *J Mol Biol* **276**: 105-112.
- Hamel, P., Corvest, V., Giegé, P., and Bonnard, G. (2008) Biochemical requirements for the maturation of mitochondrial *c*-type cytochromes. *Biochim Biophys Acta*.
- Hamel, P.P., Dreyfuss, B.W., Xie, Z., Gabilly, S.T., and Merchant, S. (2003) Essential histidine and tryptophan residues in CcsA, a system II polytopic cytochrome *c* biogenesis protein. *J Biol Chem* **278**: 2593-2603.
- Hammani, K. (2006) Etude de l'interaction entre l'apocytochrome *c* et AtCCMH, deux protéines mitochondriales d'*Arabidopsis thaliana*. *DEA*.
- Handa, H. (2003) The complete nucleotide sequence and RNA editing content of the mitochondrial genome of rapeseed (*Brassica napus L.*): comparative analysis of the mitochondrial genomes of rapeseed and *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res* **31**: 5907-5916.
- Harms, C., Domoto, Y., Celik, C., Rahe, E., Stumpe, S., Schmid, R., Nakamura, T., and Bakker, E.P. (2001) Identification of the ABC protein SapD as the subunit that confers ATP dependence to the K⁺-uptake systems Trk(H) and Trk(G) from *Escherichia coli* K-12. *Microbiology* **147**: 2991-3003.
- Hatefi, Y. (1985) The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Ann. Rev. Biochem.* **54**: 1015-1069.
- Heazlewood, J.L., Howell, K.A., and Millar, A.H. (2003a) Mitochondrial complex I from *Arabidopsis* and rice: orthologs of mammalian and fungal components coupled with plant-specific subunits. *Biochim Biophys Acta* **1604**: 159-169.
- Heazlewood, J.L., Whelan, J., and Millar, A.H. (2003b) The products of the mitochondrial orf25 and orfB genes are FO components in the plant F1FO ATP synthase. *FEBS Lett* **540**: 201-205.
- Higgins, C.F. (1992) ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol* **8**: 67-113.
- Higgins, C.F. (1995) The ABC of channel regulation. *Cell* **82**: 693-696.
- Higgins, C.F. (2001) ABC transporters: physiology, structure and mechanism--an overview. *Res Microbiol* **152**: 205-210.
- Hochkoeppler, A., Jenney, F.E., Jr., Lang, S.E., Zannoni, D., and Daldal, F. (1995) Membrane-associated cytochrome *cy* of *Rhodobacter capsulatus* is an electron carrier

- from the cytochrome *bc*₁ complex to the cytochrome *c* oxidase during respiration. *J Bacteriol* **177**: 608-613.
- Hollenstein, K., Dawson, R.J., and Locher, K.P. (2007a) Structure and mechanism of ABC transporter proteins. *Curr Opin Struct Biol* **17**: 412-418.
- Hollenstein, K., Frei, D.C., and Locher, K.P. (2007b) Structure of an ABC transporter in complex with its binding protein. *Nature* **446**: 213-216.
- Holtgrawe D, A.S., B Altmann, R Scheibe (2005) Cytoskeleton-associated, carbohydrate-metabolizing enzymes in maize identified by yeast two-hybrid screening. *Physiol Plantarum* **125**: 141-156.
- Holtgreffe, S., Gohlke, J., Starmann, J., Druce, S., Klocke, S., Altmann, B., Wojtera, J., Lindermayr, C., and Scheibe, R. (2008) Regulation of plant cytosolic glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase isoforms by thiol modifications. *Physiol Plant* **133**: 211-228.
- Hope, A.B. (2000) Electron transfers amongst cytochrome *f*, plastocyanin and photosystem I: kinetics and mechanisms. *Biochim Biophys Acta* **1456**: 5-26.
- Horsefield, R., Iwata, S., and Byrne, B. (2004) Complex II from a structural perspective. *Curr Protein Pept Sci* **5**: 107-118.
- Hunke, S., Mourez, M., Jehanno, M., Dassa, E., and Schneider, E. (2000) ATP modulates subunit-subunit interactions in an ATP-binding cassette transporter (MalFGK2) determined by site-directed chemical cross-linking. *J Biol Chem* **275**: 15526-15534.
- Hunte, C., Koepke, J., Lange, C., Rossmannith, T., and Michel, H. (2000) Structure at 2.3 Å resolution of the cytochrome *bc*₁ complex from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* co-crystallized with an antibody Fv fragment. *Structure* **8**: 669-684.
- Inoue, K., Dreyfuss, B.W., Kindle, K.L., Stern, D.B., Merchant, S., and Sodeinde, O.A. (1997) *CssI*, a nuclear gene required for the post-translational assembly of chloroplast *c*-type cytochromes. *J. Biol. Chem.* **272**: 31747-31754.
- Iwata, S., Lee, J.W., Okada, K., Lee, J.K., Iwata, M., Rasmussen, B., Link, T.A., Ramaswamy, S., and Jap, B.K. (1998) Complete structure of the 11-subunit bovine mitochondrial cytochrome *bc*₁ complex. *Science* **281**: 64-71.
- Jansch, L., Kruft, V., Schmitz, U.K., and Braun, H.P. (1996) New insights into the composition, molecular mass and stoichiometry of the protein complexes of plant mitochondria. *Plant J* **9**: 357-368.
- Jasinski, M., Ducos, E., Martinoia, E., and Boutry, M. (2003) The ATP-binding cassette transporters: structure, function, and gene family comparison between rice and *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **131**: 1169-1177.
- Jenney, F.E., Jr., and Daldal, F. (1993) A novel membrane-associated *c*-type cytochrome, *cyt cy*, can mediate the photosynthetic growth of *Rhodobacter capsulatus* and *Rhodobacter sphaeroides*. *EMBO J* **12**: 1283-1292.
- Johnsson, N., and Varshavsky, A. (1994) Split ubiquitin as a sensor of protein interactions *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 10340-10344.
- Junn, E., Han, S.H., Im, J.Y., Yang, Y., Cho, E.W., Um, H.D., Kim, D.K., Lee, K.W., Han, P.L., Rhee, S.G., and Choi, I. (2000) Vitamin D3 up-regulated protein 1 mediates oxidative stress via suppressing the thioredoxin function. *J Immunol* **164**: 6287-6295.
- Katoh, S. (1960) Crystallization of an algal cytochrome, *Porphyra tenera*-cytochrome 553. *Nature* **186**: 138-139.
- Katoh, S., and Takamiya, A. (1961) A new leaf copper protein 'plastocyanin', a natural Hill oxidant. *Nature* **189**: 665-666.
- Keilin, D. (1925) On cytochrome, a respiratory pigment, common to animals, yeast, and higher plants. *Proc. R. Soc. London* **98**: 312-339.
- Kerfeld, C.A., and Krogmann, D.W. (1998) PHOTOSYNTHETIC CYTOCHROMES c IN

- CYANOBACTERIA, ALGAE, AND PLANTS. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **49**: 397-425.
- Kispal, G., Csere, P., Guiard, B., and Lill, R. (1997) The ABC transporter Atm1p is required for mitochondrial iron homeostasis. *FEBS Lett.* **418**: 346-350.
- Klein, M., Eckertossenkopp, U., Schmiedeberg, I., Brandt, P., Unseld, M., Brennicke, A., and Schuster, W. (1994) Physical mapping of the mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana* by cosmid and YAC clones. *Plant J.* **6**: 447-455.
- Koulintchenko, M., Konstantinov, Y., and Dietrich, A. (2003) Plant mitochondria actively import DNA via the permeability transition pore complex. *EMBO J* **22**: 1245-1254.
- Kranz, R., Lill, R., Goldman, B., Bonnard, G., and Merchant, S. (1998) Molecular mechanisms of cytochrome *c* biogenesis: three distinct systems. *Mol. Microbiol.* **29**: 383-396.
- Kunji, E.R., and Robinson, A.J. (2006) The conserved substrate binding site of mitochondrial carriers. *Biochim Biophys Acta* **1757**: 1237-1248.
- Kuras, R., de Vitry, C., Choquet, Y., Girard-Bascou, J., Culler, D., Buschlen, S., Merchant, S., and Wollman, F.A. (1997) Molecular genetic identification of a pathway for heme binding to cytochrome *b₆*. *J Biol Chem* **272**: 32427-32435.
- Kuras, R., Saint-Marcoux, D., Wollman, F.A., and de Vitry, C. (2007) A specific *c*-type cytochrome maturation system is required for oxygenic photosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 9906-9910.
- Kurusu, G., Zhang, H., Smith, J.L., and Cramer, W.A. (2003) Structure of the cytochrome *b₆f* complex of oxygenic photosynthesis: tuning the cavity. *Science* **302**: 1009-1014.
- Kushnir, S., Babiychuk, E., Storozhenko, S., Davey, M.W., Papenbrock, J., De Rycke, R., Engler, G., Stephan, U.W., Lange, H., Kispal, G., Lill, R., and Van Montagu, M. (2001) A mutation of the mitochondrial ABC transporter Sta1 leads to dwarfism and chlorosis in the *Arabidopsis* mutant starik. *Plant Cell* **13**: 89-100.
- Lang, B.F., Burger, G., O'Kelly, C.J., Cedergren, R., Golding, G.B., Lemieux, C., Sankoff, D., Turmel, M., and Gray, M.W. (1997) An ancestral mitochondrial DNA resembling a eubacterial genome in miniature. *Nature* **387**: 493-496.
- Le Brun, N.E., Bengtsson, J., and Hederstedt, L. (2000) Genes required for cytochrome *c* synthesis in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **36**: 638-650.
- Lennartz, K., Plucken, H., Seidler, A., Westhoff, P., Bechtold, N., and Meierhoff, K. (2001) HCF164 encodes a thioredoxin-like protein involved in the biogenesis of the cytochrome *b₆f* complex in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **13**: 2539-2551.
- Letoffe, S., Ghigo, J.M., and Wandersman, C. (1994) Secretion of the *Serratia marcescens* HasA protein by an ABC transporter. *J Bacteriol* **176**: 5372-5377.
- Lezhneva, L., Kuras, R., Ephritikhine, G., and de Vitry, C. (2008) A novel pathway of cytochrome *c* biogenesis is involved in the assembly of the cytochrome *b₆f* complex in *Arabidopsis* chloroplasts. *J Biol Chem.*
- Lill, R., and Kispal, G. (2001) Mitochondrial ABC transporters. *Res Microbiol* **152**: 331-340.
- Linton, K.J., and Higgins, C.F. (1998) The *Escherichia coli* ATP-binding cassette (ABC) proteins. *Mol Microbiol* **28**: 5-13.
- 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, P.Q., and Ames, G.F. (1998) *In vitro* disassembly and reassembly of an ABC transporter, the histidine permease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 3495-3500.
- Locher, K.P., Lee, A.T., and Rees, D.C. (2002) The *E. coli* BtuCD structure: a framework for ABC transporter architecture and mechanism. *Science* **296**: 1091-1098.
- Locher, K.P. (2004) Structure and mechanism of ABC transporters. *Curr Opin Struct Biol* **14**: 426-431.

- Loo, T.W., Bartlett, M.C., and Clarke, D.M. (2002) The "LSGGQ" motif in each nucleotide-binding domain of human P-glycoprotein is adjacent to the opposing walker A sequence. *J Biol Chem* **277**: 41303-41306.
- Lund, K., and DeMoss, J.A. (1976) Association-dissociation behavior and subunit structure of heat-released nitrate reductase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **251**: 2207-2216.
- Mackenzie, S., and McIntosh, L. (1999) Higher plant mitochondria. *Plant Cell* **11**: 571-586.
- Marchand, C., Le Marechal, P., Meyer, Y., Miginiac-Maslow, M., Issakidis-Bourguet, E., and Decottignies, P. (2004) New targets of Arabidopsis thioredoxins revealed by proteomic analysis. *Proteomics* **4**: 2696-2706.
- Martinoia, E., Klein, M., Geisler, M., Bovet, L., Forestier, C., Kolukisaoglu, U., Muller-Rober, B., and Schulz, B. (2002) Multifunctionality of plant ABC transporters--more than just detoxifiers. *Planta* **214**: 345-355.
- Matsumoto, K., Masutani, H., Nishiyama, A., Hashimoto, S., Gon, Y., Horie, T., and Yodoi, J. (2002) C-propeptide region of human pro alpha 1 type 1 collagen interacts with thioredoxin. *Biochem Biophys Res Commun* **295**: 663-667.
- Meinke, D.W. (1994) Seed development in *Arabidopsis thaliana*. In *Arabidopsis*. Meyerowitz, E.M. and Somerville, C.R. (eds). New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, pp. 253-295.
- Meyer, E.H., Giegé, P., Gelhaye, E., Rayapuram, N., Ahuja, U., Thöny-Meyer, L., Grienenberger, J.M., and Bonnard, G. (2005) AtCCMH, an essential component of the c-type cytochrome maturation pathway in *Arabidopsis* mitochondria, interacts with apocytochrome c. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 16113-16118.
- Meyer, T.E. (1996) Evolution and classification of c-type cytochromes. In *Cytochrome c. A multidisciplinary approach*. Mauk, R.A.S.a.A.G. (ed). Sausalito, Calif.: University Science Books, pp. 33-99.
- Michel, H., Behr, J., Harrenga, A., and Kannt, A. (1998) Cytochrome c oxidase: structure and spectroscopy. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **27**: 329-356.
- Miller, J.P., Lo, R.S., Ben-Hur, A., Desmarais, C., Stagljar, I., Noble, W.S., and Fields, S. (2005) Large-scale identification of yeast integral membrane protein interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 12123-12128.
- Moller, S.G., Kunkel, T., and Chua, N.H. (2001) A plastidic ABC protein involved in intercompartmental communication of light signaling. *Genes Dev* **15**: 90-103.
- Monika, E.M., Goldman, B.S., Beckman, D.L., and Kranz, R.G. (1997) A thioreduction pathway tethered to the membrane for periplasmic cytochromes c biogenesis; *in vitro* and *in vivo* studies. *J Mol Biol* **271**: 679-692.
- Mooney, B.P., Miernyk, J.A., and Randall, D.D. (2002) The complex fate of alpha-ketoacids. *Annu Rev Plant Biol* **53**: 357-375.
- Moore, G.R., and Pettigrew, G.W. (1990) *Cytochromes c. Evolutionary, Structural, and Physicochemical Aspects*. Berlin-Heidelberg-New York: Verlag.
- Mourez, M., Jehanno, M., Schneider, E., and Dassa, E. (1998) *In vitro* interaction between components of the inner membrane complex of the maltose ABC transporter of *Escherichia coli*: modulation by ATP. *Mol Microbiol* **30**: 353-363.
- 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.
- Nicholson, D.W., and Neupert, W. (1989) Import of cytochrome c into mitochondria : Reduction of heme mediated by NADH and flavin nucleotides, is obligatory for its covalent linkage to apocytochrome c. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 4340-4344.
- Nicholson, D.W., Stuart, R.A., and Neupert, W. (1989) Biogenesis of cytochrome c₁. Role of cytochrome c₁ heme lyase and of the two proteolytic processing steps during import

- into mitochondria. *J. Biol. Chem.* **264**: 10156-10168.
- Nishiyama, A., Ohno, T., Iwata, S., Matsui, M., Hirota, K., Masutani, H., Nakamura, H., and Yodoi, J. (1999) Demonstration of the interaction of thioredoxin with p40phox, a phagocyte oxidase component, using a yeast two-hybrid system. *Immunol Lett* **68**: 155-159.
- Noctor, G., Veljovic-Jovanovic, S., and Foyer, C.H. (2000) Peroxide processing in photosynthesis: antioxidant coupling and redox signalling. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **355**: 1465-1475.
- 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.
- 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., Kohchi, T., and Ohyama, K. (1992) Mitochondrial DNA of *Marchantia-polymorpha* as a single circular form with no incorporation of foreign DNA. *Biosci Biotech Biochem* **56**: 132-135.
- Ohta, N., Sato, N., and Kuroiwa, T. (1998) Structure and organization of the mitochondrial genome of the unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae* deduced from the complete nucleotide sequence. *Nucleic Acids Res.* **26**: 5190-5298.
- Page, M., D., Sambongi, Y., and Ferguson, S., J. (1998) Contrasting routes of *c*-type cytochrome assembly in mitochondria, chloroplasts and bacteria. *Trends Biochem. Sci.* **23**: 103-108.
- Page, M.D., Pearce, D.A., Norris, H.A., and Ferguson, S.J. (1997) The *Paracoccus denitrificans* *ccmA*, *B* and *C* genes: cloning and sequencing, and analysis of the potential of their products to form a haem or apo- *c*-type cytochrome transporter. *Microbiology* **143 (Pt 2)**: 563-576.
- Page, M.D., and Ferguson, S.J. (1999) Mutational analysis of the *Paracoccus denitrificans c*-type cytochrome biosynthetic genes *ccmABCDG*: disruption of *ccmC* has distinct effects suggesting a role for CcmC independent of CcmAB. *Microbiology* **145**: 3047-3057.
- Page, M.L., Hamel, P.P., Gabilly, S.T., Zegzouti, H., Perea, J.V., Alonso, J.M., Ecker, J.R., Theg, S.M., Christensen, S.K., and Merchant, S. (2004) A homolog of prokaryotic thiol disulfide transporter CcdA is required for the assembly of the cytochrome *b₆f* complex in *Arabidopsis* chloroplasts. *J Biol Chem* **279**: 32474-32482.
- Parra-Lopez, C., Lin, R., Aspedon, A., and Groisman, E.A. (1994) A *Salmonella* protein that is required for resistance to antimicrobial peptides and transport of potassium. *Embo J* **13**: 3964-3972.
- Pettigrew, G.W., and Moore, G.R. (1987) *Cytochromes c. Biological Aspects*. Berlin-Heidelberg-New York: Verlag.
- Pinkett, H.W., Lee, A.T., Lum, P., Locher, K.P., and Rees, D.C. (2007) An inward-facing conformation of a putative metal-chelate-type ABC transporter. *Science* **315**: 373-377.
- 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.
- Rayapuram, N. (2003) Insight into understanding the maturation of *c*-type cytochromes in plant mitochondria. In *Biologie Moléculaire Végétale* Strasbourg: Université Louis

- Pasteur, pp. 123.
- Rayapuram, N., Hagenmuller, J., Grienberger, J.M., Giegé, P., and Bonnard, G. (2007) AtCCMA interacts with AtCcmB to form a novel mitochondrial ABC transporter involved in cytochrome *c* maturation in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* **282**: 21015-21023.
- Rayapuram, N., Hagenmuller, J., Grienberger, J.M., Bonnard, G., and Giegé, P. (2008) The three mitochondrial encoded CcmF proteins form a complex that interacts with CcmH and *c*-type apo-cytochromes in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* **283**: 25200-25208.
- Rea, P.A. (2007) Plant ATP-binding cassette transporters. *Annu Rev Plant Biol* **58**: 347-375.
- Rehling, P., Brandner, K., and Pfanner, N. (2004) Mitochondrial import and the twin-pore translocase. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**: 519-530.
- Reid, E., Cole, J., and Eaves, D.J. (2001) The *Escherichia coli* CcmG protein fulfils a specific role in cytochrome *c* assembly. *Biochem J* **355**: 51-58.
- Ren, Q., and Thony-Meyer, L. (2001) Physical interaction of CcmC with heme and the heme chaperone CcmE during cytochrome *c* maturation. *J Biol Chem* **276**: 32591-32596.
- Ren, Q., Ahuja, U., and Thony-Meyer, L. (2002) A bacterial cytochrome *c* heme lyase. CcmF forms a complex with the heme chaperone CcmE and CcmH but not with apocytochrome *c*. *J Biol Chem* **277**: 7657-7663.
- Rios-Velazquez, C., Coller, R., and Donohue, T.J. (2003) Features of *Rhodobacter sphaeroides* CcmFH. *J Bacteriol* **185**: 422-431.
- Rouhier, N., Villarejo, A., Srivastava, M., Gelhaye, E., Keech, O., Droux, M., Finkemeier, I., Samuelsson, G., Dietz, K.J., Jacquot, J.P., and Wingsle, G. (2005) Identification of plant glutaredoxin targets. *Antioxid Redox Signal* **7**: 919-929.
- Saier, M.H., Jr. (2000) Families of transmembrane sugar transport proteins. *Mol Microbiol* **35**: 699-710.
- Sakamoto, W., Spielewoy, N., Bonnard, G., Murata, M., and Wintz, H. (2000) Mitochondrial localization of AtOXA1, an *Arabidopsis* homologue of yeast Oxa1p involved in the insertion and assembly of protein complexes in mitochondrial inner membrane. *Plant Cell Physiol.* **41**: 1157-1163.
- Salinas, T., Duchene, A.M., and Marechal-Drouard, L. (2008) Recent advances in tRNA mitochondrial import. *Trends Biochem Sci* **33**: 320-329.
- Sambrook, J., and Russell, D.W. (2001) *Molecular cloning : A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanchez-Fernandez, R., Davies, T.G., Coleman, J.O., and Rea, P.A. (2001a) The *Arabidopsis thaliana* ABC protein superfamily, a complete inventory. *J Biol Chem* **276**: 30231-30244.
- Sanchez-Fernandez, R., Rea, P.A., Davies, T.G., and Coleman, J.O. (2001b) Do plants have more genes than humans? Yes, when it comes to ABC proteins. *Trends Plant Sci* **6**: 347-348.
- Sanders, C., Turkarslan, S., Lee, D.W., Onder, O., Kranz, R.G., and Daldal, F. (2008) The cytochrome *c* maturation components CcmF, CcmH and CcmI form a membrane-integral multisubunit heme ligation complex. *J Biol Chem*.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467.
- Santos, M., Gousseau, H., Lister, C., Foyer, C., Creissen, G., and Mullineaux, P. (1996) Cytosolic ascorbate peroxidase from *Arabidopsis thaliana* L. is encoded by a small multigene family. *Planta* **198**: 64-69.
- Saurin, W., Hofnung, M., and Dassa, E. (1999) Getting in or out: early segregation between importers and exporters in the evolution of ATP-binding cassette (ABC) transporters. *J. Mol. Evol.* **48**: 22-41.
- Schneider, A., and Marechal-Drouard, L. (2000) Mitochondrial tRNA import: are there

- distinct mechanisms? *Trends Cell Biol* **10**: 509-513.
- Schneider, E., and Hunke, S. (1998) ATP-binding-cassette (ABC) transport systems: functional and structural aspects of the ATP-hydrolyzing subunits/domains. *FEMS Microbiol Rev* **22**: 1-20.
- Schuler, M.A., and Werck-Reichhart, D. (2003) Functional genomics of P450s. *Annu. Rev. Plant Biol.* **54**: 629–667.
- Schulz, H., Hennecke, H., and Thony-Meyer, L. (1998) Prototype of a heme chaperone essential for cytochrome *c* maturation. *Science* **281**: 1197-1200.
- Schulz, H., Fabianek, R.A., Pelliccioli, E.C., Hennecke, H., and Thony-Meyer, L. (1999) Heme transfer to the heme chaperone CcmE during cytochrome *c* maturation requires the CcmC protein, which may function independently of the ABC-transporter CcmAB. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 6462-6467.
- Schulz, H., Pelliccioli, E.C., and Thony-Meyer, L. (2000) New insights into the role of CcmC, CcmD and CcmE in the haem delivery pathway during cytochrome *c* maturation by a complete mutational analysis of the conserved tryptophan-rich motif of CcmC. *Mol Microbiol* **37**: 1379-1388.
- Schulz, H., and Thony-Meyer, L. (2000) Interspecies complementation of *Escherichia coli* ccm mutants: CcmE (CycJ) from *Bradyrhizobium japonicum* acts as a heme chaperone during cytochrome *c* maturation. *J Bacteriol* **182**: 6831-6833.
- Setterdahl, A.T., Goldman, B.S., Hirasawa, M., Jacquot, P., Smith, A.J., Kranz, R.G., and Knaff, D.B. (2000) Oxidation-reduction properties of disulfide-containing proteins of the *Rhodobacter capsulatus* cytochrome *c* biogenesis system. *Biochemistry* **39**: 10172-10176.
- Sherman, F. (1990) Studies of yeast cytochrome *c*: how and why they started and why they continued. *Genetics* **125**: 9-12.
- Shigeoka, S., Ishikawa, T., Tamoi, M., Miyagawa, Y., Takeda, T., Yabuta, Y., and Yoshimura, K. (2002) Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *J Exp Bot* **53**: 1305-1319.
- Silver, R.P., Prior, K., Nsahlai, C., and Wright, L.F. (2001) ABC transporters and the export of capsular polysaccharides from gram-negative bacteria. *Res Microbiol* **152**: 357-364.
- Smith, P.C., Karpowich, N., Millen, L., Moody, J.E., Rosen, J., Thomas, P.J., and Hunt, J.F. (2002) ATP binding to the motor domain from an ABC transporter drives formation of a nucleotide sandwich dimer. *Mol Cell* **10**: 139-149.
- Spielewoy, N., Schulz, H., Grienemberger, J.M., Thöny-Meyer, L., and Bonnard, G. (2001) CCME, a nuclear-encoded heme-binding protein involved in cytochrome *c* maturation in plant mitochondria. *J. Biol. Chem.* **276**: 5491-5497.
- Stagljar, I., Korostensky, C., Johnsson, N., and te Heesen, S. (1998) A genetic system based on split-ubiquitin for the analysis of interactions between membrane proteins *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 5187-5192.
- Stahl, A., Moberg, P., Ytterberg, J., Panfilov, O., Brockenhuus Von Lowenhielm, H., Nilsson, F., and Glaser, E. (2002) Isolation and identification of a novel mitochondrial metalloprotease (PreP) that degrades targeting presequences in plants. *J Biol Chem* **277**: 41931-41939.
- Stefkova, J., Poledne, R., and Hubacek, J.A. (2004) ATP-binding cassette (ABC) transporters in human metabolism and diseases. *Physiol Res* **53**: 235-243.
- Steiner, H., Zollner, A., Haid, A., Neupert, W., and Lill, R. (1996) Heme binding to a conserved Cys-Pro-Val motif is crucial for the catalytic function of mitochondrial heme lyases. *J. Biol. Chem.* **271**: 32605-32611.
- Sterling, J.D., Quigley, H.F., Orellana, A., and Mohnen, D. (2001) The catalytic site of the pectin biosynthetic enzyme alpha-1,4-galacturonosyltransferase is located in the

- lumen of the Golgi. *Plant Physiol* **127**: 360-371.
- Sterling, J.D., Atmodjo, M.A., Inwood, S.E., Kumar Kolli, V.S., Quigley, H.F., Hahn, M.G., and Mohnen, D. (2006) Functional identification of an *Arabidopsis* pectin biosynthetic homogalacturonan galacturonosyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 5236-5241.
- Stock, D., Gibbons, C., Arechaga, I., Leslie, A.G., and Walker, J.E. (2000) The rotary mechanism of ATP synthase. *Curr Opin Struct Biol* **10**: 672-679.
- Stroebel, D., Choquet, Y., Popot, J.L., and Picot, D. (2003) An atypical haem in the cytochrome *b(6)f* complex. *Nature* **426**: 413-418.
- Struglics, A., Fredlund, K.M., Rasmusson, A.G., and Moller, I.M. (1993) The presence of a short rdox chain in membrane of intact potato tuber peroxisome and the association of malate dehydrogenase with the peroxisomal membrane. *Physiologia Plantarum* **88**: 19-28.
- Stuart, R.A., and Neupert, W. (1990) Apocytochrome *c*: an exceptional mitochondrial precursor protein using an exceptional import pathway. *Biochimie* **72**: 115-121.
- Stupar, R.M., Lilly, J.W., Town, C.D., Cheng, Z., Kaul, S., Buell, C.R., and Jiang, J. (2001) Complex mtDNA constitutes an approximate 620-kb insertion on *Arabidopsis thaliana* chromosome 2: implication of potential sequencing errors caused by large-unit repeats. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 5099-5103.
- Subba Rao, G., Bachhawat, A.K., and Gupta, C.M. (2002) Two-hybrid-based analysis of protein-protein interactions of the yeast multidrug resistance protein, Pdr5p. *Funct Integr Genomics* **1**: 357-366.
- Sun, H., and Nathans, J. (2001) ABCR, the ATP-binding cassette transporter responsible for Stargardt macular dystrophy, is an efficient target of all-trans-retinal-mediated photooxidative damage *in vitro*. Implications for retinal disease. *J Biol Chem* **276**: 11766-11774.
- Tame, J.R., Murshudov, G.N., Dodson, E.J., Neil, T.K., Dodson, G.G., Higgins, C.F., and Wilkinson, A.J. (1994) The structural basis of sequence-independent peptide binding by OppA protein. *Science* **264**: 1578-1581.
- Thöny-Meyer, L., Fischer, F., Kunzler, P., Ritz, D., and Hennecke, H. (1995) *Escherichia coli* genes required for cytochrome *c* maturation. *J Bacteriol* **177**: 4321-4326.
- Thöny-Meyer, L., and Kunzler, P. (1997) Translocation to the periplasm and signal sequence cleavage of preapocytochrome *c* depend on sec and lep, but not on the ccm gene products. *Eur J Biochem* **246**: 794-799.
- Thöny-Meyer, L. (2000) Haem-polypeptide interactions during cytochrome *c* maturation. *Biochim Biophys Acta* **1459**: 316-324.
- Throne-Holst, M., Thony-Meyer, L., and Hederstedt, L. (1997) *Escherichia coli* ccm in-frame deletion mutants can produce periplasmic cytochrome *b* but not cytochrome *c*. *FEBS Lett* **410**: 351-355.
- Tichy, M., and Vermaas, W. (1999) Accumulation of pre-apocytochrome *f* in a *Synechocystis* sp. PCC 6803 mutant impaired in cytochrome *c* maturation. *J Biol Chem* **274**: 32396-32401.
- Tong, J., and Margoliash, E. (1998) Cytochrome *c* heme lyase activity of yeast mitochondria. *J Biol Chem* **273**: 25695-25702.
- Tovar-Mendez, A., Miernyk, J.A., and Randall, D.D. (2003) Regulation of pyruvate dehydrogenase complex activity in plant cells. *Eur J Biochem* **270**: 1043-1049.
- Tsui, L.C. (1992) The spectrum of cystic fibrosis mutations. *Trends Genet* **8**: 392-398.
- Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., and Yoshikawa, S. (1996) The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome *c* oxidase at 2.8 Å. *Science* **272**: 1136-1144.

- Turba, A., Jetzek, M., and Ludwig, B. (1995) Purification of *Paracoccus denitrificans* cytochrome *c552* and sequence analysis of the gene. *Eur J Biochem* **231**: 259-265.
- Turkarlan, S., Sanders, C., Ekici, S., and Daldal, F. (2008) Compensatory Thio-redox Interactions Between DsbA, CcdA and CcmG Unveil the Apocytochrome *c* Holdase Role of CcmG During Cytochrome *c* Maturation. *Mol Microbiol*.
- Turmel, M., Otis, C., and Lemieux, C. (2003) The mitochondrial genome of *Chara vulgaris*: insights into the mitochondrial DNA architecture of the last common ancestor of green algae and land plants. *Plant Cell* **15**: 1888-1903.
- Unseld, M., Marienfeld, J.R., Brandt, P., and Brennicke, A. (1997) The mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana* contains 57 genes in 366,924 nucleotides. *Nat Genet* **15**: 57-61.
- van Veen, H.W., Callaghan, R., Soceneantu, L., Sardini, A., Konings, W.N., and Higgins, C.F. (1998) A bacterial antibiotic-resistance gene that complements the human multidrug-resistance P-glycoprotein gene. *Nature* **391**: 291-295.
- Veramendi, J., Fernie, A.R., Leisse, A., Willmitzer, L., and Trethewey, R.N. (2002) Potato hexokinase 2 complements transgenic *Arabidopsis* plants deficient in hexokinase 1 but does not play a key role in tuber carbohydrate metabolism. *Plant Mol Biol* **49**: 491-501.
- Verrier, P.J., Bird, D., Burla, B., Dassa, E., Forestier, C., Geisler, M., Klein, M., Kolukisaoglu, U., Lee, Y., Martinoia, E., Murphy, A., Rea, P.A., Samuels, L., Schulz, B., Spalding, E.J., Yazaki, K., and Theodoulou, F.L. (2008) Plant ABC proteins, a unified nomenclature and updated inventory. *Trends Plant Sci* **13**: 151-159.
- Vignols, F., Brehelin, C., Surdin-Kerjan, Y., Thomas, D., and Meyer, Y. (2005) A yeast two-hybrid knockout strain to explore thioredoxin-interacting proteins in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 16729-16734.
- von Mering, C., Krause, R., Snel, B., Cornell, M., Oliver, S.G., Fields, S., and Bork, P. (2002) Comparative assessment of large-scale data sets of protein-protein interactions. *Nature* **417**: 399-403.
- von Wachenfeldt, C., and Hederstedt, L. (1990) *Bacillus subtilis* 13-kilodalton cytochrome *c-550* encoded by *cccA* consists of a membrane-anchor and a heme domain. *J Biol Chem* **265**: 13939-13948.
- Walker, J.E., Saraste, M., Runswick, M.J., and Gay, N.J. (1982) Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J* **1**: 945-951.
- Werhahn, W., Niemeyer, A., Jansch, L., Kruft, V.V., Schmitz, U.K., and Braun, H.P. (2001) Purification and Characterization of the Preprotein Translocase of the Outer Mitochondrial Membrane from *Arabidopsis*. Identification of Multiple Forms of TOM20. *Plant Physiol* **125**: 943-954.
- Wieczorke, R., Dlugai, S., Krampe, S., and Boles, E. (2003) Characterisation of mammalian GLUT glucose transporters in a heterologous yeast expression system. *Cell Physiol Biochem* **13**: 123-134.
- Wiggins, C.A., and Munro, S. (1998) Activity of the yeast MNN1 alpha-1,3-mannosyltransferase requires a motif conserved in many other families of glycosyltransferases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 7945-7950.
- Wolfger, H., Mamnun, Y.M., and Kuchler, K. (2001) Fungal ABC proteins: pleiotropic drug resistance, stress response and cellular detoxification. *Res Microbiol* **152**: 375-389.
- Wu, G., Delgado, M.J., Vargas, C., Davies, A.E., Poole, R.K., and Downie, J.A. (1996) The cytochrome *bc₁* complex but not *CycM* is necessary for symbiotic nitrogen fixation by *Rhizobium leguminosarum*. *Microbiology* **142**: 3381-3388.
- Xia, D., Yu, C.A., Kim, H., Xia, J.Z., Kachurin, A.M., Zhang, L., Yu, L., and Deisenhofer, J.

- (1997) Crystal structure of the cytochrome bc_1 complex from bovine heart mitochondria. *Science* **277**: 60-66.
- Xie, Z., and Merchant, S. (1996) The plastid-encoded *ccsA* gene is required for heme attachment to chloroplast *c*-type cytochromes. *The Journal of Biological Chemistry* **271**: 4632-4639.
- Xie, Z., Culler, D., Dreyfuss, B., W., Kuras, R., Wollman, F.-A., Girard-Bascou, J., and Merchant, S. (1998) Genetic analysis of chloroplast *c*-type cytochrome assembly in *Chlamydomonas reinhardtii*: one chloroplast locus and at least four nuclear loci are required for heme attachment. *Genetics* **148**: 681-692.
- Xie, Z., and Merchant, S. (1998) A novel pathway for cytochromes *c* biogenesis in chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* **1365**: 309-318.
- Xu, X.M., Adams, S., Chua, N.H., and Moller, S.G. (2005) AtNAP1 represents an atypical SufB protein in Arabidopsis plastids. *J Biol Chem* **280**: 6648-6654.
- Yamanaka, H., Maehira, F., Oshiro, M., Asato, T., Yanagawa, Y., Takei, H., and Nakashima, Y. (2000) A possible interaction of thioredoxin with VDUP1 in HeLa cells detected in a yeast two-hybrid system. *Biochem Biophys Res Commun* **271**: 796-800.
- Yankovskaya, V., Horsefield, R., Tornroth, S., Luna-Chavez, C., Miyoshi, H., Leger, C., Byrne, B., Cecchini, G., and Iwata, S. (2003) Architecture of succinate dehydrogenase and reactive oxygen species generation. *Science* **299**: 700-704.
- Zaffagnini, M., Michelet, L., Marchand, C., Sparla, F., Decottignies, P., Le Marechal, P., Miginiac-Maslow, M., Noctor, G., Trost, P., and Lemaire, S.D. (2007) The thioredoxin-independent isoform of chloroplastic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is selectively regulated by glutathionylation. *Febs J* **274**: 212-226.
- 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.
- Zhang, Z., Huang, L., Shulmeister, V.M., Chi, Y.I., Kim, K.K., Hung, L.W., Crofts, A.R., Berry, E.A., and Kim, S.H. (1998) Electron transfer by domain movement in cytochrome bc_1 . *Nature* **392**: 677-684.
- Zollner, A., Rodel, G., and Haid, A. (1992) Molecular cloning and characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* CYT2 gene encoding cytochrome- c_1 -heme lyase. *Eur J Biochem* **207**: 1093-1100.

Functional interactions of *Arabidopsis thaliana* *c*-type cytochromes maturation proteins

c-type cytochromes are electron carriers characterized by the covalent attachment of their heme cofactor to two cysteinyl residues of the apocytochrome via two thioether bonds. Plant mitochondria follow a pathway (called system I) similar to the one present in α - and γ -protéobacteria for the maturation of *c*-type cytochromes. This pathway is completely different from the much simpler one found in animal and fungal mitochondria. The Ccm proteins of system I include subunits of an ABC transporter, a redox protein, proteins involved in heme delivery and a putative heme lyase.

The system I includes an ABC transporter (ATP Binding Cassette), a transporter composed of two transmembrane units and two extramembrane units. In bacteria, the ccm ABC transporter is composed of CcmA, CcmB and maybe CcmC proteins. In *Arabidopsis*, only the AtCcmB and AtCcmC gene have been found in the mitochondrial genome. Previous works have characterized *AtNAP10*, a potential *CcmA* ortholog, in *Arabidopsis* nuclear genome. To confirm that *AtNAP10* indeed corresponds to *AtCCMA*, we performed different interaction assays based on yeast two hybrid techniques to test if AtNAP10 could interact with AtCcmB and/or AtCcmC. An interaction has indeed been detected between AtNAP10 and AtCcmB, confirming that *AtNAP10* correspond to the mitochondrial *CcmA* ortholog.

Other studies made on *Atccma* mutants and their complementation in *Arabidopsis* demonstrated that *AtCCMA* is an essential gene.

The proteins AtCcmC and AtCCME have a supposed role in heme delivery. AtCcmF_{N1}, AtCcmF_{N2} and AtCcmF_C have a supposed role in heme assembly. Some interactions between the bacterial orthologs of all these proteins have been detected. Other yeast two hybrids tests were made to determine if these interactions could also be found between the *Arabidopsis* proteins. The only relevant interaction detected was between AtCcmF_{N2} and AtCCMH, a Ccm protein believed to reduce apocytochrome *c*.

In bacteria, three proteins (CcmG, DsbD and CcmH) make a reduction pathway. In plant mitochondria, only the ortholog of CcmH is found. We performed a yeast two hybrid cDNA library screen using AtCCMH as a bait to find the potential partners of AtCCMH. Candidates were identified and are still under analysis.

Altogether, the results obtained during this thesis give new elements and perspectives for the understanding of system I of *c*-type cytochromes found in plant mitochondria.