



Thèse présentée pour obtenir le grade de Docteur  
de l'Université Louis Pasteur Strasbourg I

Discipline: Sciences du vivant  
Spécialité: Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie  
Par Claire PUJOL

Importation de macromolécules dans les mitochondries et  
chloroplastes d'*Arabidopsis thaliana*:  
Etude des séquences de double adressage des  
aminoacyl-ARNt synthétases et de la voie de  
synthèse du Gln-ARNt<sup>Gln</sup>

Soutenue publiquement le 25 novembre 2008  
devant la commission d'examen

Directrice de thèse: Dr. Anne-Marie DUCHENE  
ULP (Strasbourg)  
Rapporteur interne: Pr. Catherine FLORENTZ  
ULP (Strasbourg)  
Rapporteur externe: Pr. Christophe ROBAGLIA  
Université de la Méditerranée (Marseille)  
Rapporteur externe: Dr. Norbert ROLLAND  
CEA (Grenoble)

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



Je remercie tout particulièrement Madame **Catherine Florentz**, Professeur à l'Université Louis Pasteur de Strasbourg, Monsieur **Christophe Robaglia**, Professeur à l'Université de la méditerranée, Aix-Marseille, ainsi que Monsieur **Norbert Rolland**, Directeur de Recherche à l'Institut de Recherche en Technologies et Sciences du Vivant de Grenoble, qui ont accepté de juger ce travail et d'en être les rapporteurs.

Je tiens à remercier vivement **Anne-Marie** qui m'a supportée quatre années durant... Malgré mes questions stupides, mes Oups-j'ai-oublié-de-mettre-le-contrôle, mes discours interminables sur l'inflation du prix de paquet de Fraises Tagada, et malgré touuuut le reste...Merci Anne-Marie, merci, merci, merci, merci, mer....

A mes trois drôles de dames, **S'mira**, maman **Sarah** et Mamie **Thalia**, pour leurs gentillesse, leurs patience (surtout leur patience !) pour tous les bons moments au labo et ailleurs...

Je tiens à remercier tous ceux qui font ou qui ont fait partie du 326 :

Surtout (déjà, avant tout ...) **Laurence** merci pour la bonne humeur, l'énergie, les conseils, les croissants, les Kinders, et tout le reste,

« Les femmes d'abord ! » **Liza** (Ohhh Liza ! THE funny girl of the lab), **Morgane** (digne disciple, qui ne va pas tarder à dépasser le maître), **Yasmina** et **Hélène**

**Antonio**, **Arnaud**, **Baligh**, (**François**)<sup>2</sup>, **Romarc**, les garçons du 326 tous très gentils, mais avec un énoorme défaut : leur capacité à désertier le laboratoire dès qu'il s'agit d'éplucher les patates !

Sans oublier ceux que je n'ai pas pu remercier dans mon rapport de DEA : Merciiii **Romary**, **Marlyse** et **Fatime**

Pas de merci assez « gigantesque » pour vous deux **Monique** et **Anne**, toujours prêtes à répondre aux questions stupides, à dépanner, à discuter de la pluie et du beau temps (surtout de la pluie, vive l'Alsace !)

Aux « jeunes précaires » de l'étage **Alexis**, **Kamel** (Amddaklinou), **Jéremie**, **Romain** (« Orange-Doudoune-Man » qui pendant trois ans n'a eu de cesse de critiquer mon goût prononcé pour les couleurs !), **Noha**, sans oublier les « imposteurs » de viro **Celine**, **Diane** et **Rrrrulia** ; à ceux qui ne sont pas rester assez longtemps **Carolina** la Brésilienne et **Carolina** l'Argentine, **Elina**, **Dasha**...

A tous les « vieux permanents » (et oui, on ne peut pas tout avoir...) : **André**, **Danièle**, « **Félipé** », **Frédérique**, **Gag**, **Géraldine**, **Heike**, Le Grand Chef **Jean-Michel**, **Jean**, **José**, **Patrice**, **Véronique**...

A tous les gens-gentils qui remplissent l'IBMP, a tous ceux que j'ai forcément oubliée

A la **Laiterie** et à mes **Binômes de Concert**, à mes **Amis** (cf. Binômes de concert et binômes tout court) à ma **Famille**.



## ABBREVIATIONS

A	Adénine
aa	Acide aminé
aaRS	Aminoacyl-ARNt synthétase
ADN	Acide désoxyribonucléique
AdT	Amidotransférase ARNt dépendante
ADP	Adénosine-5'-diphosphate
APS	Persulfate d'ammonium
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messager
ARNt	Acide ribonucléique de transfert
ATP	Adénosine triphosphate
BET	Bromure d'éthidium
°C	Degré (s) Celsius
Cam	Chloramphénicol
CIP	Phosphatase intestinale de veau
Ci	Curie
Da	Dalton
DO	Densité optique
DTT	Dithiothréitol
EDTA	Ethylène diamine tétraacétate
g	Gramme
<i>g</i>	Multiple de la gravitation naturelle de la terre
Glu	Glutamate
GluRS	Glutamyl-ARNt synthétase
Gln	Glutamine
GlnRS	Glutaminyl-ARNt synthétase
GFP	GFP « Green Fluorescent Protein »
h	Heure
Hepes	Acide N-2 hydroxy éthyl pipérazine N'-2 éthane sulfonique
IPTG	Isopropyl-b-D-1-thiogalactopyranoside

Kan	Kanamycine
kb	Kilo bases
LB	Luria broth
$\mu$	Micro
M	Molaire
mA	Milliampère
min	Minute
mt	Mitochondrial/mitochondriaux
PAGE	Electrophorèse sur gel de polyacrylamide
PM	Poids moléculaire
SDS	Dodécyl sulfate de sodium
SSC	Standard sodium citrate
TBE	Tris borate EDTA
TCA	Acide trichloroacétique
Tris	Tris(hydroxyméthyl)aminométhane
U	Unité
UV	Ultra-violet
V	Volt
p/v	Poids à volume
v/v	Volume à volume
W	Watt
X-GAL	5-bromo-4-chloro-3-indole- $\beta$ -D-galactopyrranoside

**INTRODUCTION**

<b>I.MITOCHONDRIES ET CHLOROPLASTES, GENERALITES</b>	<b>1</b>
1.LES MITOCHONDRIES	2
A-STRUCTURE ET FONCTIONS	2
B.GENOME DES MITOCHONDRIES	3
1.Contenu des génomes mitochondriaux	3
2.Organisation du génome	4
3.Particularité du code génétique mitochondrial	5
2.LES PLASTES	5
A-STRUCTURE ET FONCTIONS	6
B-GENOMES DES CHLOROPLASTES	8
1.Contenu des génomes	8
2.Organisation du génome chloroplastique	9
3.ECHANGES ENTRE GENOMES	9
A-TRANSFERT ET PERTE DE GENES	10
1.Gènes codant pour les ARNr	10
2.Gènes codant pour les ARNt	10
3.Gènes codant pour les protéines	11
B-POURQUOI LES ORGANITES PERDENT LEUR GENOME ?	11
C-POURQUOI LES ORGANITES CONTIENNENT ENCORE UN GENOME ?	11
<b>II.LES MOLECULES IMPLIQUEES DANS LA SYNTHESE DES PROTEINES</b>	<b>14</b>
1.GENERALITES	15
2.LES ARN DE TRANSFERT (ARNt)	15
A-STRUCTURE DES ARNt	15
B-DU GENE A L'ARNt	16
C-ELEMENTS D'IDENTITE DES ARNt	18
D-EXPORTATION DES ARNt DU NOYAU VERS LE CYTOPLASME	18
3.LES AMINOACYL-ARNt SYNTHETASES (aaRS)	19
A-LES DEUX CLASSES D'aaRS	19
1.Les aaRS de classe I	19
2.Les aaRS de classe II	20
B-ORGANISATION DES AARS	20
1.Structure modulaire	20
2.Complexes multisynthétasiques	21
3-Autres fonctions des aaRS	22
C-ORGANISATION DES GENES CODANT POUR LES AARS D'ORGANITES	22
4.VOIES ALTERNATIVES DANS L'AMINOACYLATION DES ARNt	24
A-SYNTHESE DU GLN-ARNt <sup>Gln</sup> DANS LES ORGANITES	25
1.Dans les chloroplastes	25
2.Dans les mitochondries	25
2.a - Dans les mitochondries de protozoaires	26
2.b - Dans les mitochondries de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	26
2.c - Dans les mitochondries d' <i>Homo sapiens</i>	26
2.d - Dans les mitochondries végétales	26
C-LES ENZYMES IMPLIQUEES DANS LA VOIE INDIRECTE	27
1.Amidotransférases ARNt dépendante	27

1.a – Généralités	27
1.b - Réactions catalysées par l'AdT	28
1.c - Rôles des différentes sous-unités	28
1.d - Reconnaissance des ARNt par l'AdT :	29
2.AaRS non discriminante	29
2.a - GluRS	29
2.b – AspRS	30
3.Complexe entre Adt, ARNt et aaRS	30
D-AUTRE VOIES INDIRECTES	31
1.Aminoacylation de l'ARNt Cystéine	31
2.Aminoacylation de l'ARNt Selenocystéine	31
<b>III.IMPORTATION DES MACROMOLECULES DANS LES MITOCHONDRIES ET LES CHLOROPLASTES</b>	<b>32</b>
1.IMPORTATION DES ACIDES NUCLEIQUES	33
A-DANS LES MITOCHONDRIES	33
1.Importation des ARNt	33
1.a - Importation des ARNt dans les mitochondries de levure :	33
1.b - Importation des ARNt dans les mitochondries de protozoaires :	34
1.c - Importation des ARNt dans les mitochondries de plantes :	34
2. Importation des autres ARN	35
3.Importation ADN	35
B-DANS LES CHLOROPLASTES	35
1.Importation des ARNt	36
2.Importation des ARNm	36
2.IMPORTATION DES PROTEINES	36
A-LES ELEMENTS REQUIS POUR L'IMPORTATION : LES SEQUENCES D'ADRESSAGE	36
1.Séquences d'adressage pour les protéines destinées aux mitochondries : pré-séquences	37
2.Séquences d'adressage pour les protéines destinées aux chloroplastes : peptides transit	38
3.Les logiciels de prédiction	38
B-SYSTEME DE RECONNAISSANCE ET DE TRANSLOCATION	39
1.Importation dans les mitochondries	39
1.a - Importation dans les mitochondries de <i>S. cerevisiae</i>	40
1.b - Importation dans les mitochondries de plante	42
2.Importation des protéines dans les chloroplastes	43
C-CLIVAGE DE LA SEQUENCE D'ADRESSAGE : MPP ET SPP	46
D-CAS PARTICULIER : PROTEINES DOUBLEMENT ADRESSEES AUX MITOCHONDRIES ET AUX CHLOROPLASTES.	47
1. Généralités sur le double adressage	47
2.Double adressage mitochondrial/chloroplastique	48
3. Séquences d'adressage ambiguës	49

**MATERIEL ET METHODES**

<b>I.MATERIEL</b>	<b>52</b>
1.MATERIEL VEGETAL	53
2.SOUCHES BACTERIENNES	53
A-LES SOUCHES D' <i>ESCHERICHIA COLI</i>	53
B-SOUCHE D' <i>AGROBACTERIUM TUMEFACIENS</i>	54
3.PLASMIDES	54
4.CONSTRUCTIONS	56
5.ANTICORPS POLYCLONAUX	56
6.OLIGONUCLEOTIDES	57
7.OUTILS INFORMATIQUES	57
<b>II.METHODES</b>	<b>59</b>
1.TECHNIQUES SPECIFIQUES A L'ADN	60
A-AMPLIFICATION PAR PCR	60
B-MUTAGENESE PAR PCR	60
C-ELECTROPHORESE SUR GEL D'AGAROSE	61
D-PURIFICATION DES FRAGMENTS D'ADN ISSUS DE GELS D'AGAROSE	62
E-TECHNIQUES DE CLONAGE	62
1.Clonage de fragments coupés par des enzymes de restriction	62
1.a - Digestion par des enzymes de restriction	62
1.b - Déphosphorylation de l'extrémité 5'-phosphate d'un plasmide	62
1.c - Ligation	62
1.d - Préparation des bactéries compétentes	63
1.e - Transformation et sélection	63
2.Clonage direct d'un produit PCR	64
2.a - Principe	64
2.b - Méthode	65
F-CRIBLAGE DE COLONIES PAR PCR	65
G-PREPARATION DE L'ADN PLASMIDIQUE	65
1.Minipréparation d'ADN plasmidique	65
2.Midipréparation d'ADN plasmidique	65
H-SEQUENÇAGE DE L'ADN	66
I-MARQUAGE D'OLIGONUCLEOTIDES	66
2.TECHNIQUES SPECIFIQUES A L'ARN	66
A.EXTRACTION D'ARNt	66
1.ARNt totaux	66
2.ARNt mitochondriaux et chloroplastiques	67
B-ELECTROPHORESE DENATURANTE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE	67
C-« NORTHERN BLOT »	68
1.Transfert des ARN	68
2.Hybridation de la sonde	68
D-TRANSCRIPTION <i>IN VITRO</i>	69
E-DETERMINATION DE L'ACTIVITE AMINOACCEPTRICE DES ARNt	69

1.Préparation des extraits enzymatiques	69
1.a - Extrait enzymatique total de feuilles d' <i>A. thaliana</i>	69
1.b - Extraits enzymatiques mitochondriaux et de chloroplastiques	70
2.Aminoacylation <i>in vitro</i>	70
3.Amidation <i>in vitro</i>	71
F-FRACTIONNEMENT DES ARNT PAR ELECTROPHORESE 2D	72
1.Préparation des gels de polyacrylamide et électrophorèse	72
2.Détection et élution des ARNt	73
3.QUANTIFICATION DE L'ADN ET DE L'ARN	73
4.TECHNIQUES RELATIVES AUX PROTEINES	74
A-QUANTIFICATION DES PROTEINES	74
B-TECHNIQUES DE CONCENTRATION DES PROTEINES	75
C-ELECTROPHORESE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE	75
1.Electrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)	75
2.Détection des protéines après fractionnement électrophorétique	76
D-IMMUNOREVELATION DE TYPE « WESTERN BLOT »	76
1.Transfert des protéines sur membrane	76
2.Coloration des protéines après électrotransfert sur membrane	77
3.Fixation des anticorps	77
4.Révélation de la fixation des anticorps	77
E-PURIFICATION DES ANTICORPS	78
1.Obtention de l'anticorps anti-AdT	78
2.Purification des anticorps anti-AdT	78
F.SUREXPRESSON DE PROTEINES DANS <i>E.COLI</i>	79
5.TECHNIQUES RELATIVES AUX ORGANELLES DE PLANTES	79
A-PURIFICATION DES ORGANITES	79
1.Purification des mitochondries	79
1.a - Mitochondries de <i>S. tuberosum</i>	79
1.b - Mitochondries d' <i>A.thaliana</i>	80
1.c - Mitochondries de <i>P. sativum</i>	81
2.Purification des chloroplastes	81
2.a - Chloroplastes de <i>P. sativum</i>	82
2.b - Chloroplastes d' <i>A.thaliana</i>	83
B-TEST D'IMPORTATION <i>IN VITRO</i> DES PROTEINES	83
1.Transcription et traduction <i>in vitro</i>	83
2.Test d'importation <i>in vitro</i> dans les mitochondries	84
3.Test d'importation <i>in vitro</i> dans les chloroplastes	85
4.Système <i>in vitro</i> de double importation	86
6.OBSERVATIONS MICROSCOPIQUES	86
A-CARACTERISTIQUES DU MICROSCOPE CONFOCAL LSM	87
B-PREPARATION DES PROTOPLASTES DE <i>N. BENTHAMIANA</i>	87
1.Transformation des cellules végétales par <i>A. tumefaciens</i>	87
2.Préparation des protoplastes de <i>N. benthamiana</i>	88
C-COLORATION DES MITOCHONDRIES	88
D-COLORATION DU RETICULUM	88
E- BREFELDINE A	88
F-TRAITEMENT DES IMAGES	88

---

**RESULTATS**

**CHAPITRE I :**

**Voie de biosynthèse du Gln-ARNt<sup>Gln</sup> dans les mitochondries et les chloroplastes de plante. 90**

Article 1

**CHAPITRE II :**

**Caractérisation des séquences de double adressage : Importance des résidus les plus conservés pour l'adressage vers l'un ou l'autre des compartiments. 94**

Article 2

**CHAPITRE III :**

**Caractérisation des séquences de double adressage : Organisation des séquences d'adressage sous forme de domaines 99**

**CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 114**

**BIBLIOGRAPHIE 125**

**ANNEXES**

---

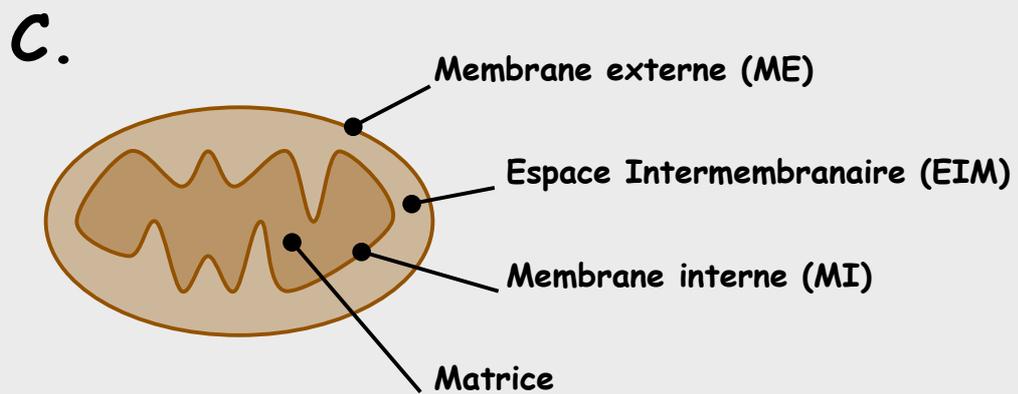
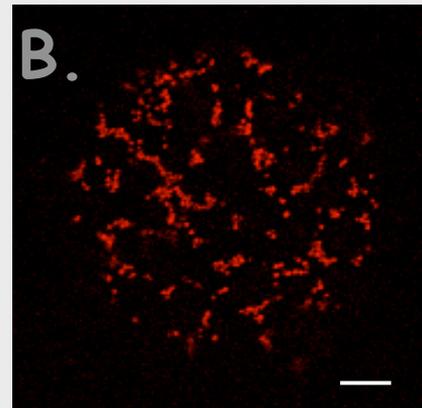
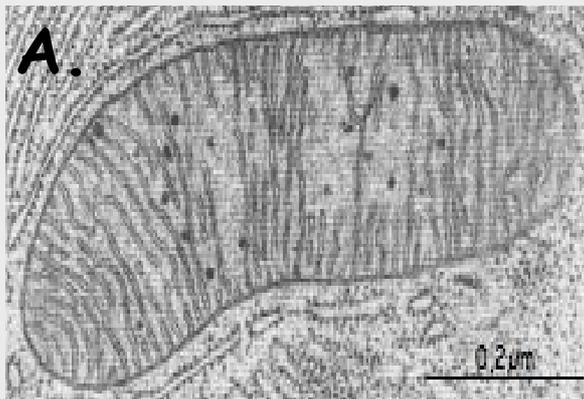


# *Introduction*



# **Chapitre I**

## **Mitochondries et chloroplastes, généralités**



**Figure 1: Les Mitochondries**

**A:** Vue en microscopie électronique.

**B:** Vue en microscopie optique (confocale): mitochondries marquées par un colorant spécifique des mitochondries (Mitotracker), au sein d'un protoplaste de *Nicotiana benthamiana*. L'échelle représente 20 μm.

**C:** Organisation structurale de la mitochondrie.

# 1.LES MITOCHONDRIES

## A-STRUCTURE ET FONCTIONS

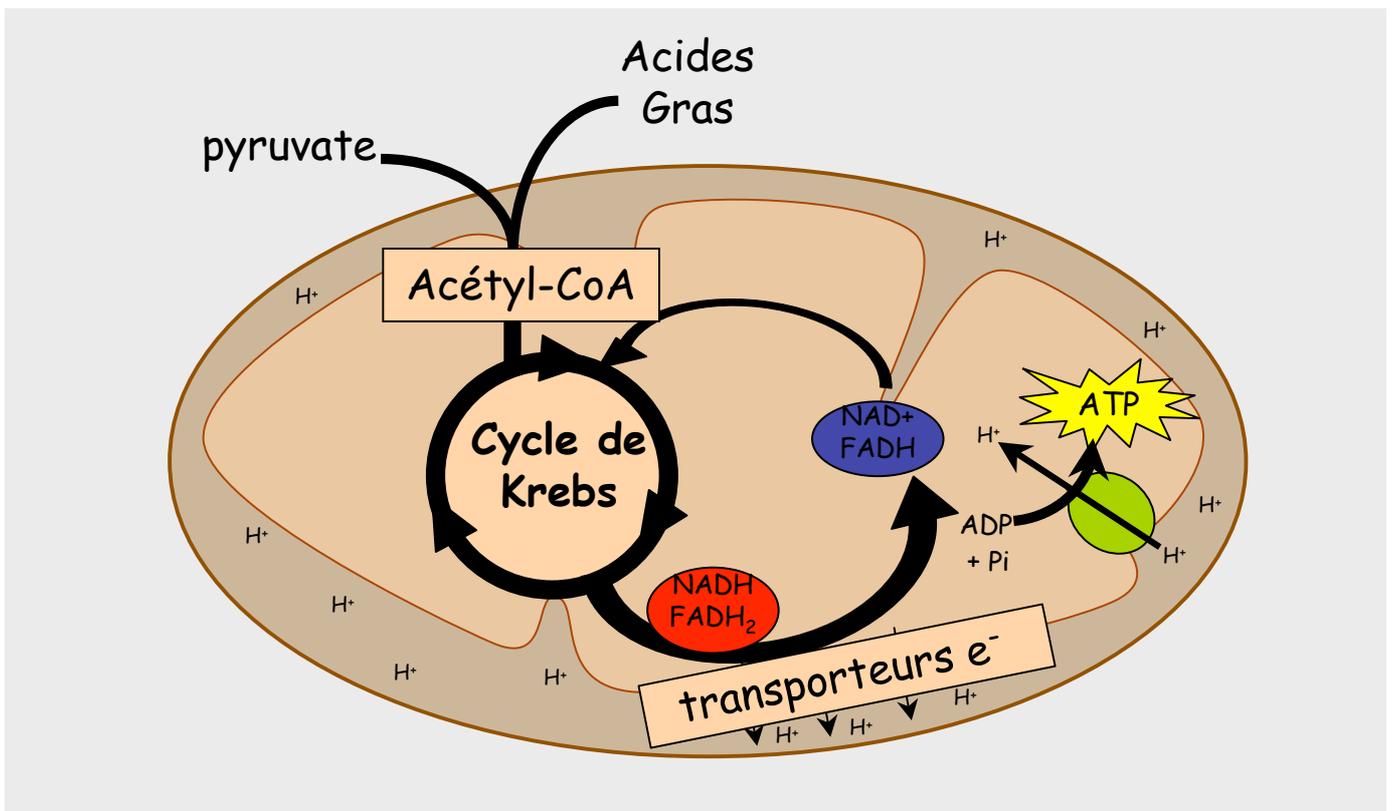
Les mitochondries sont généralement décrites comme des organites ovoïdes de 1 à 10  $\mu\text{m}$  de longueur pour 0,5 à 1  $\mu\text{m}$  de diamètre (**Figure 1**). De taille suffisante pour être visibles en microscopie optique, elles ont pour la première fois été identifiées au 19<sup>ème</sup> siècle. Il aura cependant fallu attendre la mise au point d'un protocole d'isolement de mitochondries intactes pour mieux comprendre leurs organisations et leurs fonctionnements (Neuburger and Douce, 1977).

Elles sont délimitées par deux membranes, membrane externe et membrane interne, qui définissent deux compartiments mitochondriaux séparés : espace matriciel et espace inter-membranaire.

**La membrane externe** contient de nombreuses copies de la porine également connue sous le nom de VDAC (« Voltage Dependant Anion Channel »). Ces protéines transmembranaires forment des canaux au sein de la membrane externe et permettent aux solutés, de taille égale ou inférieure à 10 kDa, de diffuser au travers de la double couche lipidique. La membrane externe renferme également une partie du complexe d'importation des protéines, (complexe TOM pour « Translocase of the Outer Mitochondrial membrane », cf. III.2.B) et un certain nombre d'enzymes impliquées dans la synthèse mitochondriale des lipides (Alberts et al., 1994).

**La membrane interne** est repliée en de nombreuses crêtes qui augmentent considérablement sa surface. Elle est beaucoup moins perméable aux solutés que la membrane externe, et sa composition lipidique est très différente. En effet, elle contient une proportion élevée de phosphatidylcholines et de cardiolipides. Si le rôle de ces phospholipides n'a pas été encore totalement élucidé, leurs capacités d'interaction avec les protéines sont évidentes.

C'est également dans la membrane interne que l'on trouve le taux de protéines le plus élevé de toutes les membranes biologiques étudiées (le rapport protéine/lipide est de 3,2, contre 1,1 pour la membrane mitochondriale externe ou 0,85 pour la membrane plasmique de cellules murines) (Karp, 2007). Ces protéines interviennent essentiellement à trois niveaux :



**Figure 2:** Représentation schématique du mécanisme qui engendre la production d'énergie dans les mitochondries.

Avec:  ATP synthase

elles participent aux réactions d'oxydation de la chaîne respiratoire, à la synthèse d'ATP et elles assurent le passage d'éléments tels que pyruvate, acides gras, ATP ou protéines (par l'intermédiaire du complexe TIM (« Translocase of the Inner Mitochondrial membrane », cf.III.2.B)).

Ces deux membranes définissent un compartiment interne, **la matrice**. Ce compartiment renferme plusieurs copies du génome mitochondrial et les protéines nécessaires à sa transcription et à sa traduction. La synthèse protéique dans les mitochondries ne concerne cependant qu'un nombre restreint de protéines, puisque la grande majorité est codée par le génome nucléaire, puis importée à partir du cytoplasme (cf. III.2).

La matrice renferme également un mélange très concentré de nombreuses enzymes, dont les enzymes de l'hélice de Lynen nécessaires à l'oxydation des acides gras et les enzymes du Cycle de Krebs responsables de l'oxydation du pyruvate (**Figure 2**). Ces réactions d'oxydation permettent la réduction des cofacteurs NADH et FADH<sub>2</sub>. Puis les électrons cédés par les cofacteurs sont transmis spontanément le long de la chaîne respiratoire située au niveau de la membrane interne, jusqu'à l'accepteur final : l'O<sub>2</sub>. Les électrons libérés permettent également la translocation de protons vers l'**espace intermembranaire**. Ceci crée un gradient électrochimique qui est converti en ATP par le retour des protons vers la matrice au travers des ATP synthases.

La production d'ATP n'est pas l'unique fonction assurée par les mitochondries. Des intermédiaires du cycle de Krebs sont utilisés pour la synthèse de divers acides aminés non essentiels. De même, les mitochondries localisées dans les cellules glandulaires animales interviennent dans la synthèse d'hormones stéroïdes (œstrogène, testostérone, ...). Enfin, les mitochondries sont également capables de concentrer des substances telles que des colorants, des protéines, des lipides. Ainsi, elles sont le principal réservoir de calcium de la cellule, dont la libération massive peut aller jusqu'à déclencher l'apoptose.

## B.GENOME DES MITOCHONDRIES

### 1.Contenu des génomes mitochondriaux

Des analyses reposant sur l'organisation et la distribution des génomes mitochondriaux et bactériens indiquent que les mitochondries dérivent d'une  $\alpha$ -protéobactérie

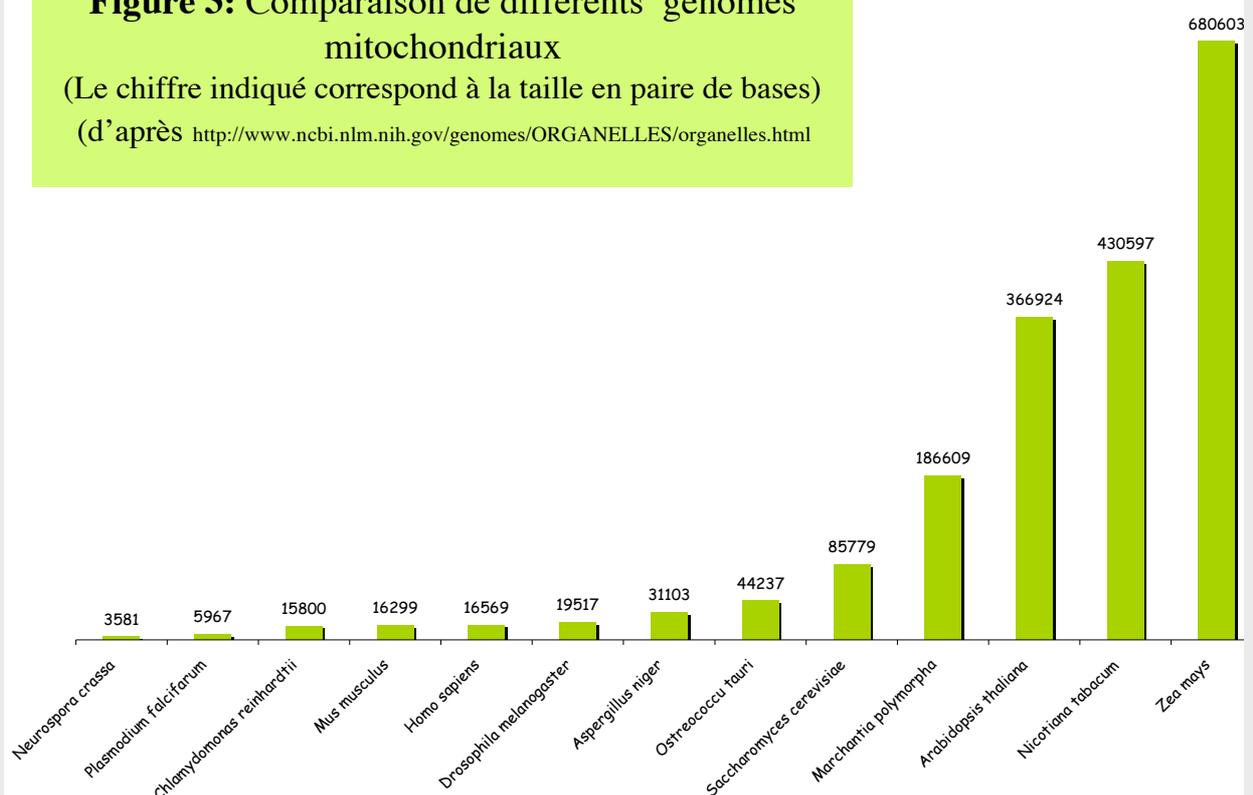
Produit/gène	Nombre de gènes			
	A.t	M.p	C.r	H.s
<b>Complexes respiratoires</b>				
Complexe I (NADH déshydrogénase)/ <i>nad</i>	9	8	5	7
Complexe II (Succinate déshydrogénase)/ <i>sdh</i>	1	2	0	0
Complexe III (Cytochrome c réductase)/ <i>cob</i>	1	1	1	1
Complexe IV (Cytochrome c oxydase)/ <i>cox</i>	3	3	1	3
Complexe V (ATP synthase)/ <i>atp</i>	5	4	0	2
<b>Biogenèse cytochrome c</b>				
Biogenèse des cytochromes c/ <i>ccm</i>	4	5	0	0
<b>Traduction</b>				
Protéines ribosomales/ <i>rps-rpl</i>	7	16	0	0
ARNr/ <i>rrn</i>	3	3	2	2
ARNt/ <i>trn</i>	22	29	3	22
<b>Autres</b>				
Gènes introniques (maturase)	1	10	1	0

**Table 1:**  
Composition des génomes mitochondriaux. Comparaison de l'information génétique présente dans les génomes mitochondriaux de divers organismes (d'après Unsel *et al.*, 1997)  
Avec, A.t: *Arabidopsis thaliana*; M.p: *Marcantia polymorpha*; C.r: *Chlamydomonas reinhardtii*; H.s: *Homo sapiens*.

**Figure 3:** Comparaison de différents génomes mitochondriaux

(Le chiffre indiqué correspond à la taille en paire de bases)

(d'après <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/ORGANELLES/organelles.html>)



(Dyall et al., 2004) : il y a plus de 1,5 milliards d'années, les mitochondries sont apparues suite à l'endosymbiose entre un hôte de type archaebactérien et une bactérie proche de *Rickettsia prowazekii* (Gray et al., 1999).

La conversion de cette  $\alpha$ -protéobactérie en mitochondrie s'est accompagnée d'un transfert massif de gènes au sein du génome nucléaire. Ainsi, aujourd'hui les génomes mitochondriaux ne codent que pour un nombre limité de macromolécules (**Table 1**) : de façon générale, ils codent pour des protéines de la chaîne respiratoire et pour des éléments de la machinerie traductionnelle (ARNr et ARNt). On trouve également dans les génomes mitochondriaux de plantes et de protistes un certain nombre de gènes additionnels qui codent pour des protéines ribosomales et des protéines de la biogenèse du cytochrome c (Marienfeld et al., 1999).

L'ensemble de ces molécules n'est de toute façon pas suffisant pour assurer l'autonomie des organites. C'est pourquoi la majorité des composants protéiques et de nombreux ARNt nécessaires à l'expression du génome mitochondrial sont codés par le génome nucléaire. En effet, 99% des protéines mitochondriales sont codées par le noyau et seules 13 protéines mitochondriales humaines (Taylor et al., 2003) et 32 protéines mitochondriales d'*A. thaliana* sont codées par le génome mitochondrial.

## 2.Organisation du génome

Plus de 1400 génomes mitochondriaux sont aujourd'hui entièrement séquencés. Parmi eux, le génome humain, premier séquencé en 1981 (Anderson et al., 1981) et 30 génomes végétaux, dont celui d'*Arabidopsis thaliana*, plante modèle (Unsold et al., 1997).

Les génomes végétaux représentent les plus grands génomes observés. Ils sont, dans la majorité des cas constitués par une molécule d'ADN bicaténaire circulaire de taille très variable (**Figure 3**). Généralement comprise entre 15 et 60 kpb, elle peut aller, dans les cas extrêmes de 5,9 kpb pour le génome de *plasmodium falciparum*, (Conway, 2000) à 490 kpb pour le génome mitochondrial du riz (Notsu et al., 2002).

Les variations de taille observées entre les différentes espèces ne sont toutefois pas corrélées avec le nombre de gènes. Ainsi, le génome mitochondrial d'*A. thaliana*, 22 fois plus grand que celui de l'homme, ne possède que 57 gènes, contre 37 pour l'homme. Les grandes fluctuations observées sont principalement dues à la longueur et la fréquence des régions intergéniques, très fréquentes chez les plantes. Par exemple, on dénombre dans le génome mitochondrial de riz six paires de séquences dont la taille varie entre 3,1 et 46,6Kpb (Notsu et

	1	2	3	4	5
<b>AGA</b>	Arg	*	-	-	Ser
<b>AGG</b>	Arg	*	-	-	Ser
<b>ATA</b>	Ile	Met	Met	-	Met
<b>TGA</b>	*	Trp	-	Trp	Trp
<b>CTT</b>	Leu	-	Thr	-	-
<b>CTC</b>	Leu	-	Thr	-	-
<b>CTA</b>	Leu	-	Thr	-	-
<b>CTG</b>	Leu	-	Thr	-	-
<b>CGA</b>	Arg	-	X	-	-
<b>CGC</b>	Arg	-	X	-	-
<b>TAA</b>	*	-	-	-	-
<b>TAG</b>	*	-	-	-	-

**Table 2:** Correspondance entre triplet de codon et acide aminés. Code génétique standard également utilisé dans les mitochondries de plantes (1), dans les mitochondries de vertébrés (2), dans les mitochondries de levures (3), dans les mitochondries de protozoaires et de champignons (4), dans les mitochondries d'invertébrés (5). Avec: (\*): codon Stop, (X): pas d'aa correspondant, (-): pas de différences avec le code génétique universel.

al., 2002), et le génome mitochondrial d'*A. thaliana* contient deux larges séquences répétées de 4,2 et 6,5Kb (Unsel et al., 1997).

La taille et la complexité des génomes mitochondriaux de plantes s'expliquent également par l'intégration, au cours de l'évolution de séquences d'ADN exogènes, nucléaire et chloroplastique : dans l'organisme modèle, *A.thaliana*, ces séquences représentent respectivement 1,2 et 4% du génome mitochondrial (Marienfeld et al., 1999).

### 3.Particularité du code génétique mitochondrial

Le code génétique employé pour la synthèse protéique au sein des mitochondries (à l'exception des mitochondries végétales) est différent du code génétique « universel » utilisé lors de la synthèse cytosolique (**Table 2**). Ainsi, par exemple, le codon TGA qui correspond dans le cytosol à un codon stop, code pour un codon tryptophane dans la matrice des mitochondries de mammifères, de champignons ou de protozoaires (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Utils/wprintgc.cgi?mode=c>).

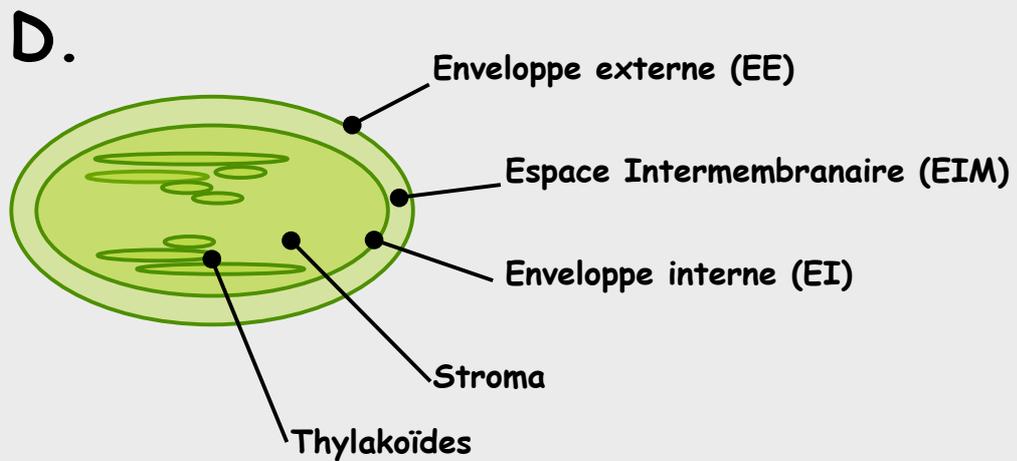
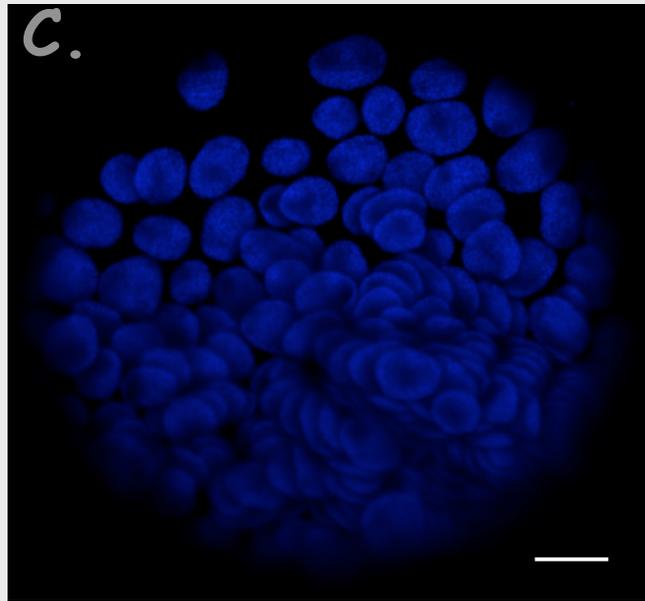
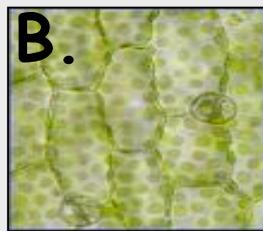
## 2.LES PLASTES

Les chloroplastes assurent la photosynthèse et permettent ainsi l'autotrophie des végétaux au carbone . Ces organites ont une origine endosymbiotique : ils sont issus de l'endosymbiose d'une cyanobactérie chez un eucaryote doté d'une mitochondrie. Chaque chloroplaste provient d'un chloroplaste préexistant, les divisions se réalisant pendant l'interphase, indépendamment de la mitose.

La forme des chloroplastes peut varier dans les différentes cellules d'une même espèce, mais elle est relativement constante dans les cellules d'un même tissu. Dans les cellules de plantes supérieures, chaque cellule contient un grand nombre de chloroplastes sphéroïdes, ovoïdes ou discoïdes.

Leur nombre est relativement constant dans les différentes plantes : de 20 à 40 dans les plantes supérieures, *Chlamydomonas* ne possède qu'un seul chloroplaste.

Parfois distribués de façon homogène dans le cytoplasme, ils sont le plus souvent entassés près du noyau et de la paroi cellulaire.



**Figure 4:** Les Chloroplastes

A: Vue en microscopie électronique.

B: Vue en microscopie optique.

C: Vue en microscopie optique(confocale): autofluorescence des chloroplastes d'un protoplaste de *N. benthamiana*. L'échelle représente 20  $\mu\text{m}$ .

D: Organisation structurale du chloroplaste.

Les plastes sont de plusieurs types et ont des fonctions métaboliques particulières. Certains plastes synthétisent de nouvelles molécules alors que d'autres les emmagasinent (amyloplast, qui stockent l'amidon ou chromoplast, qui accumulent les pigments). Le chloroplaste contient lui la chlorophylle nécessaire à la photosynthèse. C'est à lui seul que nous nous intéresserons au cours de cette étude.

## A-STRUCTURE ET FONCTIONS

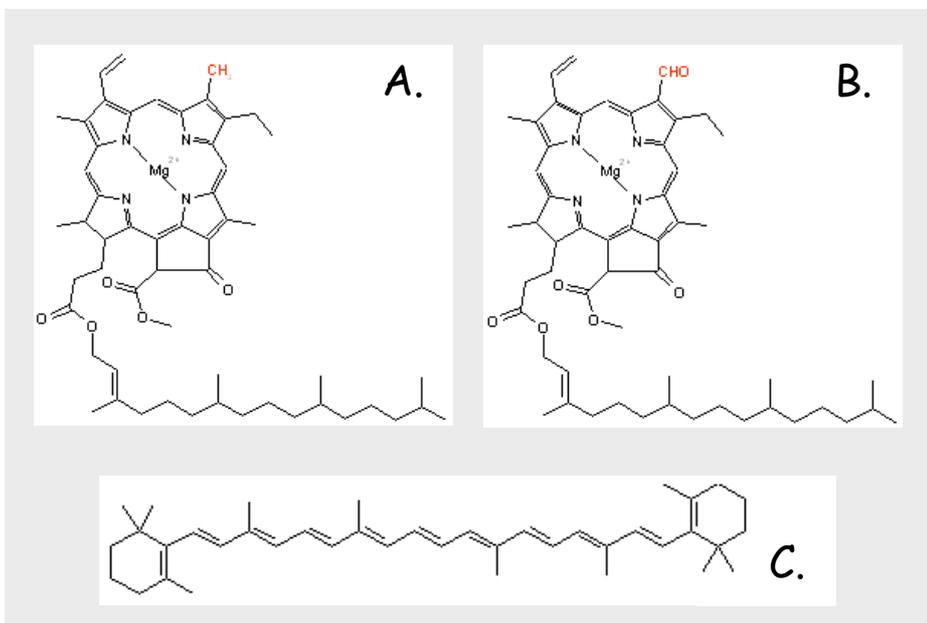
Les chloroplastes assurent la photosynthèse et permettent ainsi l'autotrophie des végétaux au carbone. Ces organites ont une origine endosymbiotique : ils sont issus de l'endosymbiose d'une cyanobactérie chez un eucaryote doté d'une mitochondrie (Dyall et al., 2004). Chaque chloroplaste provient d'un chloroplaste préexistant, les divisions se réalisant pendant l'interphase, indépendamment de la mitose.

La forme des chloroplastes peut varier dans les différentes cellules d'une même espèce, mais elle est relativement constante dans les cellules d'un même tissu. Dans les cellules de plantes supérieures, chaque cellule contient un grand nombre de chloroplastes sphéroïdes, ovoïdes ou discoïdes.

Leur nombre est relativement constant dans les différentes plantes : de 20 à 40 dans les plantes supérieures, *Chlamydomonas* ne possède qu'un seul chloroplaste. Parfois distribués de façon homogène dans le cytoplasme, ils sont le plus souvent entassés près du noyau et de la paroi cellulaire.

Facilement observables en microscopie photonique, les chloroplastes ont généralement entre 4 et 10 micro-mètres de long. Ils sont limités par une double enveloppe, qui contrôle les échanges avec le milieu cellulaire et le cytosol. Le compartiment ainsi délimité contient une phase liquide, le stroma, dans laquelle baigne un système complexe de membranes, limitant des sacs clos, les thylacoïdes (**Figure 4**).

Les deux enveloppes, externe et interne, se distinguent des autres membranes cellulaires par leur teneur élevée en galactolipides. Des différences de composition chimique existent entre les deux enveloppes, mais c'est principalement sur le plan fonctionnel qu'elles diffèrent.



**Figure 5:** Formules de trois pigments impliqués dans la photosynthèse: chlorophylle a (A), chlorophylle b (B) et  $\beta$ -carotène(C).

En effet, la **membrane externe** (ME) est totalement perméable aux molécules de faible masse moléculaire (<10 Kda) du fait de la présence de porines analogues aux porines localisées à la surface des membranes mitochondriales externes (Duy et al., 2007). Comme pour la membrane externe des mitochondries, on retrouve sur l'enveloppe externe une partie du complexe d'importation des protéines (complexe TOC pour « Translocase of the Outer envelope of Chloroplasts », cf. III.2.2) (Oreb et al., 2008).

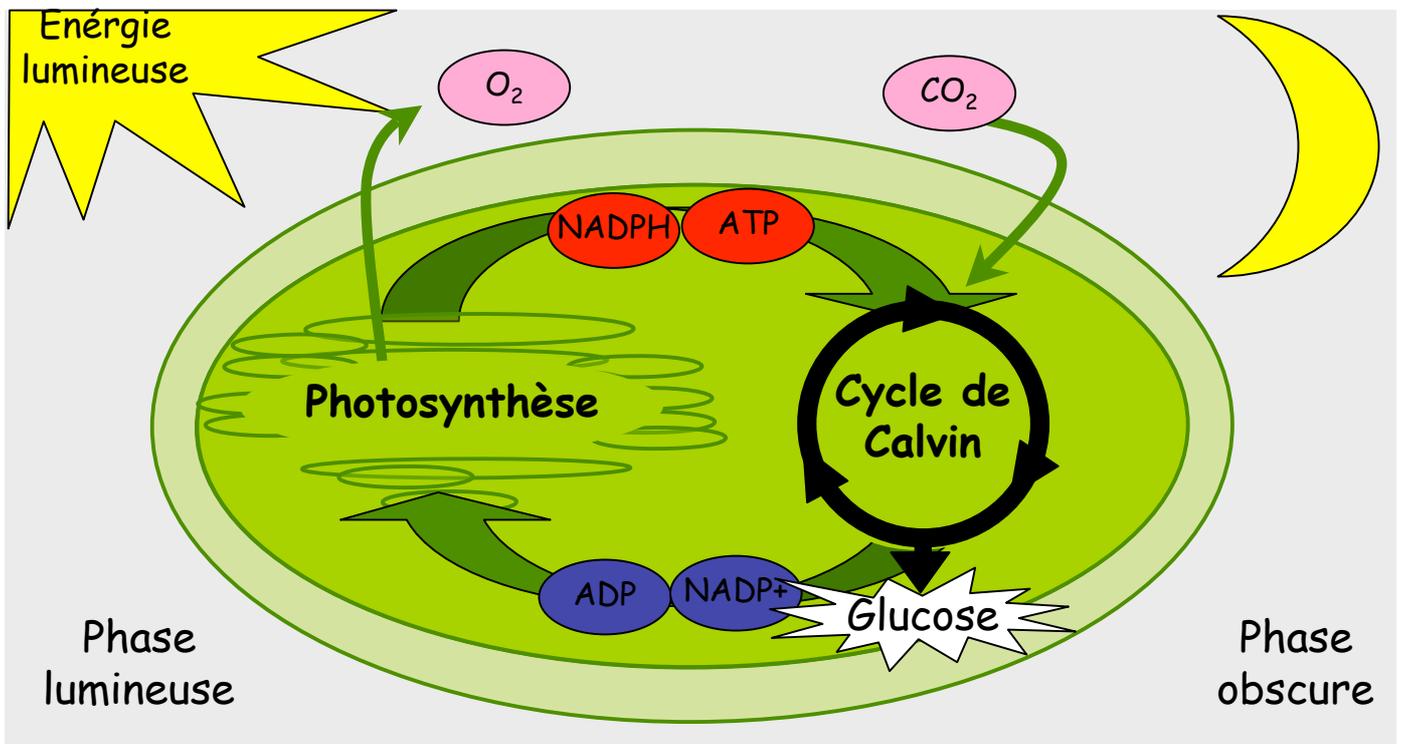
La **membrane interne** (MI) est à l'inverse très sélective et pratiquement imperméable aux solutés hydrophiles. Elle régule les échanges entre cytoplasme et stroma par l'intermédiaire de nombreux transporteurs comme le complexe TIC pour « Translocase of the Inner envelope of Chloroplasts », cf. III.2.2 (Oreb et al., 2008)) impliqués dans l'importation des protéines.

A l'intérieur du compartiment formé par ces deux enveloppes se trouve le **stroma**. C'est un milieu réactionnel extrêmement complexe où l'on retrouve de très nombreuses enzymes impliquées dans les différentes voies métaboliques, en particulier la Rubisco (ribulose-1,5-bisphosphate-carboxylase/oxygénase), qui peut représenter jusqu'à 40 à 50% des protéines solubles et qui ainsi, du fait de l'abondance des végétaux, est vraisemblablement l'une des plus abondante protéine de la biosphère. On retrouve également dans le stroma toutes les classes d'acides nucléiques et les différentes enzymes impliquées dans la synthèse protéique.

Mais l'élément le plus marquant visible dans le stroma est un système membranaire interne limitant des sacs clos, les **thylacoïdes**. Ils se répartissent en deux catégories : les thylacoïdes granulaires, discoïdes empilés comme des pièces de monnaies formant les grana et les thylacoïdes intergranaires ou stromatiques, beaucoup plus longs qui circulent dans le stroma sous forme de nappes très étendues reliant les différents grana. La lumière de chaque thylacoïde est connectée à celle des autres définissant ainsi un troisième compartiment interne appelé **lumen des thylacoïdes** séparé par la membrane des thylacoïdes du stroma qui l'entoure.

La membrane des thylacoïdes se caractérise par le fait qu'elle est constituée pour environ 10% de pigments photorécepteurs, répartis en deux catégories (**Figure 5**) :

- D'une part les chlorophylles, tetrapyrroles constitués par un atome central de magnésium. On retrouve chez les végétaux supérieurs deux chlorophylles, la chlorophylle *a* (pic d'absorption maximal à 663 et 430 nm) et la chlorophylle *b* (pic d'absorption maximal à 645 et 445 nm). Les deux molécules ne se distinguent que par un groupement chimique : le



**Figure 6:** Représentation schématique de la photosynthèse avec ses deux phases.

Produit/gène	Nombre de gènes		
	A.t	N.t	M.p
<b>photosynthèse</b>			
Transporteur d'e <sup>-</sup> du complexe photosynthétique / <i>pet</i>	4	4	5
Sous-unités du photosystème I/ <i>psa</i>	5	5	0
Sous-unités du photosystème II/ <i>psb</i>	14	14	1
ATP synthase/ <i>atp</i>	6	6	1
NADH deshydrogénase/ <i>ndh</i>	11	11	11
Ribulose-1-5 bisphosphate carboxylase/oxygénase / <i>rbc</i>	1	1	1
<b>Transcription</b>			
ARN polymérase/ <i>rpo</i>	4	4	4
<b>Traduction</b>			
Protéines ribosomales/ <i>rps-rpl</i>	21	21	20
ARNr/ <i>rrn</i>	8	8	8
ARNt/ <i>trn</i>	37	37	36
<b>Autres</b>			
Hypothetical chloroplast open reading frame/ <i>ycf</i>	9	9	1
Acetyl CoA Carboxylase/ <i>acc</i>	1	1	0
Maturase/ <i>mat</i>	1	1	0

**Table 3:** Composition des génomes chloroplastiques. Comparaison de l'information génétique présente dans les génomes chloroplastiques de divers organismes (d'après Sato *et al.*, 1999) Avec, A.t: *Arabidopsis thaliana*; M.p: *Marcantia polymorpha*; N.t: *Nicotiana tabacum*.

groupement  $\text{CH}_3$  de la chlorophylle *a* est remplacé par un groupement CHO dans la chlorophylle *b*.

- D'autre part les caroténoïdes (carotènes et xanthophylles) dont le pic d'absorption maximal se situe à 450 nm.

Ces pigments font partie des photosystèmes I et II, photosystèmes qui vont permettre d'utiliser l'énergie lumineuse pour produire de l'ATP et du NADPH. Cette étape constitue la phase lumineuse de la photosynthèse. Puis ATP et NADPH sont utilisés comme source d'énergie et d'électrons dans les réactions de la phase obscure qui permet la synthèse par le cycle de Calvin de glucose à partir de  $\text{CO}_2$  (**Figure 6**).

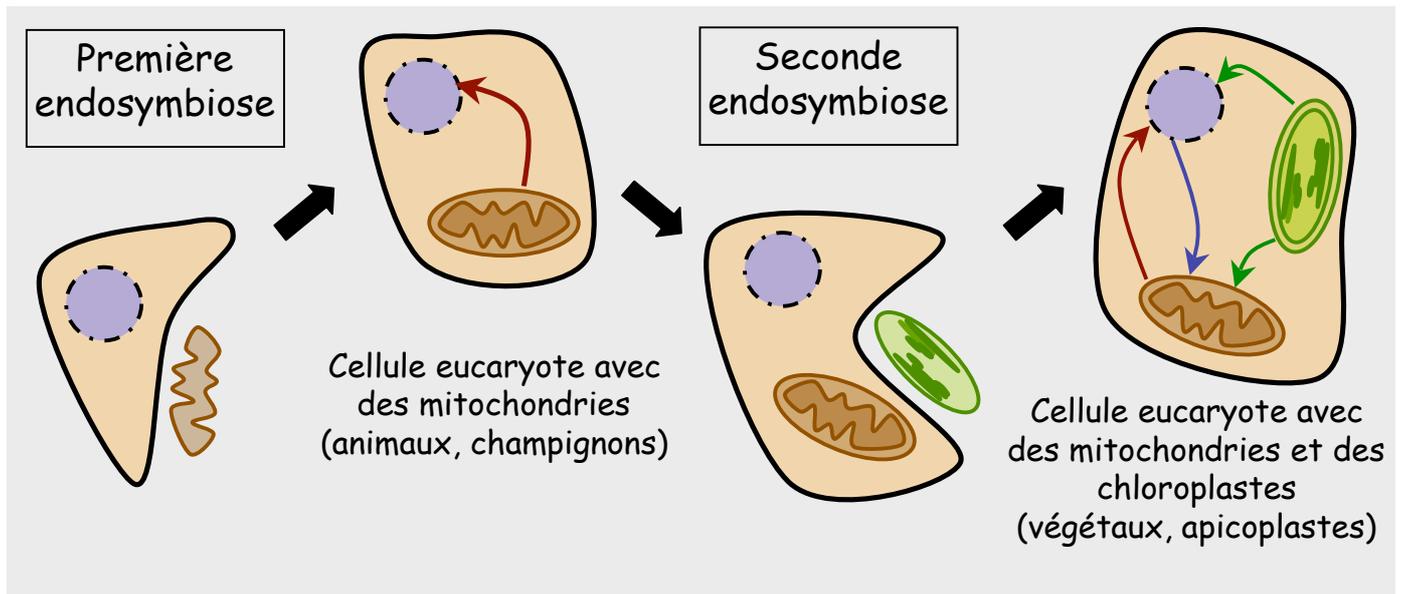
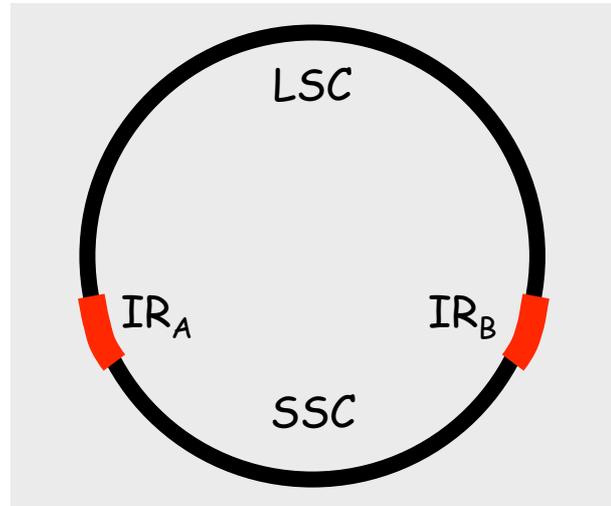
En plus de la photosynthèse, les chloroplastes interviennent dans d'autres voies de synthèse : synthèse de l'**amidon** à partir du phospho-glycéraldéhyde, synthèse des **acides aminés** à partir des nitrates réduits en ammonium, ou encore synthèse des **acides aminés soufrés** à partir des ions sulfates.

## B-GENOMES DES CHLOROPLASTES

### 1.Contenu des génomes

Les chloroplastes sont apparus après les mitochondries. Ils sont le fruit d'une seconde endosymbiose, survenue il y a un milliard d'années environ, entre un eucaryote doté d'une mitochondrie et une cyanobactérie (Dyall et al., 2004). Comme pour les  $\alpha$ -protéobactéries, l'intégration du symbiote s'est accompagnée d'une réduction massive du génome. Les génomes chloroplastiques ne contiennent aujourd'hui qu'un nombre limité de gènes. Ainsi, ceux qui sont encore présents (**Table 3**), codent essentiellement pour des protéines intervenant dans la photosynthèse et pour des composés intervenant dans le décryptage de l'information génétique (machineries transcriptionnelle et traductionnelle). On note que de façon générale les génomes chloroplastiques des plantes supérieures photosynthétiques codent pour une trentaine d'ARNt différents. Ainsi, contrairement aux mitochondries, l'importation d'ARNt cytosoliques ne semble pas être nécessaire au fonctionnement de l'appareil de traduction chloroplastique. A l'inverse, pour la majorité des autres composants assurant le fonctionnement des chloroplastes, les quelques composés encore codés par le génome chloroplastique ne suffisent pas à assurer une autonomie vis à vis du noyau. Ainsi, comme les

**Figure 7:** Structure schématique des génomes chloroplastiques  
 Les régions répétées inversées (IR<sub>A</sub> et IR<sub>B</sub> pour « Inverted Repeat ») sont séparées par une petite (SSC pour « Small Single-Copy ») et une grande région en copie unique (LSC pour « Large Single-Copy »)  
 (D'après Lopez-Juez et al., 2005)



**Figure 8:** Transfert intracellulaire de gènes au cours de l'évolution dans les cellules végétales (d'après Bock *et al.*, 2008).

Les flèches de couleur indiquent le sens du transfert de gènes, les couleurs correspondent au compartiment d'où est originaire le matériel transféré (rouge: mitochondries, bleu: noyau, vert: chloroplastes)

Avec:  Noyau,  α-protéobactéries,  Mitochondries,  Cyanobactéries,  Chloroplastes.

mitochondries, les chloroplastes dépendent des protéines codées par le génome nucléaire et importées depuis le cytosol.

## 2. Organisation du génome chloroplastique

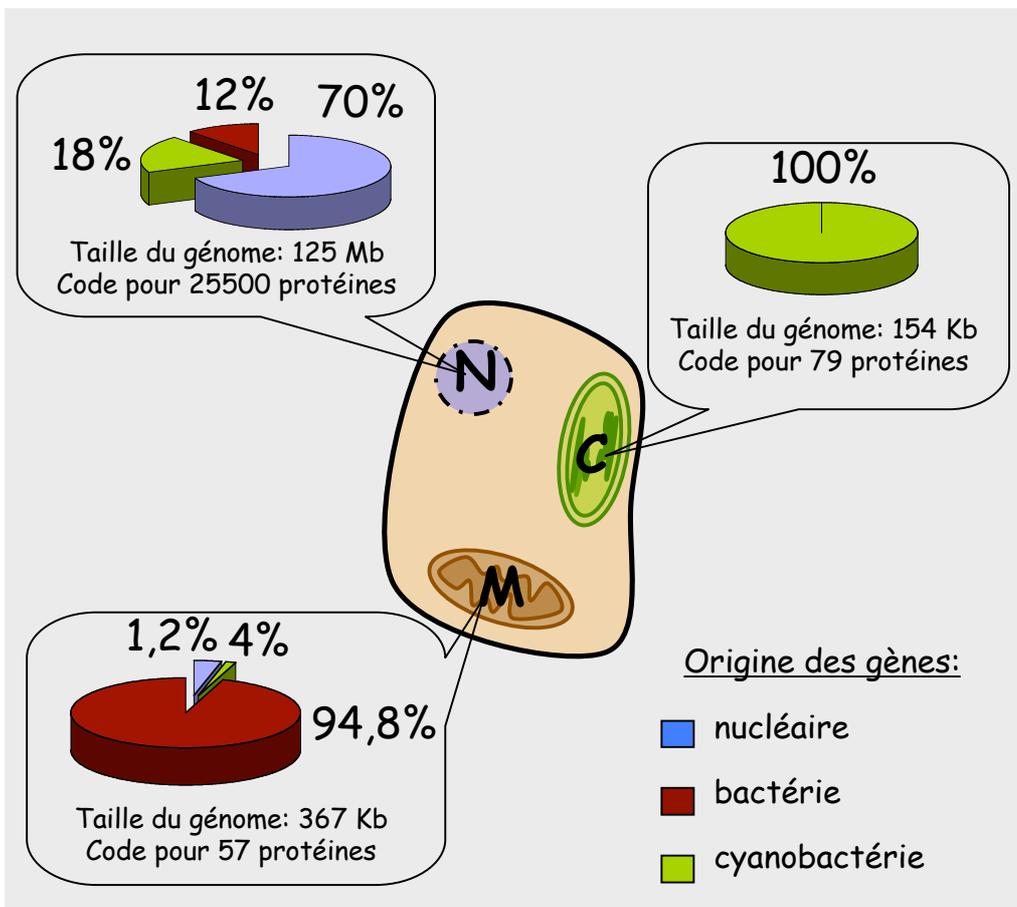
Les génomes chloroplastiques de *Marchantia polymorpha* et *Nicotiana tabacum* furent les premiers séquencés en 1986. Treize ans plus tard, on disposait de la séquence complète du génome chloroplastique de l'organisme modèle *A. thaliana* (Sato et al., 1999). Le génome du cèdre du Japon, *Cryptomeria japonica* est le dernier à s'ajouter à la liste (Hirao et al., 2008).

L'ensemble de ces données permettent de définir différents caractères : la taille des génomes chloroplastiques des plantes supérieures est comprise entre 120 et 160 kpb pour environ 135 gènes. Le génome plastidial est en général circulaire (**Figure 7**). Il contient deux larges régions répétées inversées (IR) dont la longueur très variable explique en grande partie les variations de taille observées au sein des génomes chloroplastiques. Enfin, ces deux régions sont séparées par deux régions de taille différente : une large et une petite région (respectivement « Long Single Copy » et « Short Single Copy ») (Lopez-Juez and Pyke, 2005).

## 3. ECHANGES ENTRE GENOMES NUCLEAIRE, MITOCHONDRIAL ET CHLOROPLASTIQUE

Comme décrits précédemment, deux phénomènes d'endosymbiose ont conduit au sein des cellules végétales à l'apparition des mitochondries et des chloroplastes. Ces deux événements ont été suivis d'un large transfert de l'information génétique du génome de l'endosymbiote vers le génome nucléaire de la cellule hôte (**Figures 8 et 9**), (Bock and Timmis, 2008).

Parallèlement, en plus du transfert de gènes mitochondriaux vers le génome nucléaire, des séquences d'acides nucléiques nucléaires et chloroplastiques envahissent le génome mitochondrial. C'est par ce mécanisme que des séquences d'origine chloroplastique donnent naissance dans les mitochondries à des gènes fonctionnels d'ARNt. Par contre, aucun exemple de produit fonctionnel issu d'une séquence d'origine nucléaire n'a encore été identifié (Leister, 2005).



**Figure 9:** Représentation schématique, pour *Arabidopsis thaliana* de la composition des différents génomes nucléaire (N), mitochondrial (M) ou chloroplastique (C), en fonction de l'origine des gènes qui les composent (d'après Unseld *et al.*, 1997, Sato *et al.*, 1999 et AGI, 2000)

Le génome chloroplastique semble lui être relativement imperméable à l'invasion des séquences d'ADN, puisque aucun cas de transfert de gènes depuis le génome mitochondrial ou nucléaire, n'a été mis en évidence (Bock and Timmis, 2008).

## A-TRANSFERT ET PERTE DE GENES

Quelque soit le génome, mitochondrial ou chloroplastique, on peut diviser les gènes en trois classes : les gènes qui codent pour des ARNr, pour des ARNt ou pour des protéines.

### 1. Gènes codant pour les ARNr

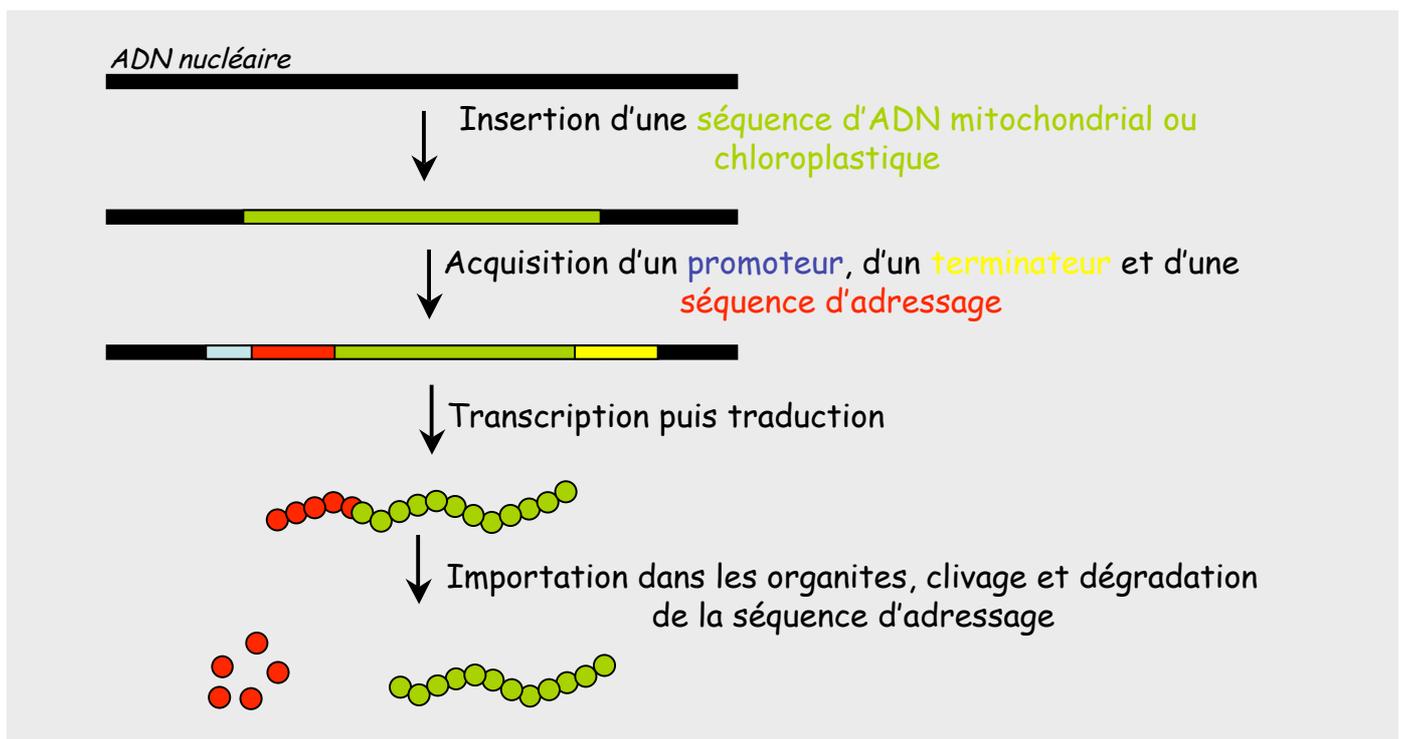
L'ensemble des gènes codant pour les ARNr nécessaires à la traduction est présent dans les génomes mitochondriaux et chloroplastiques. On note cependant l'absence dans les mitochondries humaines du gène codant pour l'ARN ribosomique 5S. Celui-ci est donc importé de façon massive depuis le cytosol (Entelis et al., 2001a). Son rôle reste pour l'instant indéfini puisqu'il n'a pas été détecté dans les préparations de ribosomes mitochondriaux (Smirnov et al., 2008).

### 2. Gènes codant pour les ARNt

De façon générale, les génomes chloroplastiques des plantes supérieures codent pour une trentaine d'espèces d'ARNt qui permettent le décodage de tous les codons. Dans les mitochondries végétales, la situation est différente et l'on trouve trois populations d'ARNt distinctes.

Chez *Arabidopsis thaliana*, le génome mitochondrial code pour 22 ARNt. Or, parmi ces ARNt, certains sont d'origine mitochondriale et d'autres, comme l'ARNt<sup>Asn</sup> ou ARNt<sup>His</sup>, sont d'origine chloroplastique : ce sont les seules séquences d'ADN chloroplastique intégrées au sein du génome mitochondrial qui sont aujourd'hui fonctionnelles.

De plus, ces 22 gènes ne sont pas suffisants pour décoder l'ensemble de l'information génétique contenue au sein du génome. Les ARNt codés par le génome nucléaire correspondant à 6 acides aminés sont donc importés dans les mitochondries depuis le cytosol (Unseld et al., 1997), (Duchêne and Maréchal-Drouard, 2001).



**Figure 10:** Représentation schématique des changements nécessaires suite à l'acquisition par le génome nucléaire d'une séquence d'ADN codant pour une protéine mitochondriale ou chloroplastique. (d'après Bock *et al.*, 2008).

### 3. Gènes codant pour les protéines

Une fois transférés au sein du génome nucléaire, les gènes codant pour des protéines nécessaires au fonctionnement des organites doivent subir un certain nombre de transformations (**Figure 10**). En effet, ces séquences d'ADN de type procaryotique doivent acquérir des signaux de type eucaryotique tels qu'un promoteur, un terminateur, un signal de polyadénylation. Elles doivent également acquérir une séquence codant pour une séquence d'adressage, permettant aux protéines de rejoindre les organites auxquelles elles sont destinées (Bock and Timmis, 2008).

Une minorité de protéines reste cependant codée par le génome des organites. Mais la traduction ne se fait pas tout à fait de la même façon dans les deux compartiments :

Le génome des mitochondries végétales code pour seulement trois ARN ribosomiques (5S, 18S et 26S), quelques protéines ribosomales et un jeu incomplet d'ARNt (cf. **Table 2**). Ainsi, la plupart des constituants de la machinerie traductionnelle, doivent être importés depuis le cytosol. Il en est de même pour les chloroplastes, à quelques exceptions près : le génome chloroplastique contient quatre gènes codant pour les ARNr (16S, 23S, 4,5S et 5S), et il possède un jeu complet d'ARNt.

L'appareil de traduction des protéines dans les organites présente de fortes analogies avec le système bactérien. Les mécanismes responsables de l'initiation de la traduction ne sont pas encore clairement définis dans les mitochondries. On note l'absence de coiffe et de séquence de Shine-Dalgarno à l'extrémité 5' des messagers. A l'inverse, on trouve, en plus du triplet AUG, des codons d'initiation alternatifs, tels que GGG, AAU ou GUG (Unsel et al., 1997). Dans les chloroplastes on retrouve dans la majorité des séquences 5'UTR (« UnTranslated Region ») des messagers des séquences de type Shine/Dalgarno, qui permettent l'initiation de la traduction (Marin-Navarro et al., 2007).

Enfin dans les mitochondries et dans les chloroplastes un nouveau type de facteurs a été identifié : les protéines PPR (« Pentatricopeptide Repeat Protein »). Agissant en trans, ces protéines pourraient intervenir dans la régulation de la traduction.

### B- POURQUOI LES ORGANITES PERDENT LEUR GENOME ?

Trois raisons peuvent expliquer le fait que mitochondries et chloroplastes tolèrent la perte progressive de leur génome (Adams and Palmer, 2003).



La première est que les gènes perdus **ne sont plus nécessaires**. Cette perte massive pourrait avoir eu lieu peu de temps après l'endosymbiose : les gènes essentiels à la survie d'une bactérie autonome, comme les gènes impliqués dans la synthèse des parois bactériennes, ne le sont plus pour le symbiote.

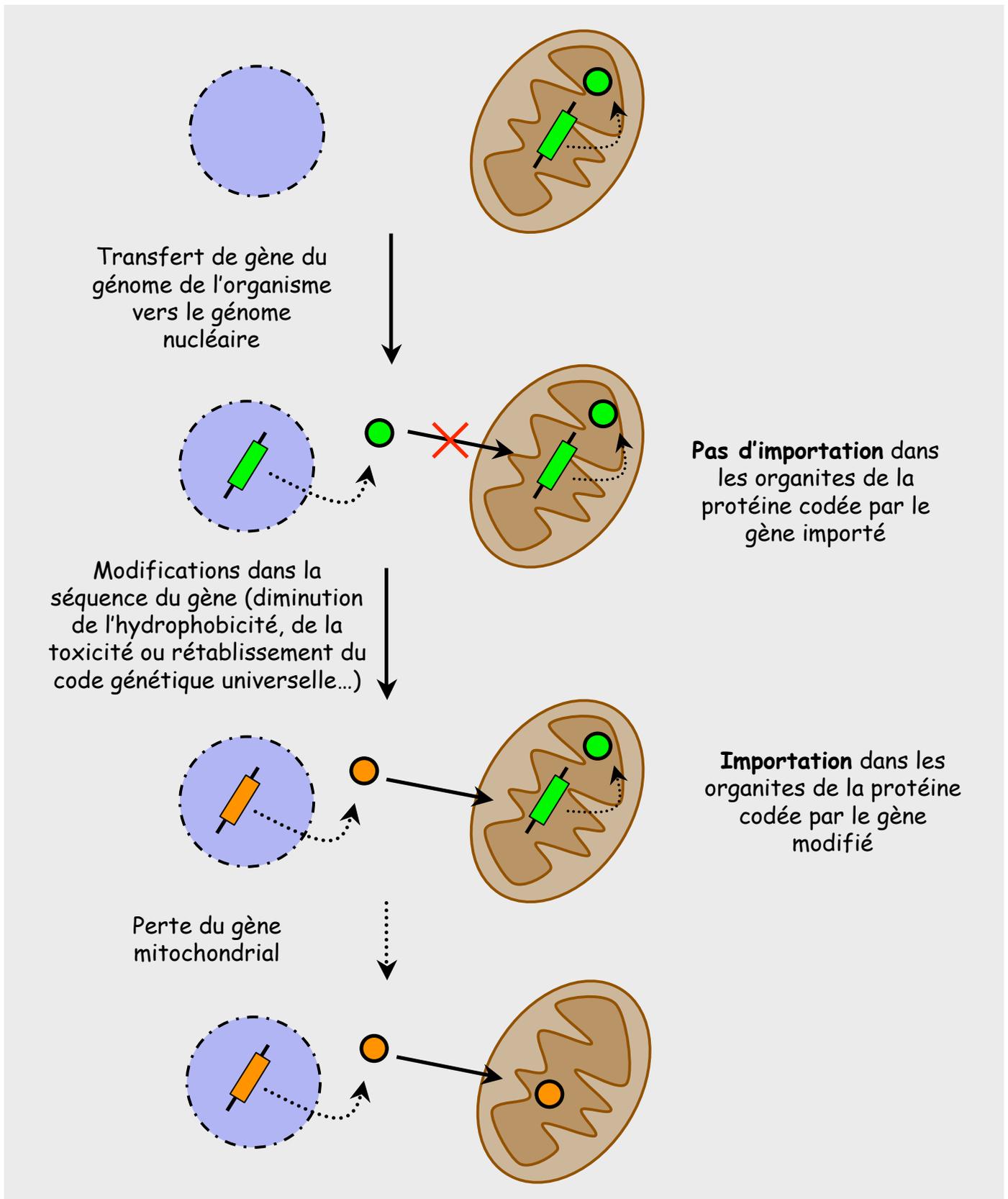
La deuxième explication est la **théorie de la substitution**. Dans ce cas, la fonction portée par le gène est nécessaire. Le gène perdu est donc remplacé par un gène déjà présent dans le génome nucléaire. Ainsi, l'analyse phylogénétique de nombreuses protéines mitochondriales, comme par exemple certaines enzymes impliquées dans le cycle de Krebs a montré que ces protéines étaient codées par le génome nucléaire.

Enfin, la dernière raison qui justifie la fuite du génome mitochondrial et chloroplastique est le fait que les gènes ne soient pas perdus mais **transférés vers le noyau**. C'est la seule voie possible pour un certain nombre de gènes comme ceux impliqués dans le transfert d'électrons ou les oxydations phosphorylantes, pour lesquels le noyau manque d'équivalent fonctionnel. C'est également le cas pour les aminoacyl-ARNt synthétases (Brindefalk et al., 2007).

## **C-POURQUOI LES ORGANITES CONTIENNENT ENCORE UN GENOME ?**

Aujourd'hui, la majorité des protéines nécessaires au fonctionnement des organites est codée par le génome nucléaire. Des protéines, des ARNt des ARNr restent cependant codés par les génomes mitochondriaux et chloroplastiques. Quatre hypothèses proposent des facteurs limitants à ce transfert de gènes (Adams and Palmer, 2003), (Bock and Timmis, 2008).

D'après l'hypothèse de Claros (Claros et al., 1995), la nature et les **propriétés d'hydrophobicité** des protéines codées interviennent dans le choix des gènes à transférer. Ainsi, les protéines très hydrophobes doivent être codées par le génome des organites en raison des trop fortes contraintes lors de l'importation et de la translocation au travers des membranes. Une diminution de l'hydrophobicité de ces protéines est nécessaire pour permettre leur importation à partir du génome nucléaire, comme observé dans les graines de soja : l'analyse des séquences mitochondriale et nucléaire du gène codant pour la protéine *cox2* montre que des mutations affectant l'hydrophobicité de la première région



**Figure 11:** Représentation schématique « hypothétique » des changements nécessaires entre le transfert d'un gène mitochondrial et le retour de la protéine codée par le génome nucléaire

transmembranaire permettent l'importation dans les mitochondries de la protéine codée par le gène nucléaire (Daley et al., 2002).

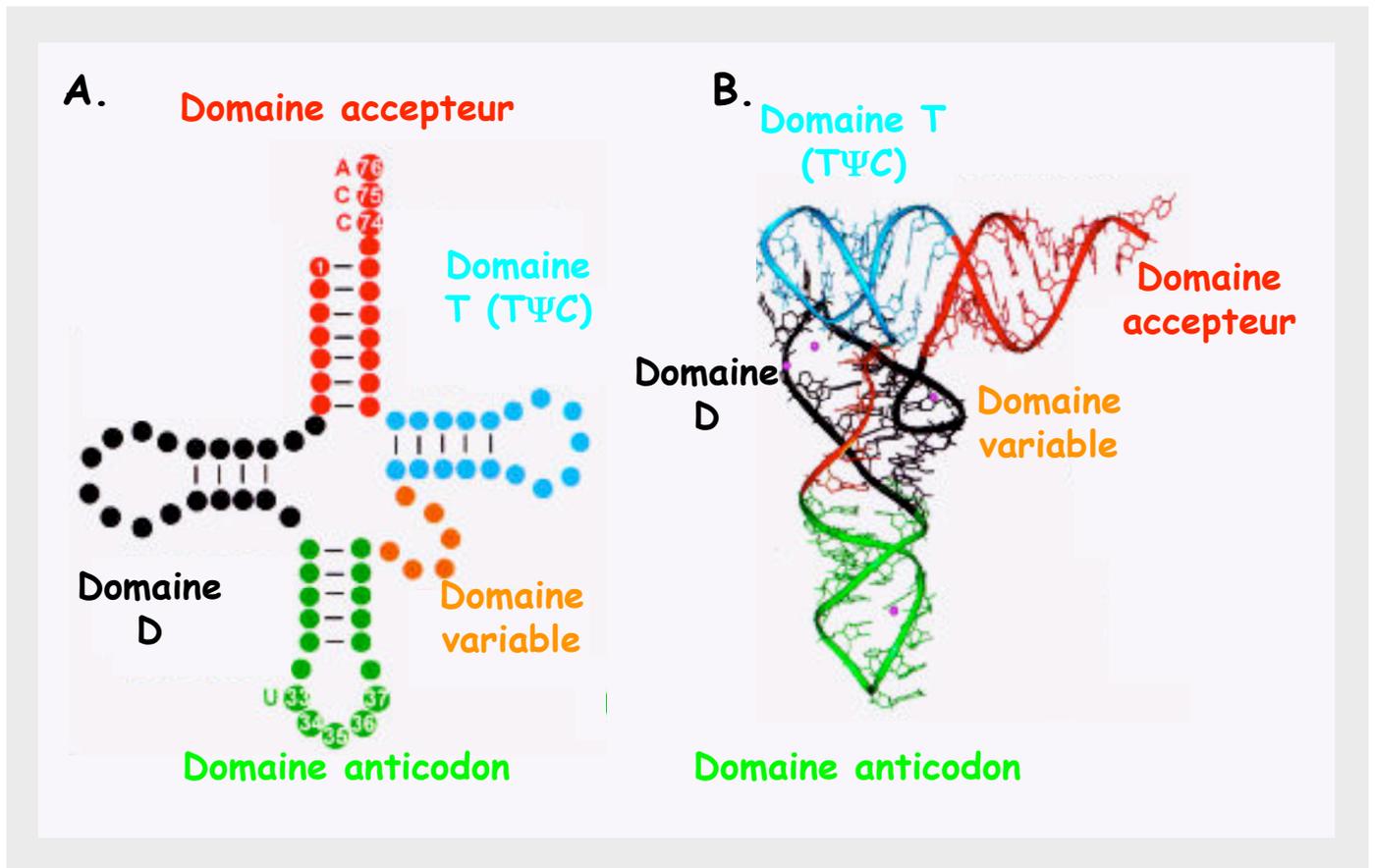
Une seconde hypothèse est **l'hypothèse CORR** (« CO-location for Redox Regulation »). Elle repose sur le fait que les gènes codant pour des protéines impliquées dans les réactions d'oxydo-réduction, comme par exemple la sous-unité Fo de l'ATP synthase mitochondriale et chloroplastique, sont retenues dans les organites pour permettre une régulation rapide et directe de leur expression en fonction de l'état d'oxydation des organites (Allen, 2003).

D'après Martin et Schnarrenberger (Martin and Schnarrenberger, 1997) le fait que le **produit de certains gènes soit toxique** une fois présent dans le cytosol, comme par exemple l'enzyme Rubisco, qui intervient dans les chloroplastes dans le cycle de Calvin, explique la rétention de certains gènes dans les organites.

Enfin, la dernière explication n'est applicable qu'aux mitochondries « non végétales » Elle suggère qu'un certain nombre de gènes ne pourrait pas être transféré du fait de la **différence que l'on observe entre le code génétique « universel » et le code génétique mitochondrial** (Boore, 1999). Dans ce cas, la relocalisation de certains gènes dans le noyau nécessite des mutations dans l'ADN pour rétablir la séquence codante correspondant au code génétique universel (de Grey, 2005).



**Chapitre II**  
**Les molécules impliquées  
dans la traduction des  
protéines**



**Figure 12:** Exemple de structures secondaire (A) et tertiaire (B) d'un ARNt.  
(D'après Agris *et al.*, 2004.)

## 1.GENERALITES

Dans les plantes, la synthèse protéique se déroule dans trois compartiments : le cytosol, les mitochondries et les chloroplastes. L'expression des quelques gènes codant pour des protéines encore présentes dans les génomes mitochondriaux et chloroplastiques nécessite un appareil complet de traduction. Ainsi, les éléments de la machinerie traductionnelle, ribosomes, facteurs de traduction, ARNt et aminoacyl-ARNt synthétase (aaRS) doivent être présents dans les deux organites.

Cependant, au cours de l'évolution, les gènes impliqués dans la traduction ont été, comme les autres gènes, perdus ou transférés vers le noyau.

Dans ce chapitre nous nous intéresserons tout particulièrement à deux facteurs impliqués dans la traduction : ARN de transfert et aminoacyl-ARNt synthétase (aaRS).

## 2.LES ARN DE TRANSFERT (ARNt)

Les ARNt sont des petites molécules d'ARN monocaténaire, de 75 à 95 nucléotides, chargés négativement. Ils sont à l'interface entre l'information génétique portée par l'ADN, et son expression en protéine. Leur rôle central dans la synthèse protéique a été postulé par Watson et Crick trois ans avant même leur découverte par l'équipe de Hoagland (Hoagland et al., 1958). Depuis, de nombreux travaux ont été menés afin de les caractériser, et environ 7600 séquences de gènes d'ARNt provenant de 131 organismes différents ont déjà été recensés (<http://www.old.uni-bayreuth.de/departments/biochimie/sprinzl/trna>).

### A-STRUCTURE DES ARNt

L'alignement de ces différentes séquences a permis de mettre en évidence le fait que ce sont des molécules qui dans la majorité des espèces sont relativement bien conservées, du point de vue de leur taille mais également de leur structure : la plupart des ARNt ont une structure canonique conservée chez toutes les espèces (**Figure 12A**). Ils se replient sur eux-mêmes par des appariements intramoléculaires pour former une structure à quatre tiges ou bras, appelée « feuille de trèfle ». On distingue ainsi généralement **cinq domaines au sein des ARNt** :



- Le domaine accepteur qui comporte la base discriminatrice en position 73 et l'extrémité terminale 3' CCA, site de fixation de l'acide aminé.
- Le domaine D appelé ainsi car il possède une base modifiée : la Dihydro-uracile (D).
- Le domaine T qui possède la séquence conservée TΨC pour ribo-thymidine (T), pseudo-uridine (Ψ) et cytidine (C).
- La tige inférieure terminée par une boucle qui contient en position 34, 35 et 36 l'anticodon s'appelle le domaine anticodon.
- Le dernier domaine est la région variable. Il permet de distinguer deux classes d'ARNt en fonction de la taille de cette région : 4 à 5 nucléotides pour les ARNt de classe I, et 10 à 24 nucléotides pour les ARNt de classe II (Rich and RajBhandary, 1976).

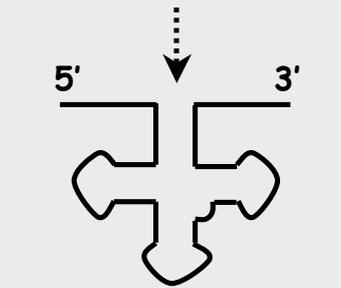
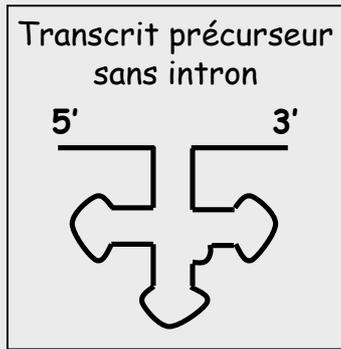
Enfin, ces quatre tiges se replient pour former une **structure tridimensionnelle** en forme de « L » (**Figure 12B**). On note que celle-ci se superpose parfaitement avec la structure tridimensionnelle de la protéine RRF (« Ribosome Recycling Factor ») qui provoque la dissociation du ribosome après la terminaison de la traduction (Barat et al., 2007). La structure en L des ARNt résulte d'un jeu d'interactions entre les nucléotides conservés des boucles D et T. Cette structure est stabilisée par des interactions faisant intervenir des nucléotides modifiés que l'on retrouve conservés pour la plupart des ARNt. On observe ainsi une séparation maximale entre les deux sites essentiels de la molécule, anticodon et site de liaison de l'acide aminé.

## B-DU GENE A L'ARNt

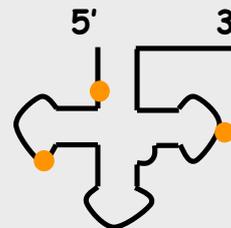
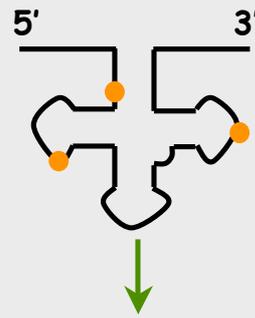
Chez les plantes comme chez les autres eucaryotes, les gènes codant pour les ARNt cytosoliques sont présents dans le génome sous forme de familles multigéniques, dispersées au hasard dans le génome ou regroupées sous forme de « cluster ». L'initiation de la transcription se fait par l'interaction entre les facteurs de transcription TFIIB et TFIIC et deux régions internes appelées boîtes A et B (ou 5'ICR et 3'ICR pour « Internal Control Region »). Enfin, les signaux à l'origine de la terminaison de la transcription sont pour l'heure actuelle inconnus.

Dans les organelles, les gènes codant pour les ARNt sont présents sous plusieurs configurations : isolée ou regroupée sous forme de « cluster » comme les gènes d'ARNt cytosoliques, ou sous forme d'opérons mixtes, associés aux gènes codant pour les protéines et

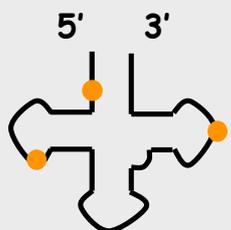
Epissage des introns



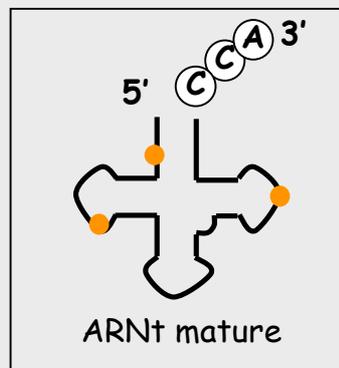
Modification des nucléotides



Clivage de l'extrémité 3'



Addition du CCA



Maturation de l'extrémité 5'

Maturation de l'extrémité 3'

**Figure 13:** Exemple de maturation que peuvent subir les ARNt cytosoliques avant d'être fonctionnels. (D'après Kunzmann *et al.*, 1998).

les ARN ribosomiaux. La transcription dans les deux compartiments se fait par une ARN polymérase de type phagique codée par le génome nucléaire (Azevedo et al., 2008).

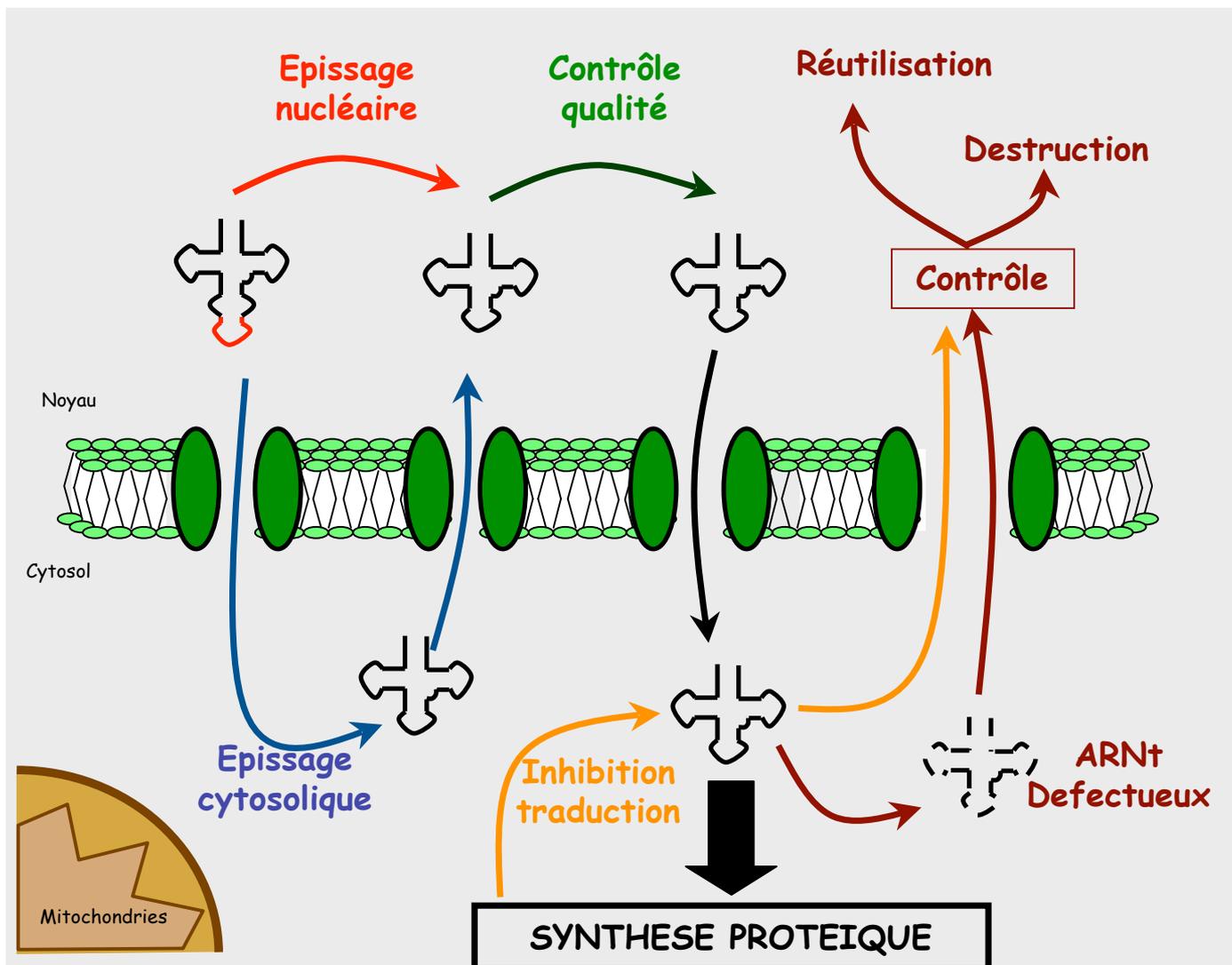
Les gènes codant pour les ARNt sont transcrits sous forme de précurseurs, comportant des extensions 5' et 3' et dans certains cas des introns (comme par exemple chez les bryophytes, l'ARNt<sup>Leu</sup> chloroplastique (Quandt and Stech, 2005)) ; pour être fonctionnels ces précurseurs doivent ensuite subir un certain nombre de modifications (Hopper and Phizicky, 2003). Ces modifications requièrent la participation de nombreuses protéines (codées par plus de 1% du génome de *S.cerevisiae*). On peut les résumer en cinq étapes majeures (**Figure 13**) :

La maturation de l'extrémité 5' est commune à tous les ARNt (à l'exception de l'archaebactérie *N. equitans* (Randau et al., 2008)). Cette étape fait intervenir une ribonucléoprotéine, la RNase P.

Le processus de maturation de l'extrémité 3' est lui plus complexe : il implique l'action combinée d'exo et d'endonucléases. Son mécanisme varie d'un organisme à l'autre. Chez les plantes, la RNase Z permet l'obtention d'une extrémité 3' (Kruszka et al., 2003) qui sera reconnue par l'ARNt terminal-nucléotidyl transférase capable d'ajouter le triplet CCA (Martin and Keller, 2007).

Deux étapes sont nécessaires pour assurer l'épissage des introns. La première implique une endonucléase. Initialement découverte dans la levure, de nombreux orthologues ont rapidement été identifiés dans les différents organismes modèles. A l'inverse, la deuxième étape est très peu conservée. C'est une étape de ligation qui fait intervenir deux enzymes : une ligase et une 2' phosphotransférase (Calvin and Li, 2008).

Enfin, pour assurer la spécificité, la fidélité et l'efficacité de leur fonctionnement, les ARNt doivent subir des modifications post-transcriptionnelles : un nombre important de nucléotides modifiés (inosine (I), pseudouridine ( $\Psi$ ), dihydrouridine (D)...) a été identifié dans les ARNt. Ils ont tous dérivés des 4 nucléotides normaux, adenosine (A), guanosine (G), cytidine (C) et uridine (U) (Rozenski et al., 1999). Les bases des ARNt mitochondriaux et chloroplastiques peuvent également être modifiées suite à une étape d'édition (Fey et al., 2002).



**Figure 14:** Différents types de transport d'ARNt observés à travers les pores de la membrane nucléaire, entre le noyau et le cytosol.

## C-ELEMENTS D'IDENTITE DES ARNt

Les éléments d'identité sont les signaux moléculaires essentiels qui interviennent à deux niveaux : d'une part, ils permettent à un ARNt donné d'être reconnu spécifiquement par son aminoacyl-ARNt synthétase (on parlera de déterminant) et d'autre part ils préviennent la reconnaissance de cet ARNt par une autre aminoacyl-ARNt synthétase (anti-déterminant).

On considère comme majeurs les éléments pour lesquels une mutation entraîne une forte variation de la liaison entre ARNt et aaRS à la fois *in vitro* et *in vivo*, alors que les mutations ne produisant que des effets modérés ont lieu sur les éléments d'identité mineurs.

On peut noter que les déterminants majeurs sont généralement situés aux extrémités distales de la structure en « L » de l'ARNt : boucle de l'anticodon (position 35), bras accepteur et nucléotide discriminant N73. Ils peuvent également correspondre à un nucléotide, une base modifiée, une structure particulière (Giege et al., 1998)...

## D-EXPORTATION DES ARNt DU NOYAU VERS LE CYTOPLASME

Le transport des ARNt entre le noyau et le cytosol permet essentiellement d'assurer la participation des ARNt matures au sein de la synthèse protéique. Il fait intervenir, au niveau des pores nucléaires, les protéines de la voie RAN-GTP dépendantes, et les protéines de la famille des importines- $\beta$ . Enfin, avant d'être importés dans le cytosol pour rejoindre la machinerie traductionnelle, les ARNt seraient soumis à une étape de correction d'épreuve : la présence d'aaRS dans le noyau de *S. cerevisiae* permettrait de tester l'aminoacylation des ARNt (Lund and Dahlberg, 1998).

On observe des mouvements d'ARNt entre noyau et cytoplasme pour d'autres processus (**Figure 14**).

En plus des étapes de maturation ayant lieu dans le noyau (cf. II.2.B), les sous-unités de l'endonucléase assurant l'épissage des introns des pré-ARNt chez *S. cerevisiae* ont été localisées dans le cytosol à la surface des mitochondries (Yoshihisa et al., 2003). Les pré-ARNt sont donc tout d'abord dirigés vers le cytoplasme, où leurs introns sont éliminés, avant d'être redirigés par un transport rétrograde vers le noyau. Ce flux rétrograde d'ARNt permet également de récupérer des ARNt défectueux présents dans le cytosol, qui une fois de retour dans le noyau seront détruits ou réparés pour être re-injectés dans le système. Enfin, lorsque



**Figure 15:** Deux réactions catalysées par les aminoacyl-ARNt synthétases (aaRS) permettant l'aminacylation d'un acide aminé sur son ARNt homologue.

Caractéristiques	Classe I	Classe II
Organisation	monomérique	dimérique
Motifs conservés	HIGH KMSKS	Motifs 1 à 3
Sites actifs	Feuillets $\beta$ parallèles	Feuillets $\beta$ antiparallèles
Sous-classe	Ia (Cys, Leu, Ile, Met, Val)  Ib (Trp, Tyr)  Ic (Arg, Gln, Glu)	IIa (His, Pro, Ser, Thr)  IIb (Asp, Asn, Lys)  IIc (Ala, Gly, Phe)
Site d'aminacylation	2'OH	3'OH

**Table 4:** Principales caractéristiques des aaRS et répartition en sous-classes.  
(Adapté de Arnez JG et Moras D, 1997)

les conditions ne sont pas favorables à la synthèse protéique, celle-ci exerce un rétrocontrôle négatif en favorisant le retour des ARNt vers le noyau (Hopper and Shaheen, 2008).

### 3.LES AMINOACYL-ARNt SYNTHETASES (aaRS)

Les aminoacyl-ARNt synthétases (aaRS) sont des enzymes essentielles, qui assurent le lien entre le monde des ARN et le monde des protéines. Elles catalysent l'aminocyclation d'un acide aminé sur l'ARNt homologue par une réaction qui se déroule en deux étapes (**Figure 15**). La première étape est l'activation de l'acide aminé par une molécule d'ATP. La deuxième étape consiste en la liaison de cet acide aminé activé sur le ribose de l'adénosine 3'terminale de l'ARNt.

Ces enzymes sont réparties en deux classes (type I et II) en fonction de leur structure et de leurs propriétés fonctionnelles. A l'exception de la LysRS (de type II dans la majorité des bactéries et des eucaryotes, et de type I dans les archaebactéries et quelques bactéries) (Ibba et al., 1997), le type de synthétase associée à un acide aminé est identique quelque soit l'organisme (**Table 4**).

#### A-LES DEUX CLASSES D'aaRS

##### 1.Les aaRS de classe I

Les aaRS de classe I sont pour la plupart monomériques (**Table 4**). Elles possèdent deux motifs caractéristiques plus ou moins conservés dont le consensus est HIGH (His-Ile-Gly-His) et KMSKS (Lys-Met-Ser-Lys-Ser). Les résidus histidines de la séquence HIGH et les résidus lysines de la séquence KMSKS sont impliqués dans la reconnaissance de l'acide aminé et la fixation de l'ATP. Ces deux motifs très conservés s'associent au reste de la séquence pour former une structure similaire à celle du site de liaison des nucléotides triphosphate de certaines déshydrogénases, connues sous le nom de structure de Rossmann. Cette structure correspond à une série de 5 brins  $\beta$  parallèles reliés entre eux par des hélices  $\alpha$ . La liaison entre ARNt et aaRS se fait par le nucléotide porté en position 73 du bras accepteur et par la boucle anticodon de l'ARNt. De plus on note que toutes les aaRS de classe I attachent l'acide aminé sur le 2'OH du ribose de l'adénine 3'terminale de l'ARNt. Enfin, ces enzymes sont subdivisées en sous-classes, selon leur organisation modulaire et la nature du substrat : la première sous-classe Ia regroupe les acides aminés hydrophobes et soufrés



(cystéine, leucine, isoleucine, méthionine et valine), la sous-classe Ib est composée de deux acides aminés aromatiques (tryptophane et tyrosine) enfin, la sous-classe Ic comprend les acides aminés chargés (arginine glutamine et glutamate).

## 2. Les aaRS de classe II

Les enzymes de classe II sont essentiellement dimériques (**Table 4**). Trois séquences dégénérées sont présentes dans le domaine catalytique qui se replie en brins  $\beta$  antiparallèles reliés par des hélices  $\alpha$  (O'Donoghue and Luthey-Schulten, 2003) :

- le motif 1 constitué d'une trentaine d'acides aminés contenant une proline strictement conservée participe à la dimérisation de l'enzyme ;
- le motif 2 se situe une cinquantaine d'acides aminés en aval ;
- le motif 3 se situe 150 à 250 acides aminés encore plus en aval.

Ces deux derniers motifs ont pour caractéristiques de contenir des résidus arginine strictement conservés.

Les aaRS de classe II fixent et aminoacylent le ribose de l'adénine terminale en position 3' (à l'exception de la PheRS qui comme les aaRS de classe I aminoacyle le ribose de l'adénine en 2'OH)

Comme les aaRS de classe I, les aaRS de classe II sont regroupées en sous-classes selon des critères d'homologie de séquence : homologie dans leur partie N-terminale pour les membres de la classe IIa (histidine, proline, serine et thréonine), ou dans la partie C-terminale pour les membres de la classe IIb (Aspartate, Asparagine, lysine). Le dernier sous-groupe IIc est constitué de trois membres sans homologie de séquences (alanine, glycine, phénylalanine) avec une structure quaternaire différente : elles sont toutes trois tétramériques.

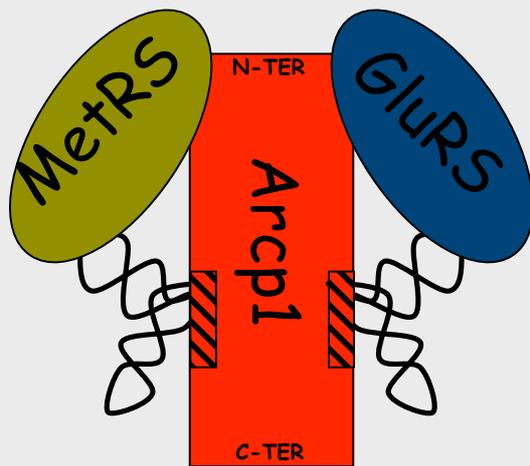
## B-ORGANISATION DES AARS

### 1. Structure modulaire

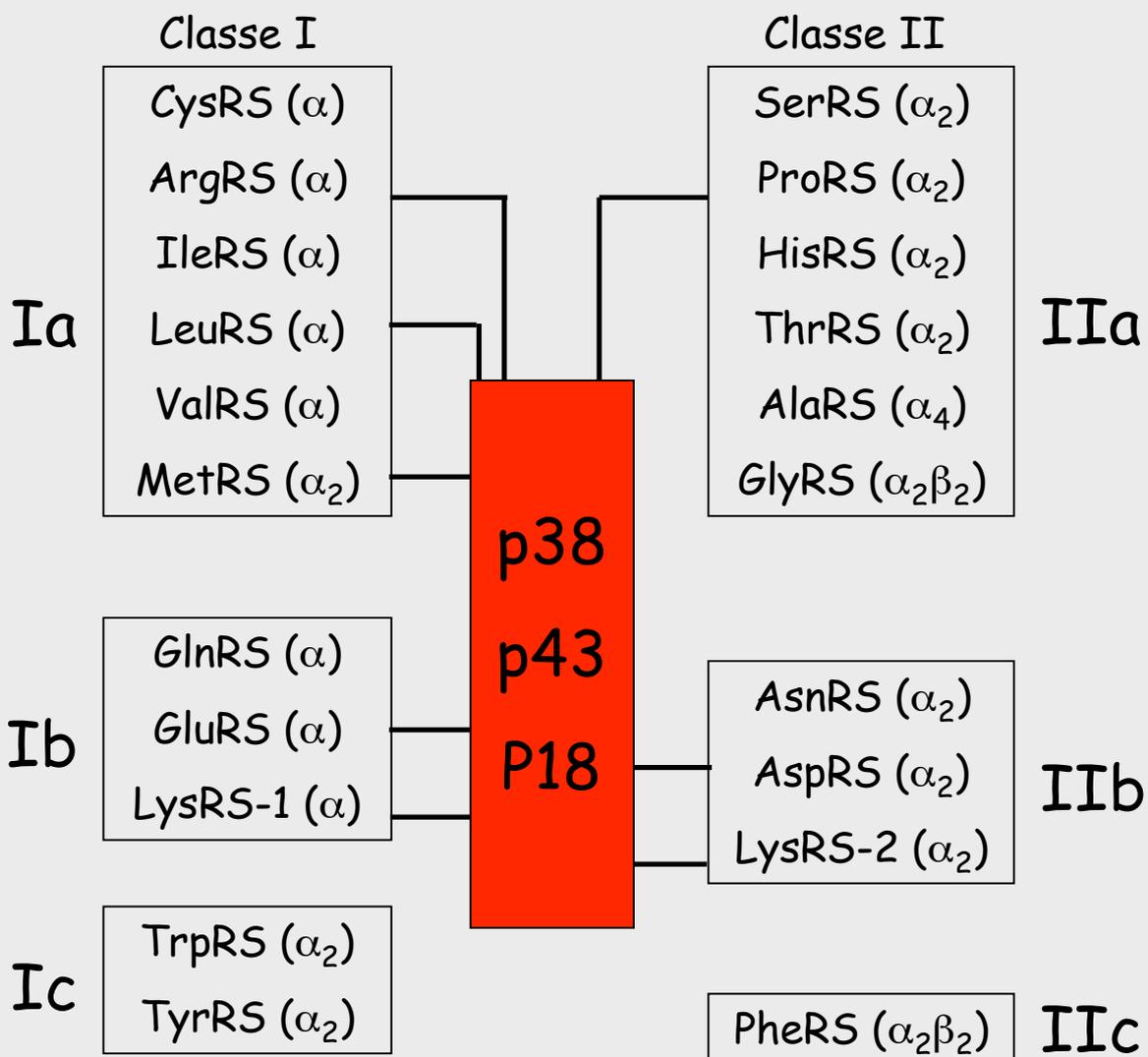
De façon générale les aaRS s'organisent à partir d'un domaine ancestral autour duquel s'ajoutent de nouveaux domaines ou modules.

Le domaine ancestral est le domaine catalytique. Il présente une architecture très conservée spécifique de chaque classe, et permet l'activation et le transfert des acides aminés.

Il est associé à des domaines plus récents, dont la distribution est spécifique à chaque enzyme. Parmi ces domaines, le plus répandu après le domaine ancestral correspond au domaine de



**Figure 16:** Représentation schématique du complexe multisynthétique présent dans les levures. La partie C-terminale (C-Ter) du co-facteur Arcp1 interagit avec les aaRS, alors que la partie N-terminale (N-Ter) interagit avec les ARNt. Avec:  
 Domaine de liaison aux ARNt  
 (Adapté de Galani *et al.*, 2001)



**Figure 17:** Représentation schématique de deux classes d'aaRS, elles même réparties en sous-classes (Ia à Ic et IIa à IIc). Les neuf aaRS qui constituent le complexe multisynthétasique chez l'homme sont indiquées par un trait noir qui les relie aux trois cofacteurs (p53, p43 et p18). (Adapté de Francklyn *et al.*, 2002)

liaison de l'anticodon, ou domaine DALR (Wolf et al., 1999). D'autres domaines interviennent dans l'aminacylation et dans son contrôle (édition). Enfin, ils peuvent conférer aux enzymes de nouvelles propriétés, indépendantes de la synthèse protéique.

On retrouve dans d'autres types de protéines certains domaines acquis par les aaRS au cours de l'évolution (Schimmel and Ribas De Pouplana, 2000). Ainsi, les comparaisons de séquences ont permis de montrer que le domaine Ye<sub>qy</sub>, situé à l'extrémité C-terminale de la GlnRS de *Deinococcus radiodurans* présente des homologies avec les sous-unités des amidotransférases bactériennes (GatB) et archaebactériennes (GatE) impliquées dans la liaison de l'ARNt, (Deniziak et al., 2007). De même, dans l'AspRS de *Thermus thermophilus* et dans la sous-unité GatB de l'amidotransférase des archaebactéries, on retrouve le même domaine GAD (Wolf et al., 1999).

## 2. Complexes multisynthétiques

Bien que les aaRS ne nécessitent pas de facteurs protéiques additionnels pour leur fonctionnement, on les retrouve associées à des co-facteurs dans différents organismes pour former un complexe multisynthétique.

Dans les levures un petit complexe constitué par la MetRS, la GluRS et une protéine non-catalytique Arc1p a été identifiée (**Figure 16**). Les deux aaRS se lient à l'extrémité N-terminale d'Arc1p, alors que dans la partie C-terminale de la protéine un domaine de liaison aux ARNt permet d'améliorer l'activité enzymatique des aaRS (Karanasios et al., 2008).

De même, l'association de la LysRS de la ProRS et de la LeuRS chez l'archaebactérie *methanothermobacter* stimule l'activité d'aminacylation des trois aaRS (Hausmann and Ibba, 2008).

Dans les cellules humaines, les aaRS impliquées dans la formation d'un complexe multisynthétique appartiennent à la fois aux synthétases de classe I (LysRS, ArgRS, MetRS, LeuRS, IleuRS, GluRS) et de classe II (AspRS, ProRS). L'activité catalytique et la stabilité du complexe se fait *via* l'association de ces aaRS à trois co-facteurs non enzymatiques : p43 (homologue de Arc1p), p38 et p18 (**Figure 17**). Ces cofacteurs sont connus pour intervenir au sein de différents processus essentiels à la survie des organismes comme l'angiogenèse ou l'apoptose. Ainsi, bien que le rôle biologique de ce complexe ne soit pas défini, on suppose qu'il permettrait de coupler la synthèse protéique à d'autres mécanismes biologiques (Lee et al., 2004).

	Homo sapiens		S. cerevisiae		T. bruceii		L. major	
	Cyto	Mito	Cyto	Mito	Cyto	Mito	Cyto	Mito
Gly	* (Orange)		* (Orange)					
Ala	(Yellow)	(Red)	* (Orange)					
Val	(Yellow)	(Red)	* (Orange)					
Leu	(Yellow)	(Red)*	(Yellow)	(Red)				
Ile	(Yellow)	(Red)*	(Yellow)	(Red)				
Ser	(Yellow)	(Red)*	(Yellow)	(Red)				
Thr	(Yellow)	(Red)	(Yellow)	(Red)				
Cys	(Yellow)	(Red)	(Orange)					
Met	(Yellow)	(Red)*	(Yellow)	(Red)	(Yellow)	(Red)		
Asp	(Yellow)	(Red)*	(Yellow)	(Red)	(Yellow)	(Red)	(Yellow)	(Red)
Asn	(Yellow)	(Red)	(Yellow)	(Red)				
Glu	(Yellow)	(Red)	(Yellow)	(Red)	*			
Gln	(Yellow)	(White)	* (Orange)		*			
Lys	* (Orange)		(Yellow)	(Red)	(Yellow)	(Red)	(Yellow)	(Red)
Arg	(Yellow)	(Red)*	(Yellow)	(Red)				
His	(Yellow)	(Red)*	* (Orange)					
Phe	(Yellow)	(Red)*	(Yellow)	(Red)				
Tyr	(Yellow)	(Red)*	(Yellow)	(Red)	(Yellow)	(Red)	(Yellow)	(Red)
Trp	(Yellow)	(Red)*	(Yellow)	(Red)	(Yellow)*	(Red)*		
Pro	(Yellow)	(Red)	(Yellow)	(Red)			(Yellow)	(Red)

**Table 5:** Identification des gènes codant pour les aaRS dans le génome nucléaire de quatre espèces (*Homo sapiens*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Trypanosoma bruceii* et *Leishmania major*).

Avec: (Yellow) Gènes codant pour une aaRS cytosolique  
 (Red) Gènes codant pour une aaRS mitochondriale  
 (Orange) Gènes codant pour une aaRS doublement localisée (mitochondrie et cytosol)  
 (White) Pas de gènes identifiés

L'astérisque (\*) précise lorsque la détermination de la localisation s'est faite de façon expérimentale, par rapport aux analyses *in silico*.

### 3-Autres fonctions des aaRS

L'activation de l'acide aminé et son transfert sur l'ARNt correspondant est la fonction de base assurée par les aaRS. Mais en plus de ce rôle clé dans la biosynthèse protéique, les aaRS participent également à d'autres processus cellulaires. On peut citer quelques exemples :

La LysRS intervient dans le cycle viral du HIV de type I. En effet, l'ARNt<sup>Lys</sup> sert d'amorce pour la rétrotranscription du génome viral. Pour ceci, l'ARNt<sup>Lys</sup> lié à la LysRS est incorporé dans les particules virales. Cette incorporation est possible grâce à l'interaction spécifique entre la synthétase et deux autres protéines virale : GAG et la transcriptase reverse (Saadatmand et al., 2008).

Les TyrRS mitochondriale de *Neurospora crassa* et de *Podospora anserina* sont des enzymes bifonctionnelles qui en plus d'assurer l'aminocyclation de l'ARNt<sup>Lys</sup> interviennent dans l'épissage d'introns du groupe I (Paukstelis et al., 2008).

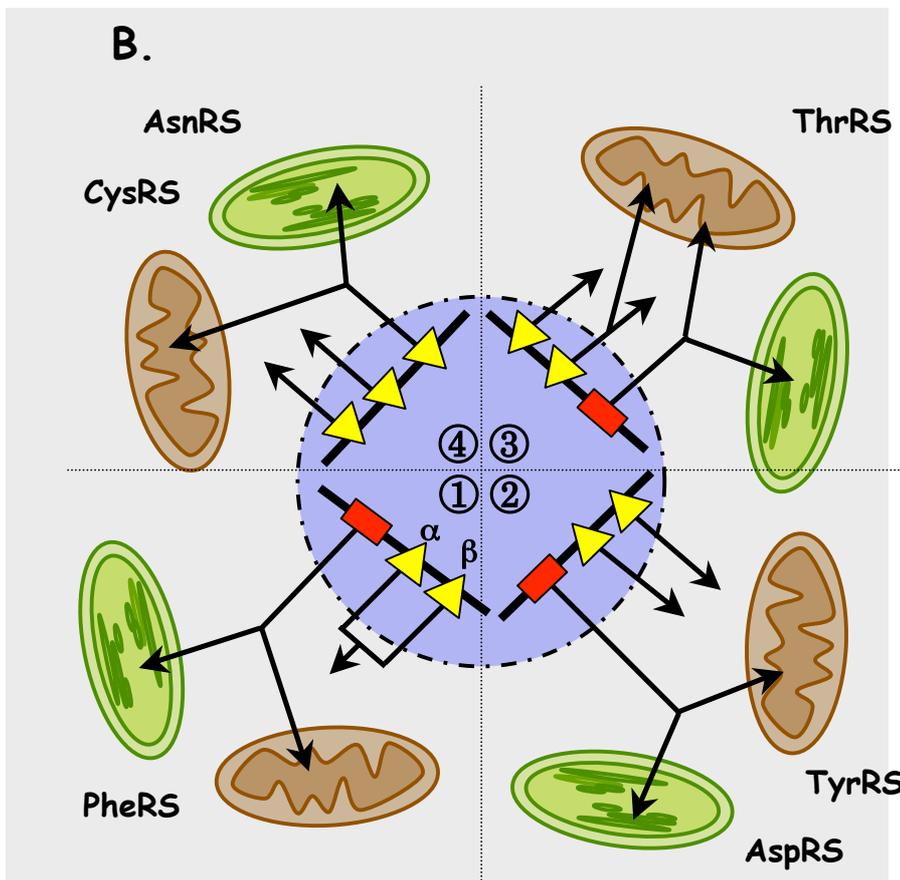
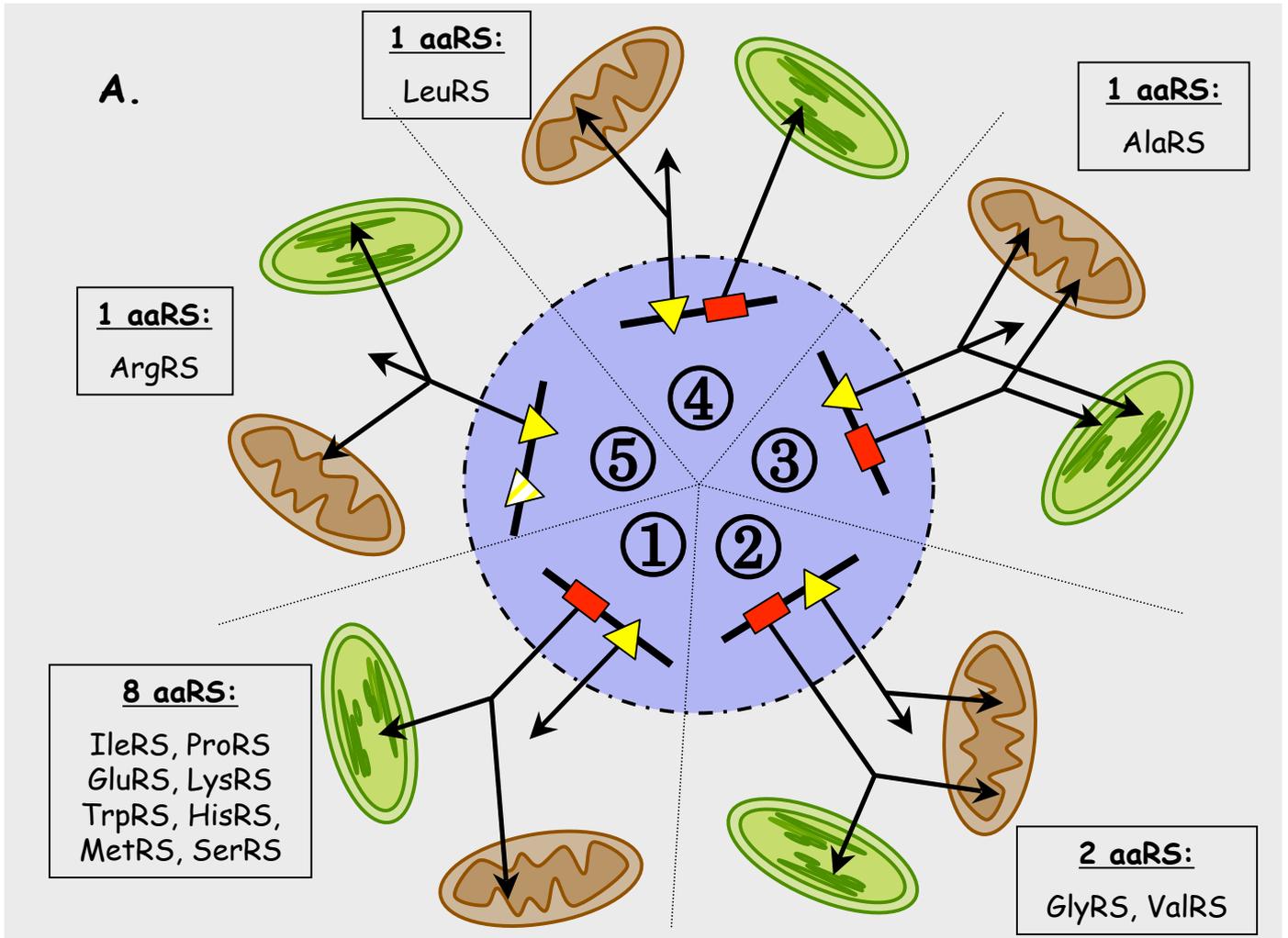
Un dernier exemple concerne les aaRS impliquées dans les voies de signalisation comme la TrpRS qui joue un rôle inhibiteur dans l'angiogenèse (Kapoor et al., 2008).

## C-ORGANISATION DES GENES CODANT POUR LES AARS D'ORGANITES

Durant l'évolution, tous les gènes codant pour les aaRS des organites ont été perdus ou transférés vers le noyau. Aujourd'hui, les aaRS destinées aux mitochondries et aux chloroplastes sont donc importées depuis le cytosol.

Les aaRS sont au nombre de 20, une pour chaque acide aminé. On s'attend donc à retrouver dans le noyau un jeu complet de gènes pour chaque organite où s'effectue la traduction. Or, différentes études ont été menées et il s'avère que la situation est plus complexe.

On retrouve 38 et 37 séquences annotées comme codant respectivement pour les aaRS chez l'homme et chez la levure. Pour ces deux organismes, dans la majorité des cas, deux gènes distincts codent pour l'enzyme mitochondriale et l'enzyme cytosolique (**Table 5**). Il existe cependant des exceptions où une même enzyme se retrouve dans les deux compartiments (GlyRS et LysRS chez l'homme (Bonfond et al., 2005), (Scheper et al., 2007)), GlyRS, AlaRS, ValRS, CysRS, GlnRS et HisRS dans la levure (Turner et al., 2000), (Huang et al., 2006), (Chatton et al., 1988), (Rinehart et al., 2005), (Natsoulis et al., 1986).



**Figure 18:** Organisation des gènes codant pour les aaRS dans le génome nucléaire d'*A. thaliana*. Avec aaRS codées par deux gènes (A), ou aaRS codées par trois gènes (B).

-  Gène d'origine eucaryotique
-  Gène d'origine procaryotique
-  Noyau
-  Mitochondrie
-  Chloroplaste
-  Pseudogène d'origine eucaryotique

Chez les trypanosomes, 26 séquences codant pour une aaRS sont annotées chez *T. brucei*, 23 séquences chez *L. major*. Dans la plupart des cas, on ne retrouve qu'un gène codant pour une aaRS donnée. Mais dans ces organismes aussi des exceptions existent (**Table 5**) :

- les annotations de séquences ont permis de mettre en évidence un certain nombre d'exemples (Met, Asp, Lys et Tyr chez *T. brucei* et Asp, Lys Tyr, Pro pour *L. major*) pour lesquels deux gènes d'aaRS existent ([www.sanger.ac.uk/](http://www.sanger.ac.uk/); [www.genedb.org/](http://www.genedb.org/))
- expérimentalement, deux activités distinctes, cytosolique et mitochondriale ont été mises en évidence pour la TrpRS présente chez *T. brucei* et pour la GluRS et la GlnRS de *L. tarentulae* (Rinehart et al., 2004), (Nabholz et al., 1997).

Dans les plantes, les choses sont d'autant plus complexes que la synthèse protéique se déroule dans trois compartiments : cytosol, mitochondrie et chloroplaste.

Ainsi, trois jeux complets de aaRS, soit 60 gènes sont attendus dans le génome nucléaire d'*A. thaliana*. Une étude menée en 2005 par notre équipe a permis d'en dénombrier seulement 45 (Duchene et al., 2005). L'analyse de ces gènes permet de les classer en trois groupes.

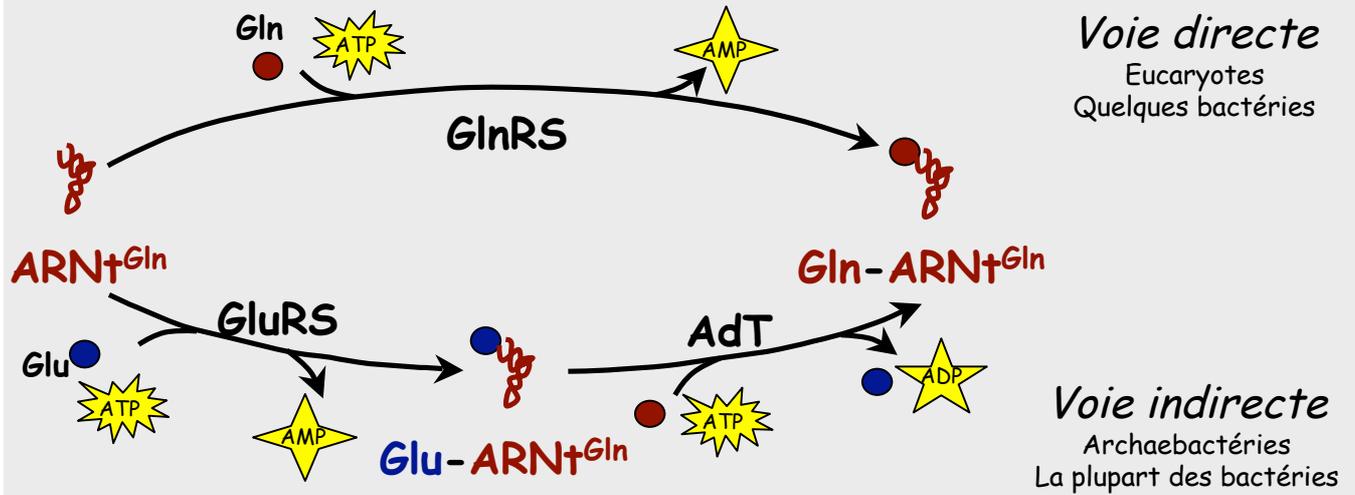
Le cas le plus fréquent est observé lorsque la synthétase spécifique d'un aa est codée par deux gènes (Figure 18A).

Dans ce groupe, en général, un gène d'origine procaryotique dérivé d'un des deux symbiotes code pour une enzyme que l'on retrouve à la fois dans les mitochondries et dans les chloroplastes, alors qu'un gène d'origine eucaryotique code pour l'aaRS cytosolique (IleRS et MetRS entre autre **Fig. 18A.1**). L'acquisition par le gène d'origine eucaryotique d'une séquence d'adressage permet dans de nombreux cas à la protéine cytosolique d'être également adressée aux organites (**Fig. 18A.2 à 5**). Ainsi la GlyRS par exemple est localisée dans le cytosol et les mitochondries (**Fig. 18A.2**) et l'on retrouve l'AlaRS dans les trois compartiments, cytosol, mitochondries et chloroplastes (**Fig. 18A.3**).

Au cours de l'évolution, un phénomène de duplication du gène d'origine eucaryotique peut également avoir lieu. Ainsi, pour un aa, l'enzyme correspondante est codée par trois gènes (Figure 18B). :

- 1 gène d'origine procaryotique code pour une protéine localisée à la fois dans les mitochondries et les chloroplastes ;

A.



B.

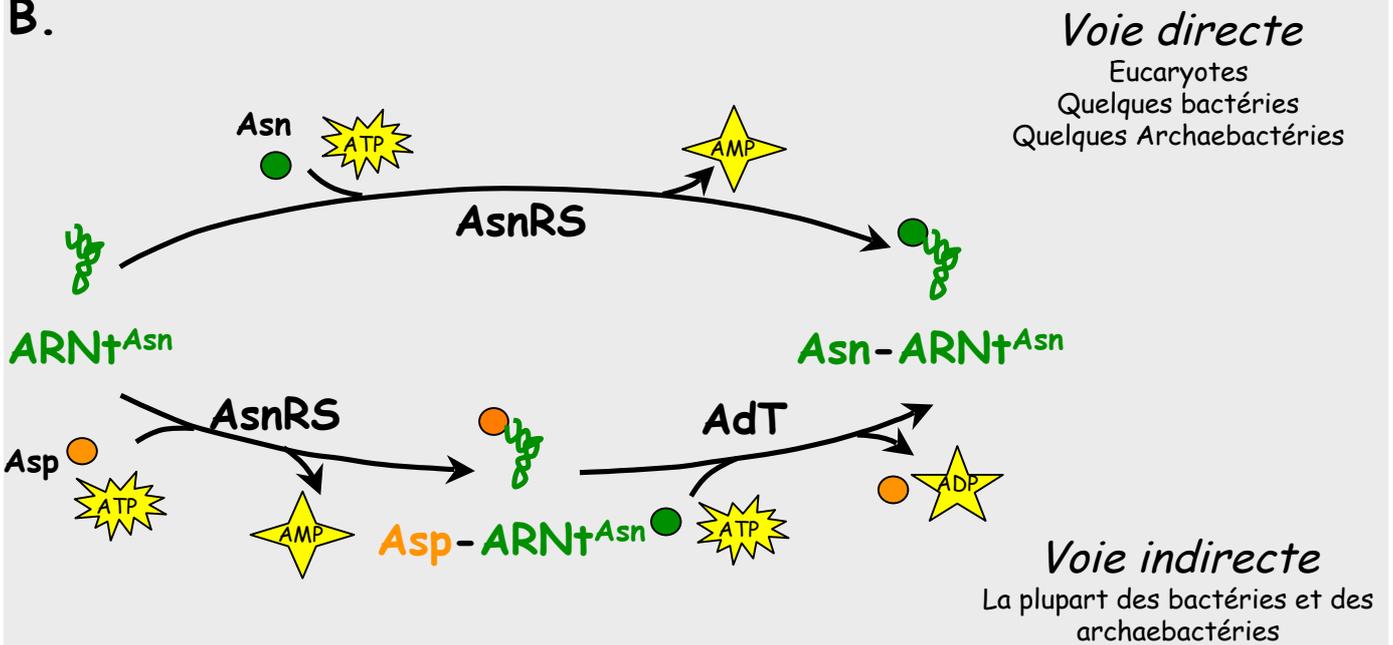


Figure 19: Synthèse indirecte (A) du Gln-ARNt<sup>Gln</sup> et (B) de l'Asn-ARNt<sup>Asn</sup>.

- deux gènes d'origine eucaryotique codent pour les protéines cytosoliques, ayant (ThrRS, **Fig. 18B3**) ou non (AspRS **Fig. 18B2**) acquis une séquence d'adressage leur permettant d'être également destinées aux organites.

Seuls les gènes codant pour la PheRS, l'AsnRS et la CysRS n'obéissent pas à cette règle :

- La PheRS cytosolique est une enzyme hétérotétramérique ( $\alpha_2\beta_2$ ). Ainsi les deux gènes d'origine eucaryotique codent pour les deux sous-unités cytosoliques de l'enzyme (**Fig. 18B.1**).
- Les trois gènes codant pour l'AsnRS et la CysRS sont d'origine eucaryotique et correspondent à la duplication d'un gène unique. Un seul de ces trois gènes a ensuite acquis une séquence d'adressage permettant à la protéine correspondante d'être localisée dans les mitochondries et les chloroplastes (**Fig. 18B.4**).

Enfin, une séquence unique a été identifiée dans le génome d'*A. thaliana* codant pour la GlnRS. Celle-ci ne possède pas de séquence d'adressage et donc ne permet pas, *a priori* l'adressage de la protéine vers les mitochondries ou les chloroplastes.

## 4 .VOIES ALTERNATIVES DANS L'AMINOACYLATION DES ARNt

La synthèse des aminoacyl-ARNt est une réaction essentielle pour l'expression des gènes. Elle fait intervenir les aminoacyl-ARNt synthétases (aaRS) qui catalysent la liaison d'un acide aminé à l'ARNt correspondant (cf. **Figure 15**).

Mais de nombreuses études ont démontré que la règle d'une aaRS pour un aa n'était préservée que dans le cytoplasme des eucaryotes : la plupart des organismes ont moins de 20 enzymes. Ainsi l'absence de glutaminyl-ARNt synthétase (GlnRS) est depuis longtemps une exception dans la plupart des bactéries et toutes les archaebactéries qui ne possèdent pas cette enzyme. De même, l'asparaginyl-ARNt synthétase (AsnRS) est absente dans de nombreuses archaebactéries et quelques bactéries. Les organismes qui ne possèdent pas ces protéines doivent donc utiliser une voie alternative pour générer le Gln-ARNt<sup>Gln</sup> et l'Asn-ARNt<sup>Asn</sup>.

Cette voie alternative est la voie de transamidation. Elle se déroule en deux temps. Pour la synthèse du Gln-ARNt<sup>Gln</sup> (**Figure 19A**), le glutamate se lie à l'ARNt<sup>Gln</sup> grâce à une Glutamyl-ARNt synthétase (GluRS) non discriminante (ND). Une seconde enzyme intervient ensuite, une amidotransférase-ARNt dépendante (AdT) qui convertit le glutamate en glutamine en



présence d'ATP et d'un donneur d'amide. L'Asn-ARNt<sup>Asn</sup> est synthétisé de façon similaire (**Figure 19B**) grâce à l'intervention d'une aspartyl-ARNt synthétase (AspRS) ND qui attache l'aspartate à l'ARNt<sup>Asn</sup>. Au cours de la dernière étape, l'AdT intervient pour convertir l'acide aminé en asparagine.

## A-SYNTHESE DU GLN-ARNt<sup>Gln</sup> DANS LES ORGANITES

La première étude sur la voie de biosynthèse du Gln-ARNt<sup>Gln</sup> dans les organites a été menée par l'équipe de Dieter Söll en 1988 {Schön, 1988 #219}. Elle a démontré l'absence d'activité GlnRS dans les chloroplastes, les mitochondries animales et végétales ainsi que dans les cyanobactéries. Il aura cependant fallu attendre presque vingt ans pour identifier précisément les facteurs impliqués dans cette voie. Voici un bref résumé des connaissances disponibles à ce jour sur la voie de biosynthèse du Gln-ARNt<sup>Gln</sup> dans les chloroplastes et les mitochondries (**Figure 20**).

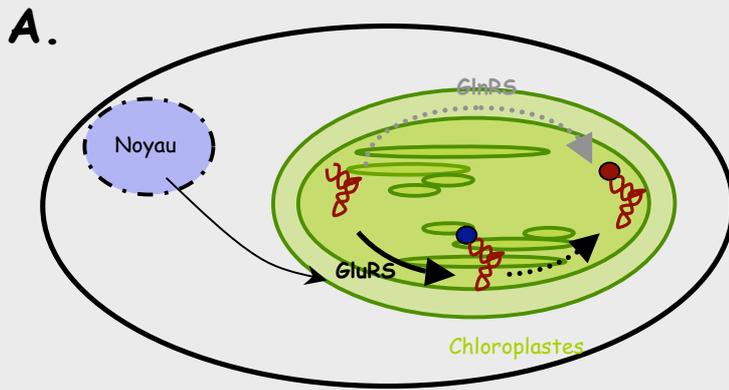
### 1. Dans les chloroplastes

Dès 1988 A. Schön *et al.* {Schön, 1988 #219} ont mis en évidence la présence de Glu-ARNt<sup>Gln</sup> dans les chloroplastes d'orge (**Figure 20A**). Ils ont également démontré qu'un extrait enzymatique chloroplastique brut pouvait convertir le glutamate lié à l'ARNt en glutamine. Cette conversion se fait uniquement en présence d'ARNt, d'ATP et d'un donneur d'amide. Les enzymes responsables de ces réactions n'ont cependant pas été identifiées au cours de cette première analyse.

Onze ans plus tard, c'est une étude sur la formation de l'acide  $\delta$ -aminolevulinique, composé essentiel à la biosynthèse de la chlorophylle, qui a conduit l'équipe de D. Söll à s'intéresser à la GluRS chloroplastique de *Chlamydomonas reinhardtii* (Chen et al., 1990). La purification de l'enzyme chez *Chlamydomonas reinhardtii* a permis de mettre en évidence l'activité non-discriminante de l'enzyme, qui reconnaît et aminoacyle à la fois l'ARNt<sup>Glu</sup> et l'ARNt<sup>Gln</sup>. Ils ont ainsi pu identifier le premier acteur de la voie indirecte de synthèse du Gln-ARNt<sup>Gln</sup> dans les chloroplastes.

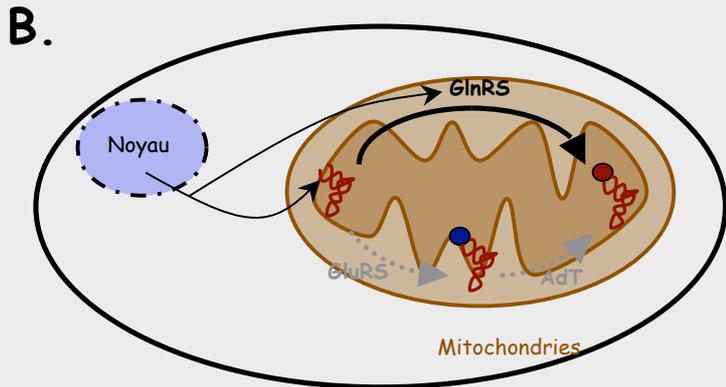
### 2. Dans les mitochondries

Du fait de la plus grande diversité d'organismes possédant des mitochondries par rapport à ceux possédant des chloroplastes, la situation y est plus complexe. Ainsi, la



**Voie indirecte**

Schön *et al.*, (1988); Chen *et al.*, (1990)



*T.brucei et L.tarentatae*

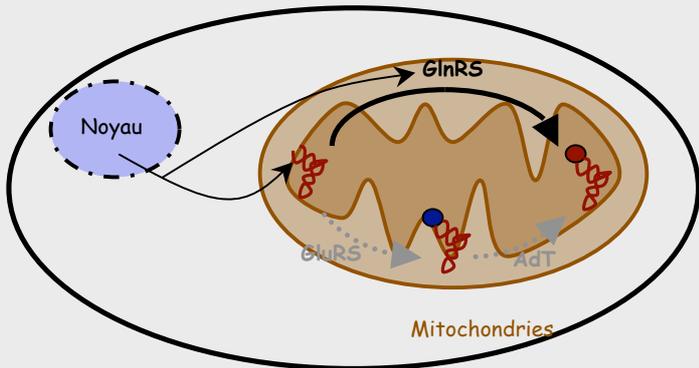
**Voie directe**

*Trypanosoma brucei*

- $GlnRS/ARNt^{Gln}$ : 1 gène unique dans le génome nucléaire
- Protéine/ARNt: partagés entre le cytosol et les mitochondries.

*Leishmania tarentalae*

- $GlnRS/ARNt^{Gln}$ : 2 gènes dans le génome nucléaire
- Protéine/ARNt: Un jeu spécifique du cytosol et un jeu spécifique des mitochondries.



*S. Cerevisiae*

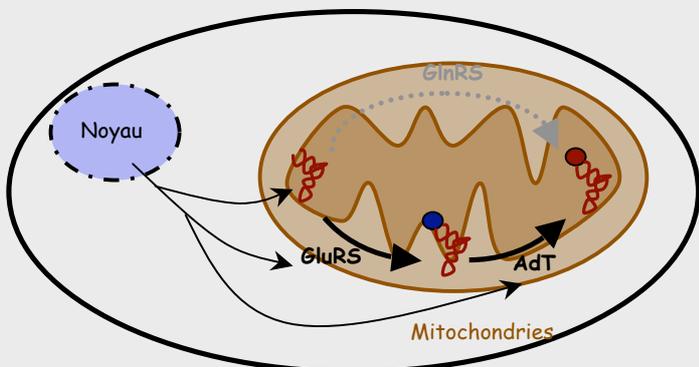
**Voie directe ?**

*In vitro:*

- $GluRS$  discriminante
- $GlnRS$  et  $ARNt^{Gln}$  codés par le génome nucléaire et importés dans les mitochondries

*In vivo:*

- $Glu-ARNt^{Gln}$  trouvé dans les mitochondries
- Homologues de l'AdT identifiés et essentiels au fonctionnement mitochondrial



*H. Sapiens*

**Voie indirecte**

- Pas de gène identifié codant pour la  $GlnRS$
- Importation du  $ARNt^{Gln}$  (Rubio *et al.*, 2008)
- AdT active (Nagao *et al.*, 2007)
- Importation de la  $GluRS$  mitochondriale

**Figure 20: A.** Synthèse du  $Gln-ARNt^{Gln}$  dans les chloroplastes.

**B.** Synthèse du  $Gln-ARNt^{Gln}$  dans les mitochondries.

Avec: Noyau; Mitochondries;  $ARN^{Gln}$ ;  $Glu-ARNt^{Gln}$ ;  $Gln-ARNt^{Gln}$   
 → Protéine/ARNt codé par le génome nucléaire et importé depuis le cytosol  
 [ → Voie utilisée ] / [ ... → ou non ] pour la synthèse du  $Gln-ARNt^{Gln}$

formation du Gln-ARNt<sup>Gln</sup> peut suivre différentes voies en fonction des organismes (**Figure 20B**) :

### 2.a - Dans les mitochondries de protozoaires

La voie d'aminocyclation directe est utilisée dans les mitochondries de *Trypanosoma brucei* (Rinehart et al., 2004) et de *Leishmania tarentolae* (Nabholz et al., 1997).

Il y a cependant quelques différences entre les deux organismes :

- Si tous deux ont perdu la totalité des gènes mitochondriaux codant pour les **ARNt**, contrairement aux trypanosomes qui partagent le même ARNt isoaccepteur (ARNt<sub>UUG</sub><sup>Gln</sup>) dans les compartiments cytosolique et mitochondrial, *L. tarentolae* présente un isoaccepteur cytosolique (ARNt<sub>CUG</sub><sup>Gln</sup>) différent de l'isoaccepteur importé dans les mitochondries (ARNt<sub>UUG</sub><sup>Gln</sup>).
- L'autre différence porte sur la **GlnRS** : chez *T. brucei*, un seul gène nucléaire code pour une enzyme que l'on retrouve à la fois dans le cytosol et les organites. Pour *L. tarentolae*, activité cytosolique et mitochondriale sont dues à deux enzymes distinctes, toutes deux codées par le génome nucléaire.

### 2.b - Dans les mitochondries de *Saccharomyces cerevisiae*

Chez *S. cerevisiae*, tout laissait à penser que la synthèse du Gln-ARNt<sup>Gln</sup> se faisait par la voie indirecte : la présence de Glu-ARNt<sup>Gln</sup> dans les mitochondries a été mise en évidence en 1977 (Martin et al., 1977), puis deux protéines, Pet112 et YMR293C, homologues aux sous-unités de l'AdT ont été identifiées dans le génome nucléaire (Mulero et al., 1994), (Hughes et al., 2000). Rinehart *et al.* n'ont toutefois pas pu mesurer d'activité d'amidation dans les fractions mitochondriales. Par contre, ils ont démontré l'importation à la fois de la GlnRS et de l'ARNt<sup>Gln</sup> du cytosol vers les mitochondries (Rinehart et al., 2005). Ainsi, d'après leurs résultats, à la suite de son importation dans les mitochondries, la GlnRS cytosolique lie la glutamine à l'ARNt correspondant, ARNt<sup>Gln</sup> lui-même importé.

### 2.c - Dans les mitochondries d' *Homo sapiens*

Malgré la présence d'un ARNt<sup>Gln</sup> importé depuis le cytosol (Rubio et al., 2008), c'est la voie indirecte qui permettrait la synthèse du Gln-ARNt<sup>Gln</sup> dans les mitochondries humaines. En effet, une équipe japonaise aurait isolé les deux enzymes mitochondriales (GluRS non-discriminante (ND) et AdT) impliquées dans la voie de biosynthèse (Yuan et al., 2008).

oligométrie	Hétérotrimérique		Hétérodimérique	
Type	GatCAB		GatDE	
Où	Bactérie	Archaeobactérie	Archaeobactérie	
Spécificité	Glu-AdT et/ou Asp-AdT	Asp-AdT	Glu-AdT	
Exemples	<p><b>Asp-AdT</b> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Akochy, 2004)</p> <p><b>Glu-AdT</b> <i>Bacillus subtilis</i> (Curnow, 1997)</p> <p><b>Glu/Asp-AdT</b> <i>Helicobacter pylori</i> (Salazar, 2003)</p>	<p><b>Glu-AdT</b> <i>Pyrococcus aerophilum</i> (Tumbula, 2000)</p> <hr/> <p><b>Glu-AdT et Asp-AdT</b> <i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i> (Sheppard, 2008)</p>		

**Figure 21:** Représentation schématique des deux types d'AdT.

## 2.d - Dans les mitochondries végétales

Si l'équipe de D. Söll (Schon et al., 1988) a montré la présence de Glu-ARNt<sup>Gln</sup> dans les fèves de haricots, les enzymes impliquées dans la formation de cet ARNt n'avaient jusqu'à l'heure pas été identifiées.

## C-LES ENZYMES IMPLIQUEES DANS LA VOIE INDIRECTE

Deux enzymes sont nécessaires à la formation du Gln-ARNt<sup>Gln</sup> et de l'Asn-ARNt<sup>Asn</sup> : une aaRS non-discriminante (aaRS-ND) capable de former l'intermédiaire réactionnel (Glu-ARNt<sup>Gln</sup> ou l'Asp-ARNt<sup>Asn</sup>) et une amidotransférase ARNt dépendante (AdT) capable de convertir l'acide aminé.

### 1. Amidotransférases ARNt dépendante

#### 1.a - Généralités

Deux types d'AdT existent (**Figure 21**) :

- une AdT hétérotrimérique GatCAB que l'on retrouve à la fois dans les bactéries et les archaebactéries.
- une AdT hétérodimérique GatDE, que l'on ne retrouve que dans les archaebactéries.
- Dans les bactéries :

Trois sous unités, GatA, GatB et GatC sont présentes dans les bactéries. Elles s'associent pour former une amidotransférase **hétérotrimérique GatCAB** capable de transamider le Glu-ARNt<sup>Gln</sup> et l'Asp-ARNt<sup>Asn</sup>. *In vivo* l'activité de ces enzymes dépend uniquement du type d'ARNt à modifier (Glu-ARNt<sup>Gln</sup> et/ou Asp-ARNt<sup>Asn</sup>).

Ainsi dans les bactéries, on observe plusieurs possibilités :

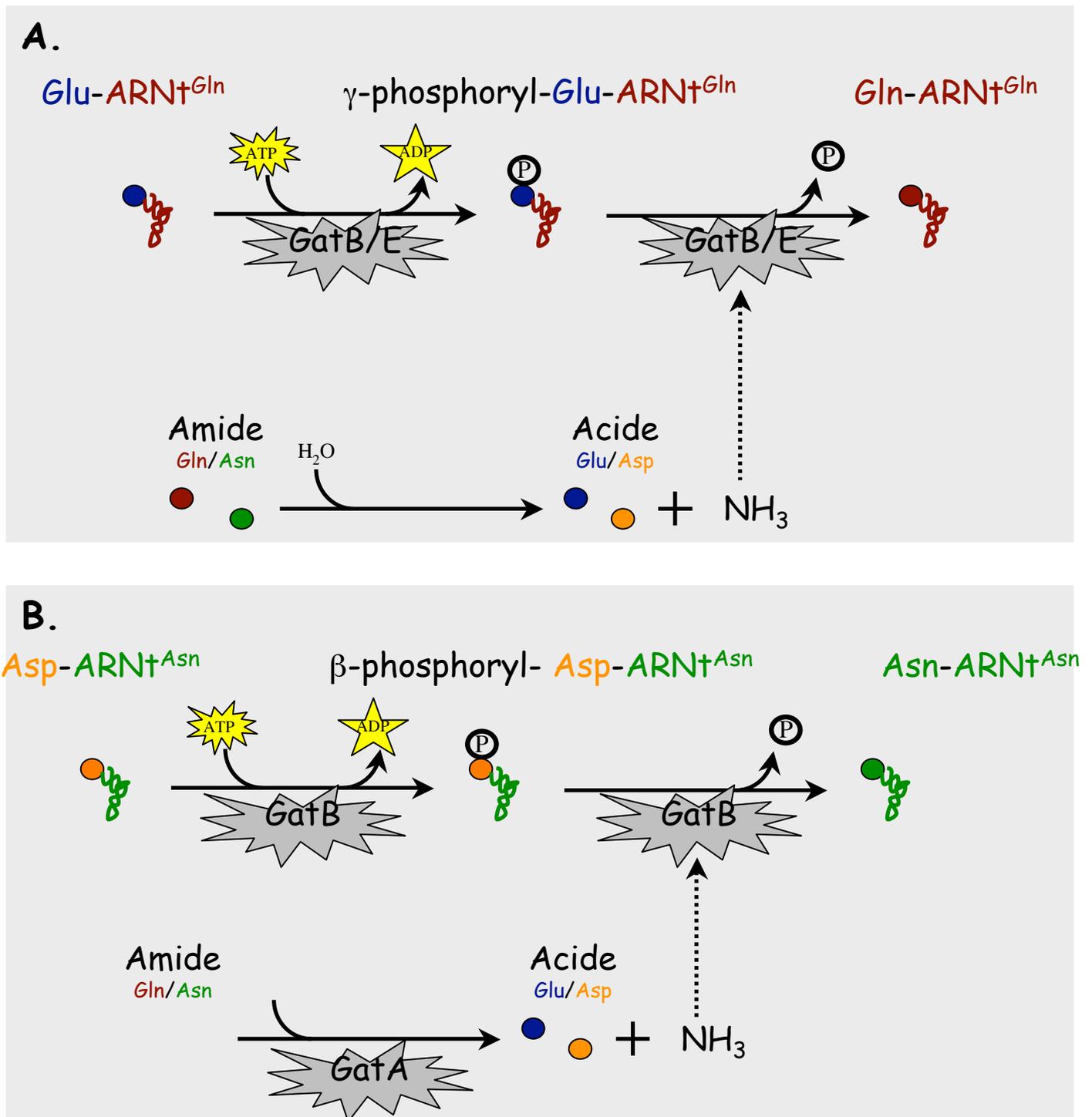
*Pseudomonas aeruginosa* possède une AspRS-ND mais ne possède pas de GluRS-ND : cette bactérie utilise uniquement l'activité Asp-AdT de l'amidotransférase (Akochy et al., 2004).

A l'inverse, l'AdT identifiée chez *Bacillus subtilis* est une Glu-AdT (Curnow et al., 1997).

On retrouve une troisième possibilité chez *Helicobacter pylori*. Dans ce cas la bactérie possède deux types d'aaRS-ND (GluRS-ND et AspRS-ND). GatCAB a donc une double fonction : Glu-ADT et Asp-AdT (Salazar et al., 2003).

- Dans les archaebactéries :

On décèle également une **AdT hétérotrimérique (GatCAB)** dans les archaebactéries. Elle est présente lorsque le génome ne code pas pour une AsnRS. Capable de transamider l'Asp-



**Figure 22:** Trois réactions catalysées par GatCAB et GatDE pour la synthèse du  $\text{Gln-ARNt}^{\text{Gln}}$  (A) ou de l' $\text{Asn-ARNt}^{\text{Asn}}$  (B).  
(Adapté de Sheppard *et al.*, 2008)

ARNt<sup>Asn</sup>, une étude récente montre qu'elle est incapable de transamider le Glu-ARNt<sup>Gln</sup> (Sheppard et al., 2008a). Il s'agit donc d'une Asp-AdT.

Enfin toutes les archaebactéries possèdent le **dimère GatDE**. Il assure la conversion du Glu-ARNt<sup>Gln</sup> en Gln-ARNt<sup>Gln</sup> (Tumbula et al., 2000).

On peut ainsi retrouver dans un même organisme les deux types d'amidotransférases : le génome de *Methanothermobacter thermautotrophicus* code pour deux AdT, chacune avec son activité : GatDE pour la synthèse du Gln-ARNt<sup>Gln</sup> et GatCAB pour la synthèse de l'Asn-ARNt<sup>Asn</sup> (Sheppard et al., 2008a).

### 1.b - Réactions catalysées par l'AdT

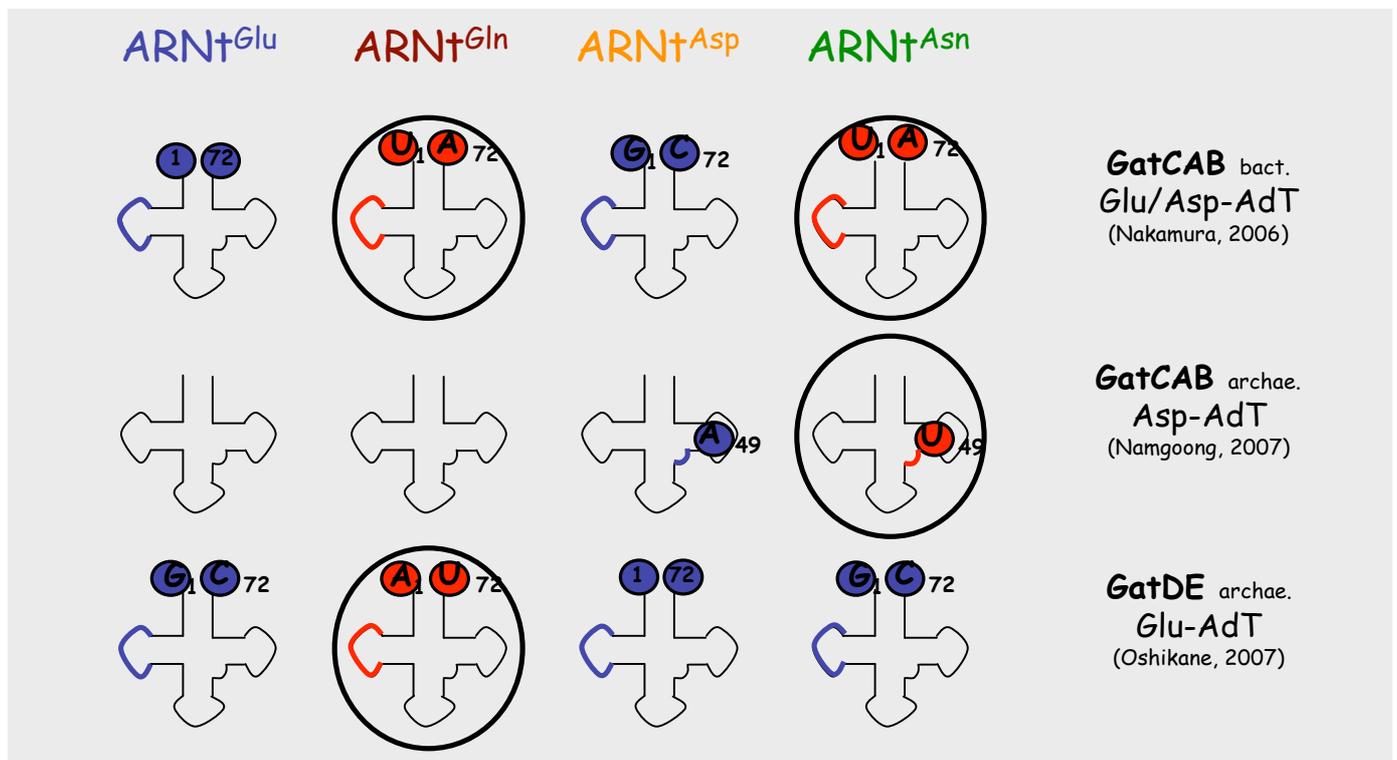
La réaction de transamidation catalysée par l'AdT (GatCAB ou GatDE) a lieu en trois temps (**Figure 22**) (Sheppard et al., 2008b) :

Tout d'abord, l'enzyme agit comme une kinase pour phosphoryler l'acide aminé attaché à l'ARNt et ainsi catalyser, en présence d'ATP, la formation d'un intermédiaire actif, le  $\gamma$ -phosphoryl-Glu-ARNt<sup>Gln</sup> ou le  $\beta$ -phosphoryl-Asp-ARNt<sup>Asn</sup>.

Parallèlement, l'AdT hydrolyse la liaison amide des donneurs d'amide tels que la Glutamine ou l'Asparagine pour former l'acide aminé correspondant (Glutamate ou Aspartate), et libérer un groupement NH<sub>3</sub>, finalement utilisé pour former l'aminoacyl-ARNt convenable : Gln-ARNt<sup>Gln</sup> ou Asn-ARNt<sup>Asn</sup>.

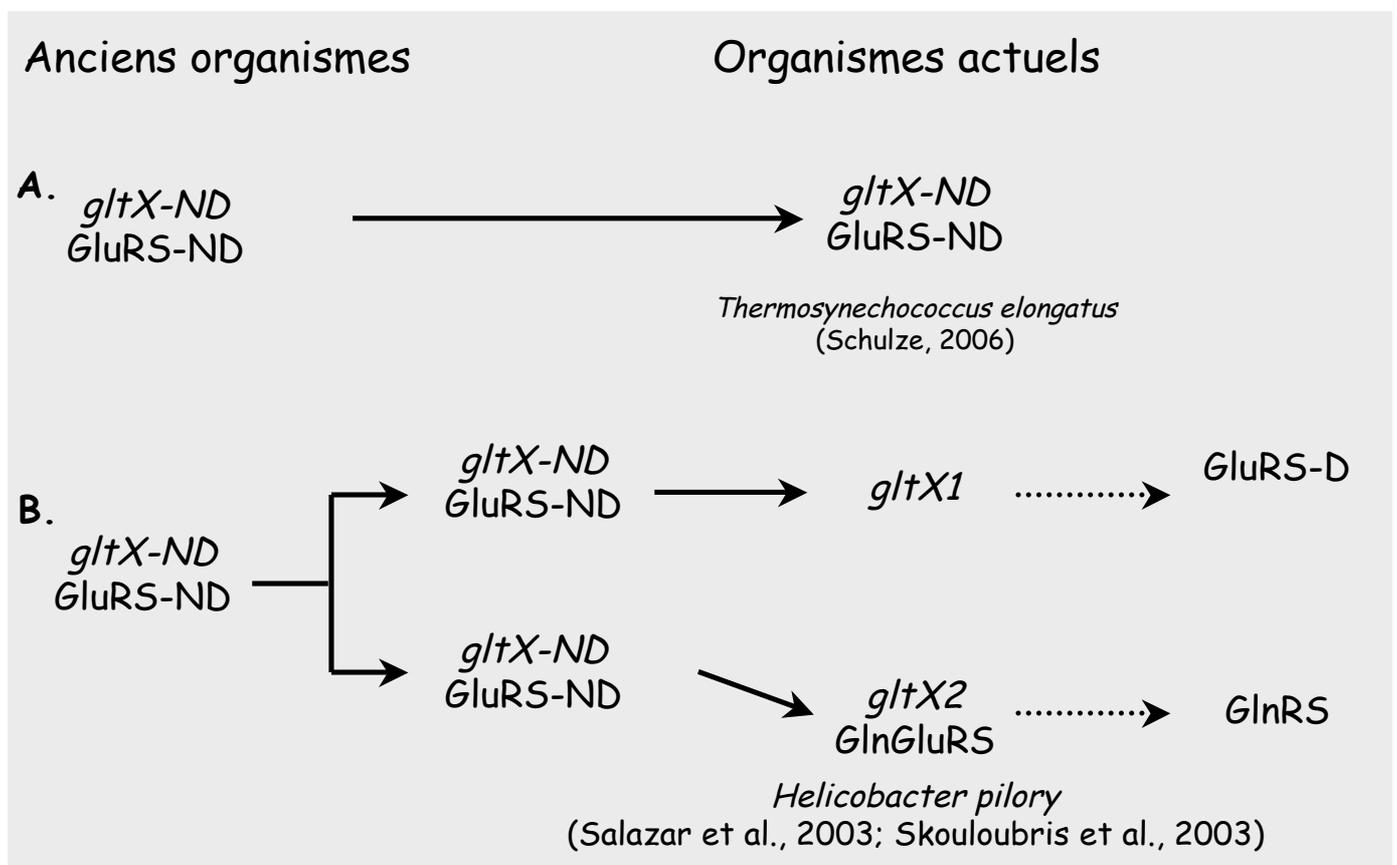
### 1.c - Rôles des différentes sous-unités (Figure 22)

- Les sous-unités A et D assurent la libération du groupement ammoniac, grâce à l'activité **amidase de GatA** et l'activité **asparaginase de GatD** (Nakamura et al., 2006), (Schmitt et al., 2005). On note que les 2 sous-unités n'ont pas la même spécificité de substrat : GatD peut utiliser les 2 amides comme substrat, alors que la Glutamine est un meilleur substrat que l'Asparagine pour GatA (Sheppard et al., 2008a).
- GatB et E appartient à la famille des protéines P112. Ces sous-unités catalysent deux réactions : tout d'abord la phosphorylation du Glu-ARNt<sup>Gln</sup> ou de l'Asp-ARNt<sup>Asn</sup> grâce à une **activité kinase**. Puis une **activité amidotransférase** utilise l'ammoniac libéré par GatA ou GatD pour convertir le phospho-glutamate/aspartate en l'amine correspondante (Gln/Asn) (Nakamura et al., 2006), (Schmitt et al., 2005).
- Enfin, GatC est une petite protéine qui semble nécessaire au repliement et à la liaison de GatA avec GatB (Nakamura et al., 2006).



**Figure 23:** Représentation schématique des éléments de reconnaissance entre ARNt et AdT.

En rouge: éléments de discrimination positive  
En bleu: éléments de discrimination négative



**Figure 24:** Représentation schématique d'un modèle d'évolution des GluRS à partir d'une GluRS ancestrale (Adapté de Skouloubris PNAS, 2003).

### 1.d - Reconnaissance des ARNt par l'AdT :

La lecture correcte du code génétique au moment de la traduction nécessite une spécificité d'interaction entre l'aminocyl-ARNt synthétase et l'ARNt. Des signaux moléculaires, appelés éléments d'identité permettent cette reconnaissance spécifique entre l'ARNt et son aaRS (cf. II.2.C).

On observe pour les AdT un niveau supplémentaire de complexité, puisqu'en plus de cette distinction « classique », elles doivent faire la différence entre les ARNt correctement chargés (Asn-ARNt<sup>Asn</sup> et Gln-ARNt<sup>Gln</sup>) et les ARNt mischargés (Asp-ARNt<sup>Asn</sup> et Glu-ARNt<sup>Gln</sup>) (**Figure 23**).

- Dans les bactéries, GatCAB reconnaît le Glu-ARNt<sup>Gln</sup> et l'Asp-ARNt<sup>Asn</sup>. Il n'est donc pas surprenant que les mêmes éléments soient reconnus sur les deux ARNt. Ces éléments très conservés sont d'une part la première paire de base du bras accepteur (U1-A72), qui permet la reconnaissance de l'ARNt<sup>Gln</sup> ou ARNt<sup>Asn</sup> ; d'autre part les bases surnuméraires dans la boucle D, qui empêche l'AdT de se lier aux ARNt<sup>Glu</sup> ou ARNt<sup>Asp</sup> (Nakamura et al., 2006).

- Au sein des archaebactéries, les éléments de reconnaissance ne sont pas conservés entre les deux amidotransférases (GatDE ou GatCAB) :

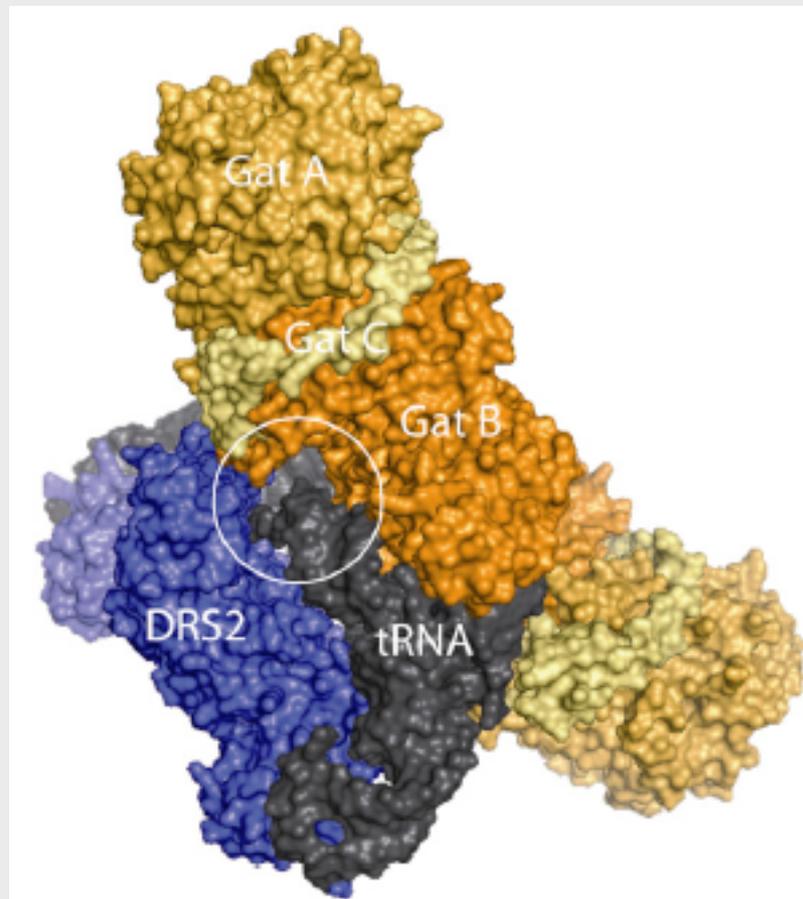
GatDE est une Glu-AdT. Elle reconnaît la première paire du bras accepteur de l'ARNt<sup>Gln</sup> et les bases surnuméraires dans la boucle D (Oshikane et al., 2006).

Enfin, l'amidotransférase hétérotrimérique GatCAB présente chez les archaebactéries, à l'inverse de GatDE et de GatCAB bactérien, ne reconnaît pas la première paire de base du bras accepteur des ARNt. L'enzyme utilise la longueur de la boucle variable et la base en 49<sup>e</sup> position pour se lier à l'Asp-ARNt<sup>Asn</sup> (Namgoong et al., 2007).

## 2.AaRS non discriminante

### 2.a - GluRS

Les GluRS non discriminantes (ND) permettent à la fois la formation du Glu-ARNt<sup>Gln</sup> et du Glu-ARNt<sup>Glu</sup> (Lapointe et al., 1986). Ceci s'explique car ces enzymes ont une spécificité de reconnaissance plus large pour les ARNt que les GluRS « classiques » discriminantes (D). Cette spécificité relâchée s'explique en partie par la nature du résidu présent en 358<sup>ème</sup> position (Schulze et al., 2006) : la substitution du résidu Arginine (GluRS-D) par un résidu Glycine (GluRS-ND) permettrait la reconnaissance par l'aaRS de la base G36 de l'ARNt<sup>Gln</sup>, beaucoup trop encombrante pour être reconnue par une GluRS-D.



**Figure 25:** Représentation schématique du complexe formé entre l'AspRS, l'ARNt<sup>Asn</sup> et les trois sous-unités de l'AdT chez *Thermus thermophilus*, également appelé Transamidosome.

(D'après Bailly *et al.*, 2008)

Avec: AspRS en bleu; ARNt<sup>Asn</sup> en noir; trois sous unités de l'ADT (GatA, GatB et GatC) en orangé.

Récemment un nouveau type de GluRS capable d'aminocycler le Glu-ARNt<sup>Gln</sup> a été découvert: la GluRS2 ou GlnGluRS (**Figure 24B**).

Ainsi, le génome d'*Helicobacter pylori* contient deux gènes issus de la duplication d'un gène ancestral codant pour une GluRS : *gltx1* et *gltx2*.

- *gltx1* code pour une enzyme GluRS1 discriminante. Elle n'aminocycle que l'ARNt<sup>Glu</sup>.
- *gltx2* code pour une deuxième GluRS capable de produire le Glu-ARNt<sup>Gln</sup>. Cette enzyme est aussi qualifiée de GluGlnRS puisqu'elle a perdu la capacité d'aminocycler son ARNt<sup>Glu</sup> (Lee and Hendrickson, 2004). Elle pourrait donc représenter un intermédiaire entre l'évolution des GluRS en GlnRS (Skouloubris et al., 2003), (Salazar et al., 2003).

## 2.b - AspRS

Deux types d'AspRS existent chez les bactéries.

Une première enzyme, AspRS1, dont la structure présente des motifs communs à ceux retrouvés dans les AspRS de type eubactérien. Elle est discriminante et ne reconnaît et n'aminocycle que l'ARNt<sup>Asp</sup>.

Mais les bactéries contiennent également une deuxième protéine : AspRS2. Cette protéine de type archaebactérien est non-discriminante. Elle aspartyle à la fois l'ARNt<sup>Asp</sup> et l'ARNt<sup>Asn</sup> (Becker et al., 2000), (Min et al., 2002).

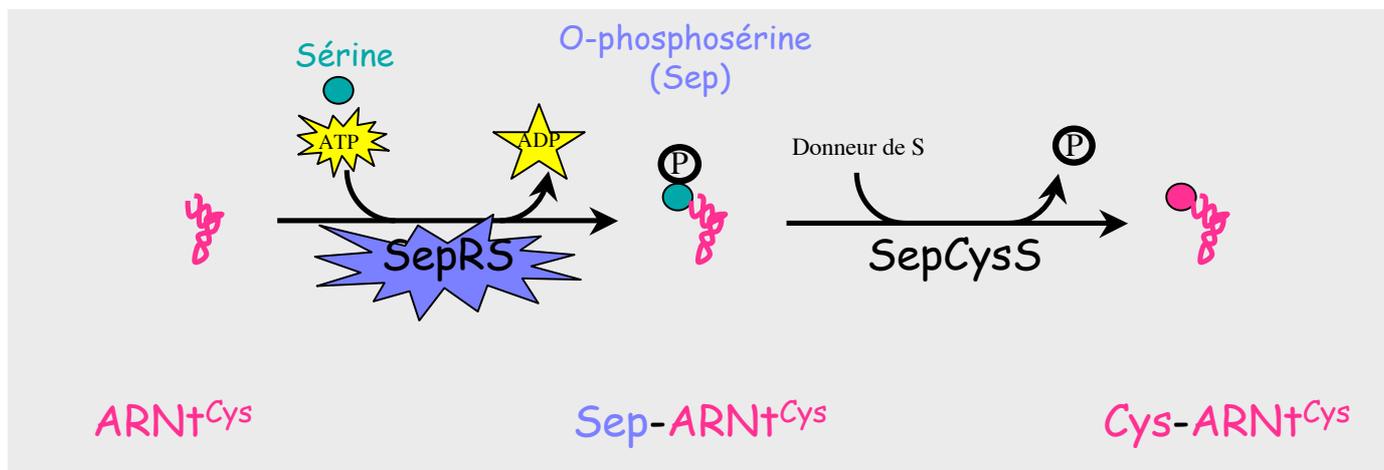
## 3.Complexe entre Adt, ARNt et aaRS

Les éléments de reconnaissance ARNt/aaRS et ARNt/AdT ne sont pas les seuls facteurs qui permettent aux cellules d'assurer un contrôle strict de la traduction en présence des intermédiaires mis-acylés. En effet, il a été récemment mis en évidence dans *T. thermophilus* la présence d'un complexe entre GatCAB, AspRS-ND et ARNt<sup>Asn</sup> (Bailly et al., 2007).

Ce complexe appelé Transamidosome permet la formation de l'Asn-ARNt<sup>Asn</sup> en empêchant l'usage abusif de Asp-ARNt<sup>Asn</sup> au cours de la traduction (**Figure 25**).

Il intervient également dans la protection de l'Asn-ARNt<sup>Asn</sup> contre la déacylation, puisque le facteur EF-Tu qui joue normalement ce rôle ne reconnaît pas l'ARNt misacylé (Nagao and Suzuki, 2007).

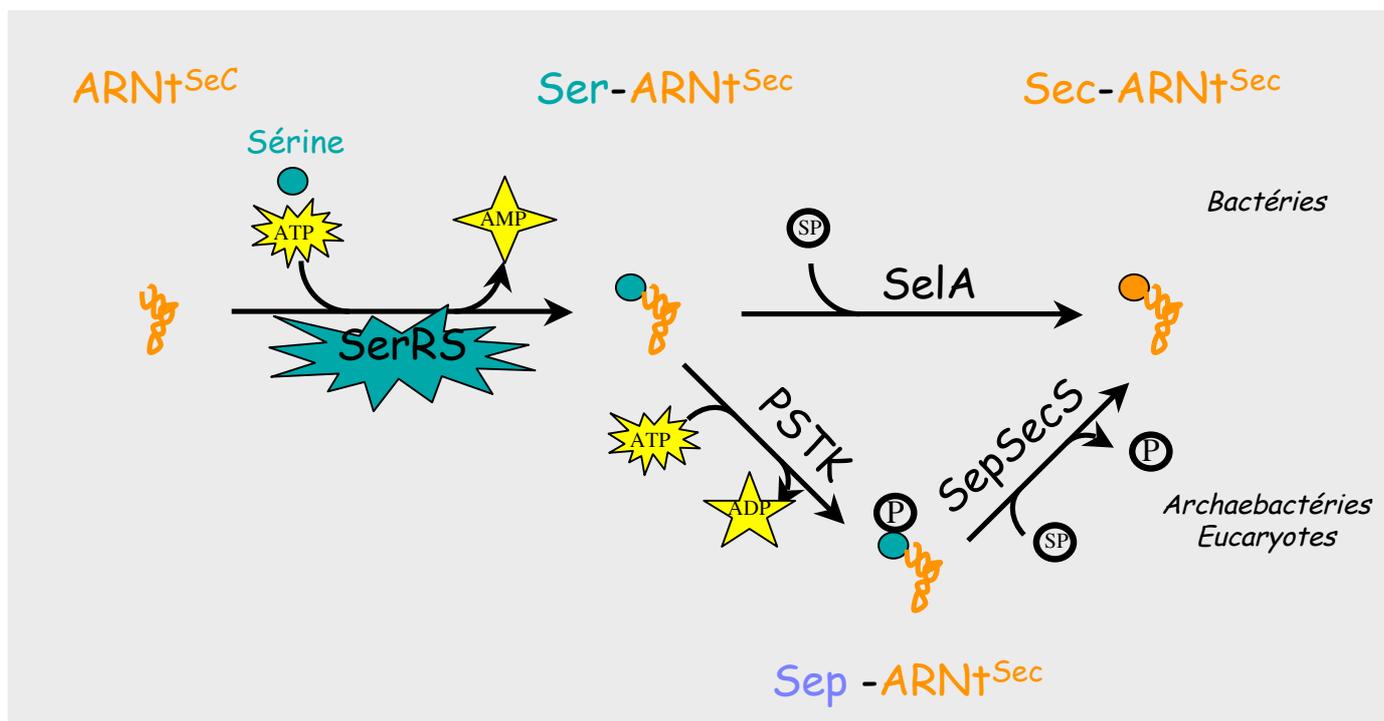
Des études de modélisation suggèrent également la présence de ce complexe entre GluRS-ND, ARNt<sup>Gln</sup> et Glu-AdT (GatCAB ou GatDE) (Oshikane et al., 2006). Il n'a cependant pas encore été isolé.



**Figure 26:** Représentation schématique de la synthèse du Cys-ARNt<sup>Cys</sup>.

(D'après Sheppard *et al.*, 2008)

Avec SepRS: O-phosphoséryl-ARNt synthétase, SepCysS: Sep-ARNt:Cys-ARNt synthétase.



**Figure 27:** Représentation schématique de la synthèse du Sec-ARNt<sup>Sec</sup>.

(D'après Sheppard *et al.*, 2008)

SerRS: seryl-ARNt synthétase, SepSecS: Sep-ARNt:Cec-ARNt synthétase, PSTK: phosphoséryl-ARNt kinase

## D-AUTRE VOIES INDIRECTES

L'absence de GlnRS ou d'AsnRS oblige un certain nombre d'organismes à utiliser une voie indirecte pour la formation des Gln-ARNt<sup>Gln</sup> et Asn-ARNt<sup>Asn</sup>. Mais ces deux aaRS ne sont pas les seules manquantes :

### 1. Aminoacylation de l'ARNt Cystéine

Des analyses biochimiques et génétiques révèlent qu'un certain nombre de bactéries méthanogènes ne possèdent pas de cystéinyl-ARNt synthétase (CysRS).

Dans ces bactéries, la synthèse du Cys-ARNt<sup>Cys</sup> s'effectue donc en deux étapes (**Figure 26**) : une O-phosphoséryl-ARNt synthétase (SepRS) charge sur l'ARNt<sup>Cys</sup> le O-phosphosérine (Sep), précurseur de la cystéine. Puis l'intermédiaire est converti au cours d'une deuxième étape en Cys-ARNt<sup>Cys</sup> grâce à une Sep-ARNt:Cys-ARNt synthétase (SepCysS) (Sauerwald et al., 2005).

### 2. Aminoacylation de l'ARNt Sélénocystéine

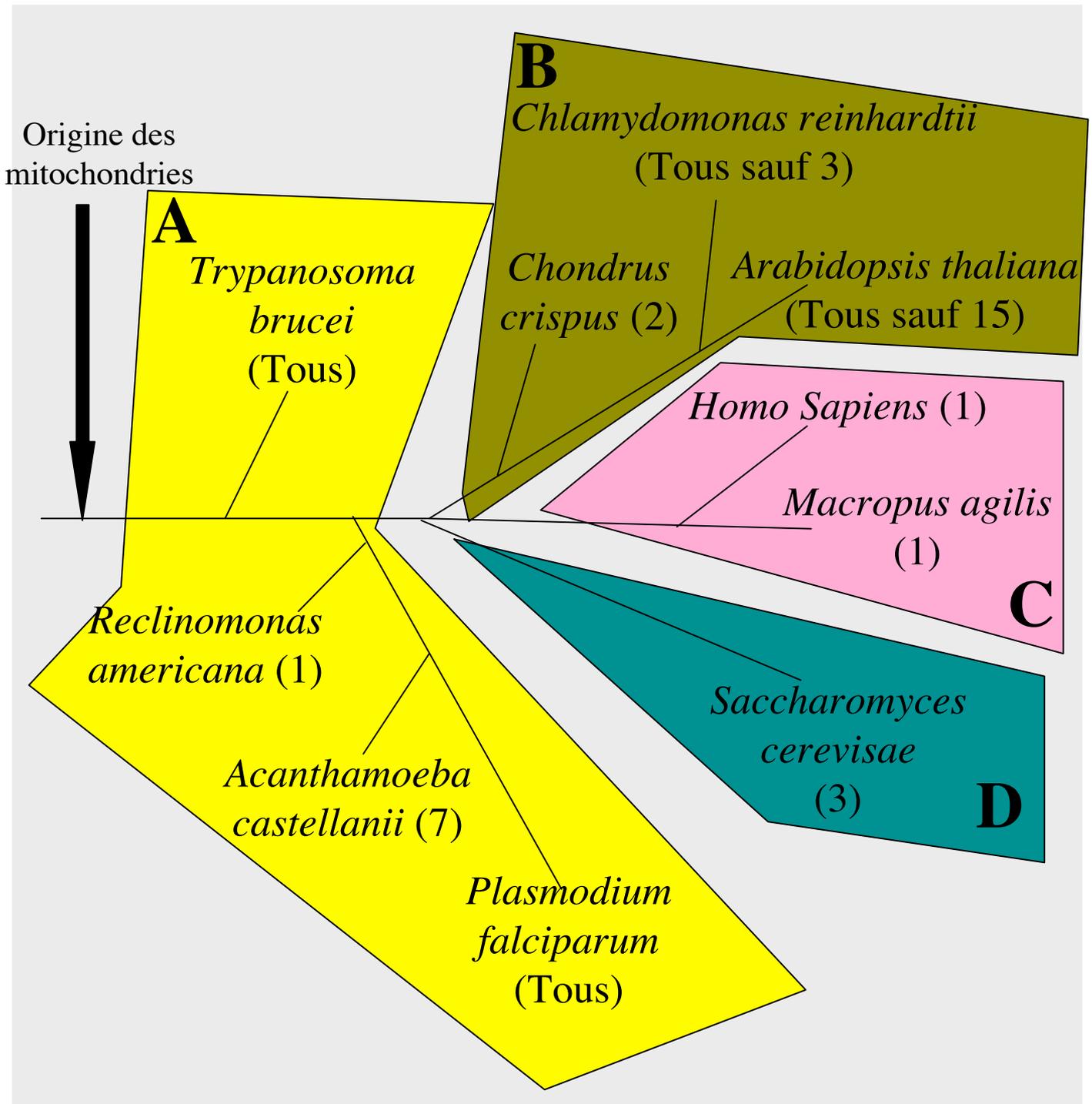
La synthèse du Sec-ARNt<sup>Sec</sup> se fait également de façon indirecte :

La liaison du Sec-ARNt<sup>Sec</sup> au niveau du codon stop UGA permet l'incorporation du 21<sup>ème</sup> acide aminé, la Sélénocystéine (Sec). Elle a lieu dans les trois règnes (bactéries, archaebactéries et eucaryotes) et à ce jour aucune SecRS n'a été identifiée. La synthèse du Sec-ARNt<sup>Sec</sup> se fait donc en deux étapes (**Figure 27**) :

Au cours de la première étape une séryl-ARNt synthétase (SerRS) intervient pour former le Ser-ARNt<sup>Sec</sup>. La deuxième étape qui permet la conversion de cet aa-ARNt en Sec-ARNt<sup>Sec</sup> diverge en fonction des organismes : conversion directe grâce à une Sélénocystéine synthase (SelA) dans les bactéries ; intervention de deux enzymes, phosphoséryl-ARNt kinase (PSTK) et Sep-ARNt:Sec-ARNt synthase (SepSecS) dans les archaebactéries et les eucaryotes (Xu et al., 2007).



**Chapitre III**  
**Importation des**  
**macromolécules dans les**  
**mitochondries et les**  
**chloroplastes**



**Figure 28:** Quelques exemples d'organismes important des ARNt dans leurs mitochondries. Avec les protozoaires (A), les plantes (B), les animaux (C) et les champignons (D). Le nombre indiqué entre parenthèses correspond au nombre d'ARNt importés.

Adapté de (Entelis et al., 2001)

Génomomes mitochondriaux et chloroplastiques ne possèdent aujourd'hui qu'un nombre limité de gènes. Ainsi, la majorité des macromolécules nécessaires à leur fonctionnement sont codés par le noyau et importés secondairement dans les organelles. L'importation d'ARN et de protéines a donc été étudiée et en partie décrite dans différents organismes :

## 1.IMPORTATION DES ACIDES NUCLEIQUES

### A-DANS LES MITOCHONDRIES

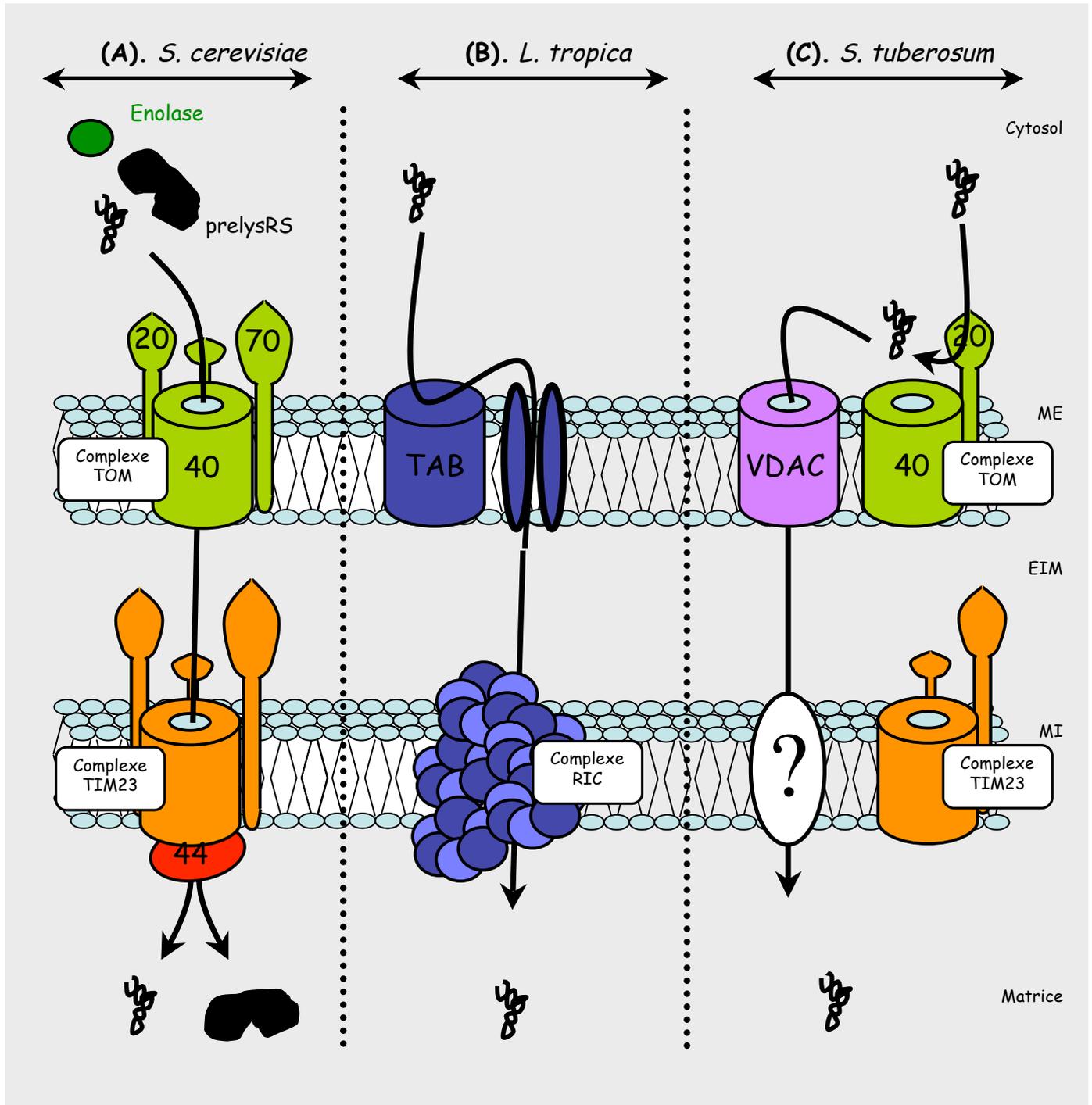
L'importation d'ARN est un processus quasi universel que l'on retrouve à la fois dans les mitochondries de protozoaires, de champignons, d'animaux et de plantes. Ce mécanisme est très peu compris. Il semble différer d'un organisme à l'autre, ce qui suggère que son apparition s'est faite plusieurs fois au cours de l'évolution et ceci de façon indépendante. Cette importation concerne majoritairement les ARNt. On retrouve cependant d'autres petits ARN non codants codés par le noyau et importés dans les mitochondries : ARN 5S, RNaseP et constituant ARN de la nucléase MRP.

#### 1.Importation des ARNt

Toutes les situations peuvent être observées concernant l'importation des ARNt dans les mitochondries, des mitochondries humaines qui n'importent qu'un ARNt (Rubio et al., 2008), aux mitochondries de Trypanosome ou de Leishmania qui importent tous les ARNt, en passant par tous les intermédiaires, comme par exemple *Beta vulgaris*, dont le génome mitochondrial ne code que pour neuf ARNt (**Figure 28**).

L'ensemble des plantes importe des ARNt dans leurs mitochondries. Cependant le nombre varie d'une espèce à l'autre: de trois chez *Marchantia polymorpha*, à la quasi-totalité chez *C. reinhardtii*. Les choses sont d'autant plus complexes qu'un ARNt donné sera importé ou non en fonction des espèces. On peut citer l'exemple du gène mitochondrial codant pour l'ARNt<sup>Phe</sup>: présent au sein du génome de *Solanum tuberosum*, il est absent du génome d'*Arabidopsis thaliana*. L'ARNt<sup>Phe</sup> présent dans les mitochondries d'*Arabidopsis thaliana* correspond donc au produit du gène nucléaire, importé depuis le cytosol (Salinas et al., 2008).

#### 1.a - Importation des ARNt dans les mitochondries de levure :



**Figure 29:** Importation des ARNt dans les mitochondries, avec trois voies possibles, dans les mitochondries de *S. cerevisiae* (A), de *L. tropica* (B) ou de *S. tuberosum* (C). Adapté de (Salinas *et al.*, 2008)

(Avec **TAB**: Tubulin Antisense Binding, **VDAC**: Voltage-Dependant Anion Channel, **RIC**: RNA Import Complex, **TOM/TIM**: Translocator of the Outer/Inner Membrane, **ME**: Membrane Externe, **EIM**: Espace Inter Membranaire, **MI**: Membrane Interne)

Chez *S. cerevisiae*, deux ARNt sont importés (ARNt<sup>Lys</sup> et ARNt<sup>Gln</sup>).

En fonction de l'ARNt importé, les mécanismes utilisés pour l'importation sont différents : la translocation de l'ARNt<sup>Lys</sup> se fait *via* le complexe d'importation des protéines (cf. III.2.B.1) et nécessite l'intervention de trois facteurs cytosoliques (Entelis et al., 2006) : la lysyl-ARNt synthétase cytosolique, qui va aminoacyler l'ARNt avant son importation, l'énolase qui achemine l'ARNt jusqu'à la surface mitochondriale et enfin, le précurseur de la lysyl-ARNt synthétase mitochondriale, qui va permettre le co-transport du complexe au travers de la membrane (**Figure 29A**). L'interaction entre ARNt et les facteurs cytosoliques est très spécifique. Elle se fait une fois l'ARNt aminoacylé et dépend de la structure tridimensionnelle de l'ARNt et de trois positions (position 34, base discriminante 73 et première paire de base G1 :C72) (Entelis et al., 2001b).

L'importation de l'ARNt<sup>Gln</sup> n'a pas pour l'instant fait l'objet d'études poussées, mais il semble qu'aucun facteur cytosolique ne soit requis pour l'importation de cet ARNt (Rinehart et al., 2005).

### **1.b - Importation des ARNt dans les mitochondries de protozoaires :**

Un modèle d'importation assez complet a été proposé chez *Leishmania* (Adhya, 2007). Composé de deux complexes, il ne fait intervenir aucun facteur cytosolique (**Figure 29B**). Le premier complexe est situé sur la membrane externe. Un de ces constituants principal est le récepteur TAB (« Tubulin antisense binding ») impliqué dans la fixation des ARNt. Le deuxième complexe de 640 kDa est appelé RIC (« RNA Import Complex »). Composé de 11 sous-unités majeures, dont 4 présentent des homologies avec les sous-unités des complexes respiratoires, il permet l'importation des ARNt au travers de la membrane interne. Enfin, des études réalisées par l'équipe d'A. Schneider sur *Trypanosoma brucei* (Bouzaidi-Tiali et al., 2007) indiquent que l'interaction entre la paire de base (51 :63) de la boucle T et le facteur d'élongation eEF1 soit essentielle à l'importation des ARNt dans les mitochondries.

### **1.c - Importation des ARNt dans les mitochondries de plantes :**

Bien que les informations disponibles soient limitées, il semble qu'ARNt et protéines partagent certains éléments (**Figure 29C**). En effet, des approches *in vitro* réalisées au laboratoire ont permis de montrer que les protéines TOM20 et TOM40, impliquées dans l'importation des protéines (cf. III.2.B.1), intervenaient également dans l'étape de reconnaissance des ARNt. La translocation au travers de la membrane externe est ensuite assurée par la protéine VDAC (« Voltage-Dependant Anion Channel ») (Salinas et al., 2006).



Quant à l'élucidation du mécanisme d'importation des ARNt au travers de la membrane interne, tout reste à faire: si des travaux ont montré l'interaction entre ARNt et le transporteur ADP/ATP (ANT), ce dernier ne semble toutefois pas impliqué dans le phénomène d'importation. De même des expériences de compétition *in vitro* écartent l'implication des constituants de la voie de transport des protéines (complexe TIM cf. III.2.B.1) dans la translocation des ARNt au travers de la membrane interne (communication personnelle).

Pour ce qui est de la spécificité de l'importation, la construction d'ARNt chimériques a permis de mettre en évidence les déterminants d'importation majeurs portés par les ARNt de plantes. Au sein des mitochondries, ils sont principalement localisés dans la boucle D, la boucle anticodon et le bras accepteur de l'ARNt à importer. Enfin des études réalisées *in vivo* suggèrent que bien qu'elles ne soient pas suffisantes, les aaRS sont indispensables à l'importation des ARNt au sein des mitochondries (Delage et al., 2003).

## 2. Importation des autres ARN

L'ARN 5S est importé de façon massive dans les mitochondries humaines. Son rôle reste pour l'instant indéfini puisqu'il n'a pas été détecté dans les préparations de ribosomes mitochondriaux (Smirnov et al., 2008).

L'importation dans les mitochondries humaines de deux autres ARN est également envisagée : les composants ribonucléiques de la MRP et de la RNaseP. Cependant, à l'heure actuelle aucune donnée concernant les mécanismes d'importation de ces ARN n'est disponible (Entelis et al., 2001b).

## 3.Importation d'ADN

L'importation *in vivo* d'ADN dans les mitochondries n'a pas, à ce jour été mis en évidence. Cependant différents travaux sont en cours et des études *in vitro* ont permis l'importation au sein des mitochondries animales d'ADN fonctionnel, capable d'être utilisé comme matrice au cours de l'étape de transcription (Koulintchenko et al., 2006). Le mécanisme responsable de l'importation n'est pas entièrement décrit, mais il semble qu'un complexe comprenant au niveau de la membrane externe la protéine VDAC (« Voltage-Dependant Anion Channel ») et l'ANT (« Adenine Nucleotide Translocator ») au niveau de la membrane interne soit impliqué (Koulintchenko, 2004).

## B-DANS LES CHLOROPLASTES



## 1.Importation des ARNt

De façon générale, les génomes chloroplastiques des plantes supérieures codent pour une trentaine d'ARNt différents. Ce nombre est suffisant pour permettre la synthèse protéique. L'importation des ARNt cytosoliques ne semble donc pas nécessaire au décodage de l'information génétique.

Néanmoins, trois aa (CKG) ne possèdent aucun ARNt correspondant dans l'angiosperme non photosynthétique *Epifagus virginiana* (Morden et al., 1991) et l'absence de gènes codant pour des ARNt chloroplastiques a également été rapportée dans d'autres parasites (Stefanovic and Olmstead, 2005). Le nombre d'ARNt n'est donc *a priori* pas suffisant dans ces organismes pour assurer la synthèse protéique dans les chloroplastes. Ainsi, bien qu'aucun exemple n'ait été rapporté, l'importation des ARNt du cytosol vers les chloroplastes reste à envisager.

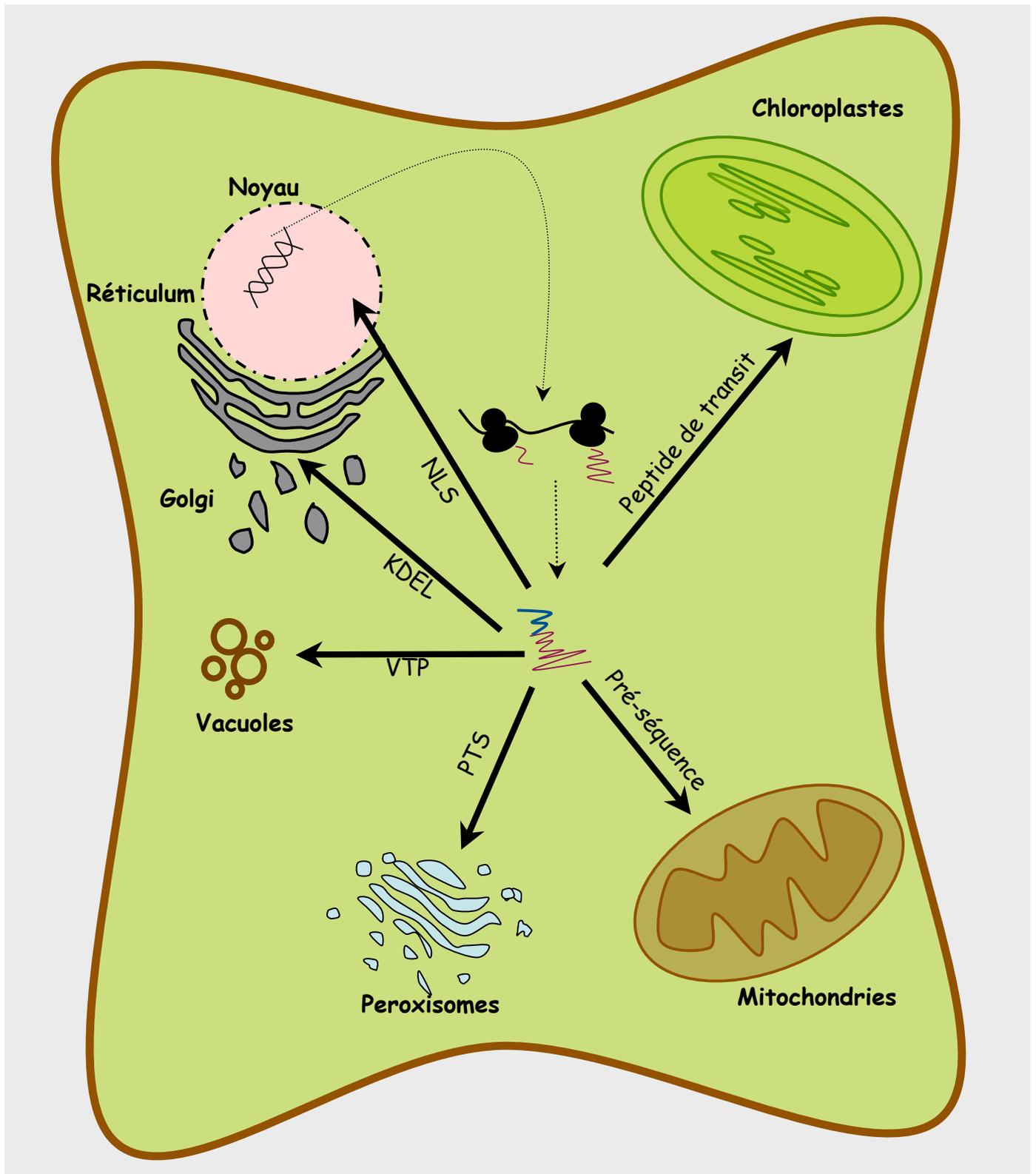
## 2.Importation des ARNm

En plus de l'importation d'ARN de viroïdes dans les chloroplastes (Rodio et al., 2007), l'exemple d'importation d'un ARNm codé par le génome nucléaire a été récemment mis en évidence (Nicolai et al., 2007) : le messenger codant pour le facteur de traduction eIF4E a été détecté dans les chloroplastes de quatre espèces de plantes différentes. Le rôle de ce messenger reste cependant incertain, puisque la protéine correspondante n'a pas été détectée au sein des organites.

## 2.IMPORTATION DES PROTEINES

Au cours de l'évolution, la majorité des gènes initialement présent dans les génomes mitochondriaux ou chloroplastiques ont été perdus ou transférés vers le noyau (cf. I.3). Ainsi, plus de 98% des protéines nécessaires au fonctionnement des deux organites sont aujourd'hui codées par le génome nucléaire, synthétisées dans le cytosol, puis importées *via* des systèmes d'importation spécifiques. Ce système comprend des **signaux** qui dirige le précurseur vers un **système de reconnaissance et de translocation**, spécifique à chaque organite.

## A-LES ELEMENTS REQUIS POUR L'IMPORTATION : LES SEQUENCES D'ADRESSAGE



**Figure 30:** Exemples de voies suivies par une protéine synthétisée dans le cytosol à partir de l'information génétique contenue dans le noyau.

(Avec VTP: Vacuolar Targeting Peptide, PTS: Peroxisome Targeting Signal, NLS: Nuclear Localization Signal)

Toutes les protéines, à l'exception de celles qui restent dans les compartiments où elles sont synthétisées, contiennent une ou plusieurs séquences d'adressage, permettant de diriger les protéines vers un compartiment cellulaire donné (**Figure 30**).

Leur nom dépend de l'organite vers lequel la protéine est adressée : peptide signal pour les protéines du reticulum endoplasmique, peptide de transit ou pré-séquence pour les protéines respectivement destinées aux chloroplastes ou mitochondries, signal de localisation nucléaire (NLS), signal d'adressage vers les peroxysomes (« Peroxisome Targeting Signal »), ou les vacuoles (« Vacuolaire Sorting Signal »).

Ces séquences sont souvent localisées dans la partie N-terminale des protéines. Elles peuvent également se situer dans la partie interne ou C-terminale des protéines.

Ces séquences d'adressage peuvent prendre plusieurs formes mais dans la plupart des cas ce sont de petits peptides, comme pour les séquences d'adressage mitochondriales ou chloroplastiques. Elles peuvent également correspondre à des motifs d'acides aminés caractéristiques : séquences KDEL des protéines destinées au réticulum, séquences SKL des protéines destinées aux peroxysomes... Enfin, pour les lysosomes, ce sont des glycanes qui permettent l'adressage des pré-protéines, grâce au motif mannose-6-phosphate.

Nous nous sommes tout particulièrement intéressés aux séquences qui permettent l'adressage des protéines vers les mitochondries ou vers les chloroplastes.

## 1. Séquences d'adressage pour les protéines destinées aux mitochondries : pré-séquences

Les protéines destinées à être importées dans la matrice mitochondriale possèdent pour la plupart une séquence d'adressage ou pré-séquences (**Table 6**) localisée à l'extrémité N-terminale de la protéine qui sera éliminée après l'importation par une MPP (« Mitochondrial Processing Peptidase ») (cf. III.2.C).

Chez les plantes, ces séquences ont une longueur moyenne de 42 aa (de 13 à 85 aa), soit 9 résidus de plus que les séquences que l'on retrouve chez les animaux (33 aa), les levures (32 aa) ou *N. crassa* (33 aa) (Schneider et al., 1998), (Sjoling and Glaser, 1998).

Avec un contenu élevé en résidus hydrophobes et hydroxylés, faible en résidus acides et aromatiques, la composition en aa des pré-séquences végétales est similaire à celle que l'on retrouve dans les autres organismes. La seule exception concerne le résidu sérine, plus abondant dans les plantes qu'au sein des autres organismes (17% pour les plantes, 10% pour *N. crassa*, 7% chez les levures et 3% chez les hommes). Enfin, les nombreux résidus chargés

	Pré-séquence Mitochondriale	Peptide de transit Chloroplastique
longueur	18 à 107 aa Moyenne: 42 aa	13 à 146 aa Moyenne: 58 aa
Composition en acides aminés	<b>Riches</b> résidus hydrophobes (Ala, Leu, Phe) résidus hydroxylés (Ser, Thr)	
	<b>Pauvres</b> résidus acides résidus aromatiques	
	<b>Riches</b> résidus chargés positivement (Arg)	<b>Riches</b> résidus hydroxylés (Ser, Thr)
Structure	Hélice- $\alpha$ amphiphile	Peu structuré

**Table 6:** Caractéristiques des séquences d'adressage mitochondriales et chloroplastiques

positivement et hydroxylés ont, dans la plupart des cas, la capacité de former une hélice  $\alpha$  amphiphile, supposée interagir de façon spécifique avec les récepteurs situés à la surface des membranes mitochondriales (Zhang and Glaser, 2002).

## 2.Séquences d'adressage pour les protéines destinées aux chloroplastes : peptides de transit

Comme pour les protéines destinées à la matrice mitochondriale, une partie des protéines destinées au stroma des chloroplastes possèdent dans leur extrémité N-terminale une séquence d'adressage, ou peptide de transit (**Table 6**), éliminé par une SPP (« Stromal Processing Peptidase ») (cf. III.2.C) après l'importation.

Plus longues que les pré-séquences, leurs tailles varient entre 15 et 120 résidus avec une moyenne de 58 aa (Zhang and Glaser, 2002). Bien que leurs compositions en aa soient relativement similaires à celle des séquences d'adressage mitochondriales (riches en résidus hydroxylés et hydrophobes, pauvres en résidus acides), elles sont moins structurées et ne présentent potentiellement que quelques hélices  $\alpha$ . La différence majeure par rapport aux pré-séquences porte sur l'interaction entre certains peptides de transit et les protéines 14-3-3 : les nombreux résidus hydroxylés des séquences d'adressage chloroplastiques sont phosphorylées et reconnues par les protéines 14-3-3, protéines chaperonnes de 30 kDa, qui interagissent ensuite avec les chaperonnes Hsp70 (« Heat Shock Protein ») pour former un complexe qui guide le précurseur vers l'enveloppe externe des chloroplastes (May and Soll, 2000).

## 3.Les logiciels de prédiction

Il existe un certain nombre de logiciels disponibles sur Internet qui permettent de prédire la localisation cellulaire des protéines. En voici quelques exemples :

MitoProt (Claros and Vincens, 1996) : c'est un logiciel dédié à l'étude des protéines mitochondriales. Il est basé sur la reconnaissance des caractéristiques propres aux séquences d'adressage mitochondriales. Il prend également en compte le caractère hydrophobe des protéines, de façon à estimer leur potentiel d'importation au travers des membranes.

TargetP (Emanuelsson et al., 2000) : par l'identification d'une séquence N-terminale, ce logiciel permet de prédire, en plus du site potentiel de clivage, la localisation au sein de la voie de sécrétion, dans les mitochondries ou dans les chloroplastes d'une protéine. Il utilise entre autres deux logiciels neuronaux préexistants : ChloroP et SignalP.



Predotar v. 1.03 (Small et al., 2004) : c'est un logiciel qui permet la prédiction d'un adressage vers les mitochondries, les chloroplastes ou le réticulum. Ce logiciel est basé sur des réseaux neuronaux : les règles de reconnaissance des séquences d'adressage ne sont pas préétablies, mais elles se basent uniquement sur un lot de séquences d'adressage effectivement adressées aux mitochondries, aux chloroplastes ou au réticulum.

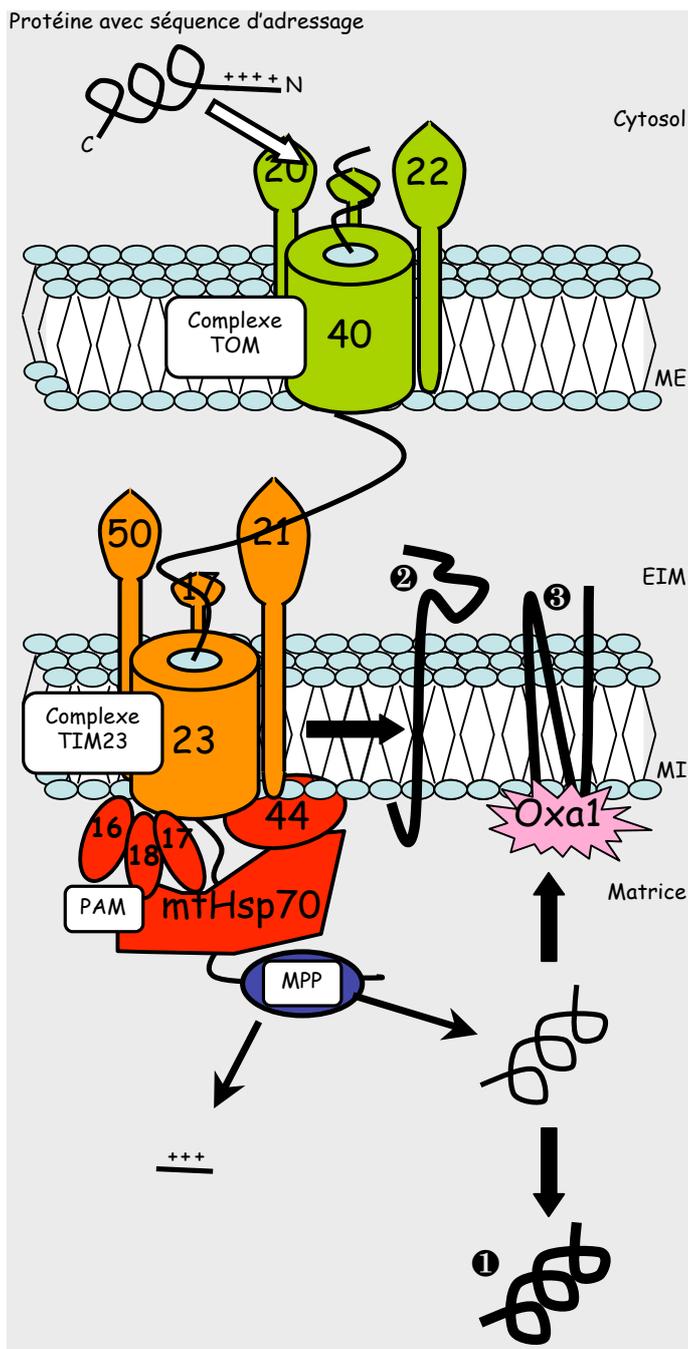
Aujourd'hui, en plus des logiciels basés sur les réseaux neuronaux (« Neuronal Network »), un nouveau type de logiciels apparaît, basé sur des machines à vecteur de support (« Support Vector Machine »), idéal pour travailler avec des données de grandes dimensions (Emanuelsson et al., 2007). On peut citer LOctree (Nair and Rost, 2005), BaCelLo (Pierleoni et al., 2006) ou CELLO (Yu et al., 2006), trois nouveaux logiciels dont les prédictions sont basées uniquement sur les SVM.

## **B-SYSTEME DE RECONNAISSANCE ET DE TRANSLOCATION**

La plupart des protéines mitochondriales ou chloroplastiques sont synthétisées dans le cytosol à partir du génome nucléaire. Leur passage au travers du cytosol est une étape critique : c'est à ce niveau que vont intervenir les protéines chaperonnes qui vont conduire les protéines vers leurs destinations finales en les maintenant dans un état dénaturé, conformation nécessaire au passage dans le système d'importation. On retrouve de nombreuses Hsp70 cytosoliques qui vont prévenir l'agrégation des précurseurs dans le cytosol. Sur les peptides de transit des sites de liaison spécifique permettent l'interaction des précurseurs chloroplastiques avec les chaperonnes 14-3-3, guidant le complexe ainsi formé jusqu'à la surface des chloroplastes. Enfin, on retrouve également des protéines de la famille des Hsp70 dans les mitochondries et les chloroplastes (Zhang and Glaser, 2002).

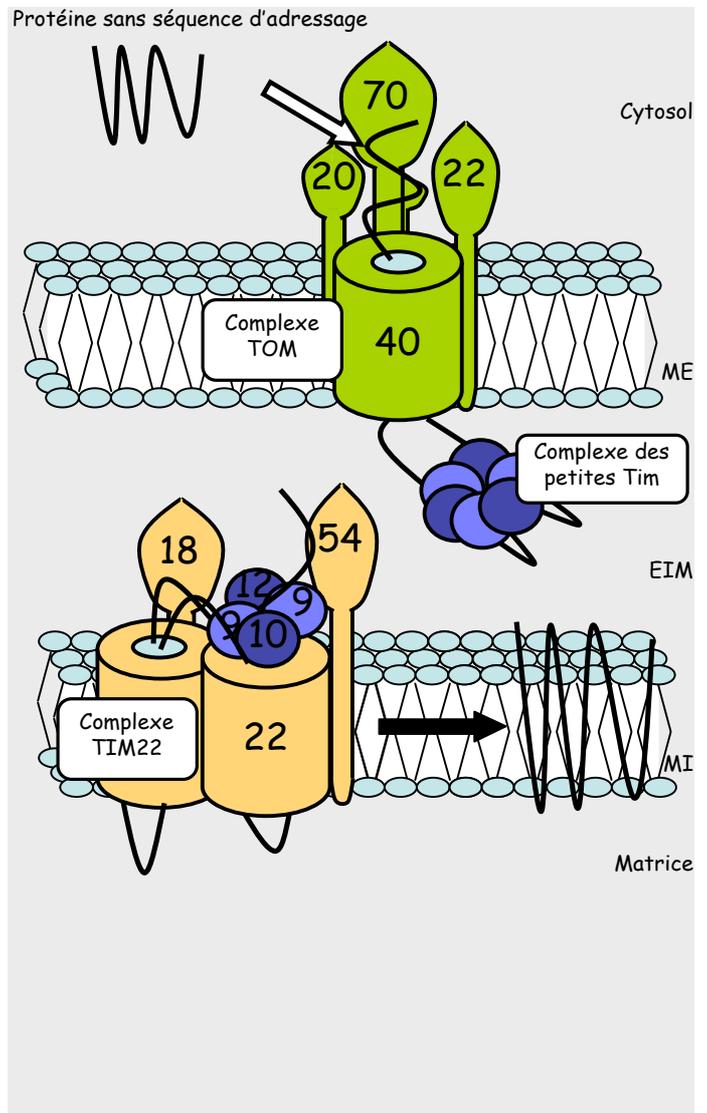
### **1.Importation dans les mitochondries**

Le canal d'importation des protéines dans les mitochondries est composé de deux complexes : le complexe TOM (« Translocase of the Outer Mitochondrial membrane ») localisé au niveau de la membrane externe et le complexe TIM (« Translocase of the Inner Mitochondrial membrane ») localisé au niveau de la membrane interne. Le mécanisme d'importation des protéines va dépendre de la destination finale de celle-ci.



**Figure 31:** Importation des protéines possédant une séquence d'adressage dans la partie N-terminale, destinées à la matrice et à la membrane interne.  
Adapté de (Neupert *et al.*, 2007)

(Avec **mtHsp70**: Mitochondrial 70 Kda Heat shock protein, **Oxa1**: Oxidase assembly 1, **PAM**: ATP-driven Import Motor, **MPP**: Mitochondrial Processing Peptidase, **ME**: Membrane Externe, **EIM**: Espace Inter Membranaire, **MI**: Membrane Interne)



**Figure 32:** Importation des protéines sans séquence d'adressage dans la partie N-terminale, destinées à la membrane interne.  
Adapté de (Neupert *et al.*, 2007)

(Avec **ME**: Membrane Externe, **EIM**: Espace Inter Membranaire, **MI**: Membrane Interne)

### 1.a - Importation dans les mitochondries de *S. cerevisiae* (Bolender et al., 2008) (Dolezal et al., 2006) (Wiedemann et al., 2004)

*S. cerevisiae* est utilisé comme organisme modèle pour l'analyse des complexes d'importation des protéines. Quatre voies d'importation sont aujourd'hui bien définies.

#### - Protéines destinées à la matrice et à la membrane interne.

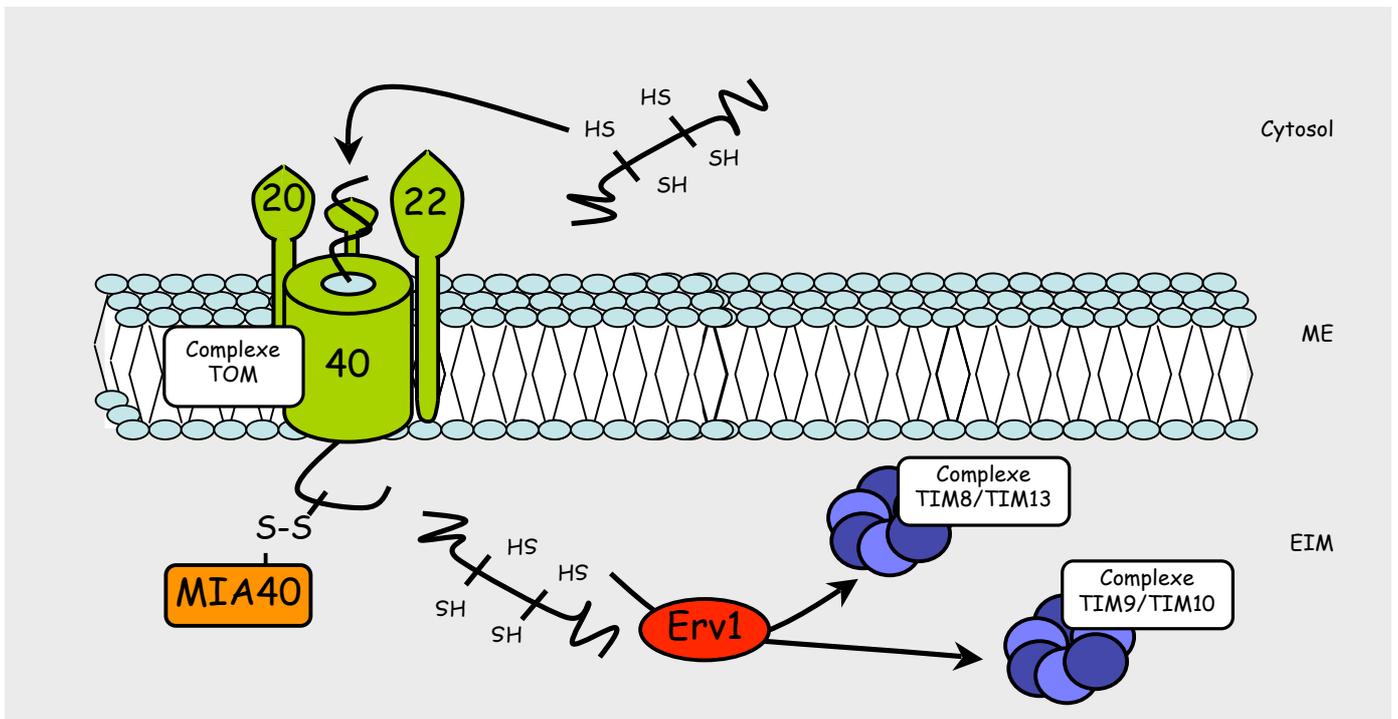
La plupart des protéines destinées à ces compartiments sont synthétisées dans le cytosol avec une séquence d'adressage caractéristique dans la partie N-terminale (cf. III.2.A) (**Figure 31**).

La partie N-terminale de cette séquence est tout d'abord reconnue par les premières protéines impliquées dans la translocation: TOM20 et TOM22. La préprotéine est ensuite transportée vers TOM40, un des constituant essentiel du GIP (Général Import Protein). Il permet la translocation du précurseur jusqu'à l'espace inter-membranaire, où les domaines hydrophiles de TIM50 et TIM21 permettent le transfert de la préprotéine jusqu'au complexe de translocation situé au niveau de la membrane interne des mitochondries : TIM23. Il permet la translocation de la protéine au travers de la membrane interne. En plus de TIM50 et de TIM21, il est constitué de sous-unités régulatrices, TIM17 et de TIM23 qui forment le canal. Le transport est assuré par deux sources énergétiques : d'une part le potentiel transmembranaire qui exerce une force électrochimique et d'autre part l'ATP qui associé aux protéines mtHSP70, TIM44, GrpE, Pam17, Pam18 et Pam16 forment le complexe PAM (« ATP-driven import moteur »). Ce complexe piège le précurseur et l'entraîne dans la matrice. Une fois ce compartiment atteint, la séquence d'adressage est clivée une MPP (« Mitochondrial Processing Peptidase ») (Gakh et al., 2002) et la protéine mature est libérée (**Figure 31.1**).

On note que deux autres types de protéines avec une séquence d'adressage N-terminale utilisent également la voie des complexes TOM/TIM23.

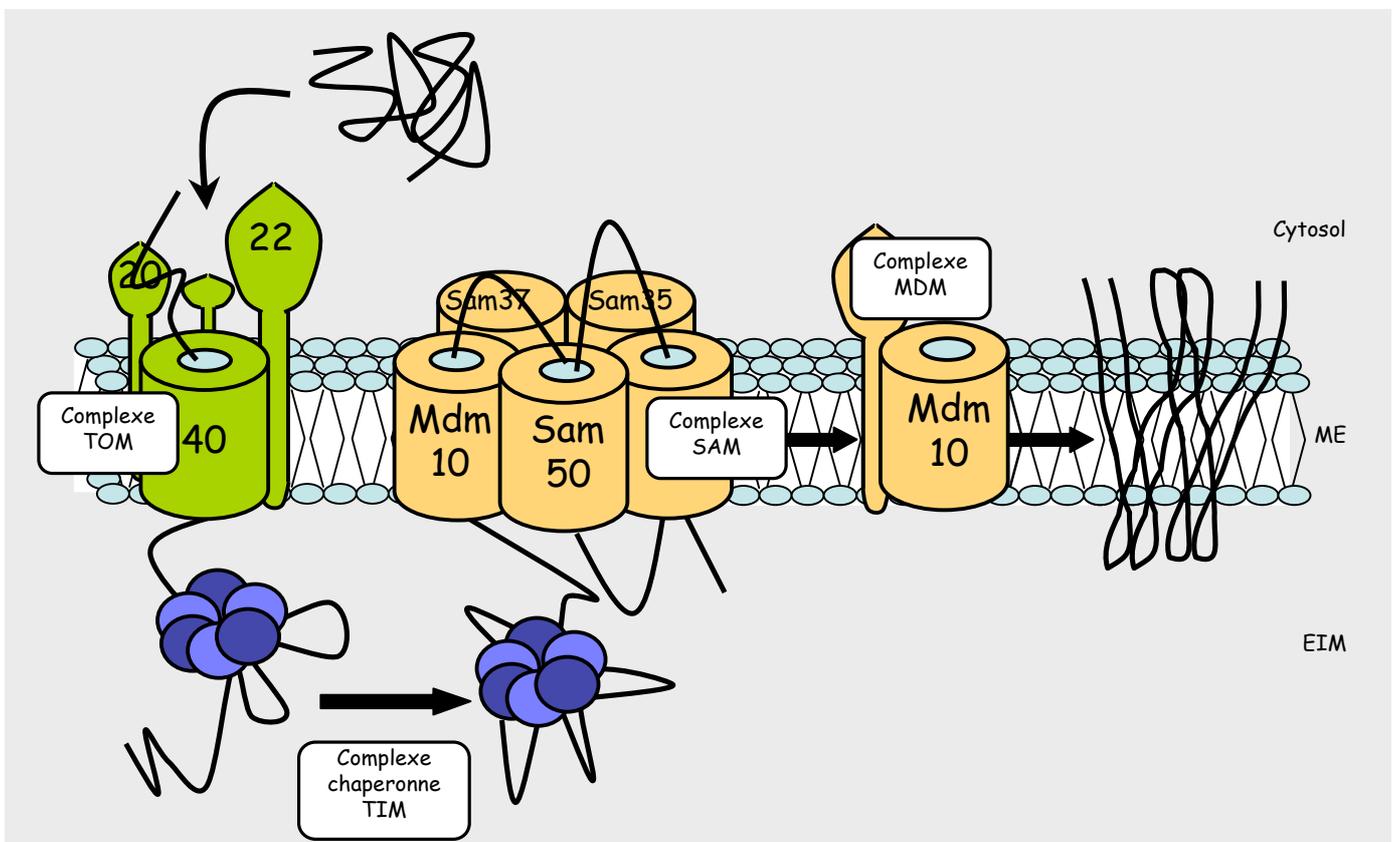
Dans un cas, elles possèdent en plus de la séquence d'adressage un signal interne de sortie qui arrête la translocation au niveau de la membrane interne et induit un transfert latéral des protéines dans la phase lipidique (**Figure 31.2**).

Dans le second cas, les protéines sont constituées de domaines transmembranaires. Amenées jusqu'à la matrice mitochondriale, les pré-séquences sont clivées et les protéines matures sont prises en charge par le complexe oxa1 qui permet leur insertion dans la membrane interne (**Figure 31.3**) (Yi and Dalbey, 2005).



**Figure 33:** Importation des protéines destinées à l'espace intermembranaire.  
Adapté de (Neupert *et al.*, 2007)

(Avec **MIA 40**: Mitochondrial Intermembrane space import and Assembly, **Erv1**: Endogenous Retroviral sequence 1, **ME**: Membrane Externe, **EIM**: Espace Inter Membranaire)



**Figure 34:** Importation des protéines destinées à la matrice et à la membrane externe.  
Adapté de (Neupert *et al.*, 2007)

(Avec **SAM**: Sorting and Assembly Machinery, **Mdm**: Mitochondrial Distribution and Morphology, **ME**: Membrane Externe, **EIM**: Espace Inter Membranaire)

### Protéines destinées à la membrane interne sans séquence d'adressage (Figure 32)

Ce système est utilisé par les protéines de la membrane interne sans séquence d'adressage N-terminale qui contiennent de nombreux domaines transmembranaires, comme les transporteurs de phosphate, ou les transporteurs d'ATP. Un signal est localisé dans la partie interne de la protéine. Il guide le précurseur vers le récepteur TOM70 situé à la surface des membranes externes des mitochondries. Les protéines suivent ensuite la voie classique d'importation. Puis, au niveau de l'espace intermembranaire, elles sont prises en charge par un complexe de petites protéines chaperones formé par TOM9/10 et TIM8/13, avant d'être transmises au complexe TIM22. Ce complexe est constitué de trois protéines membranaires, TIM22, TIM54 et TIM18, associées aux petites protéines TIM9, TIM10 et TIM12. Ce complexe, associé au potentiel membranaire permet l'insertion du précurseur dans la membrane interne.

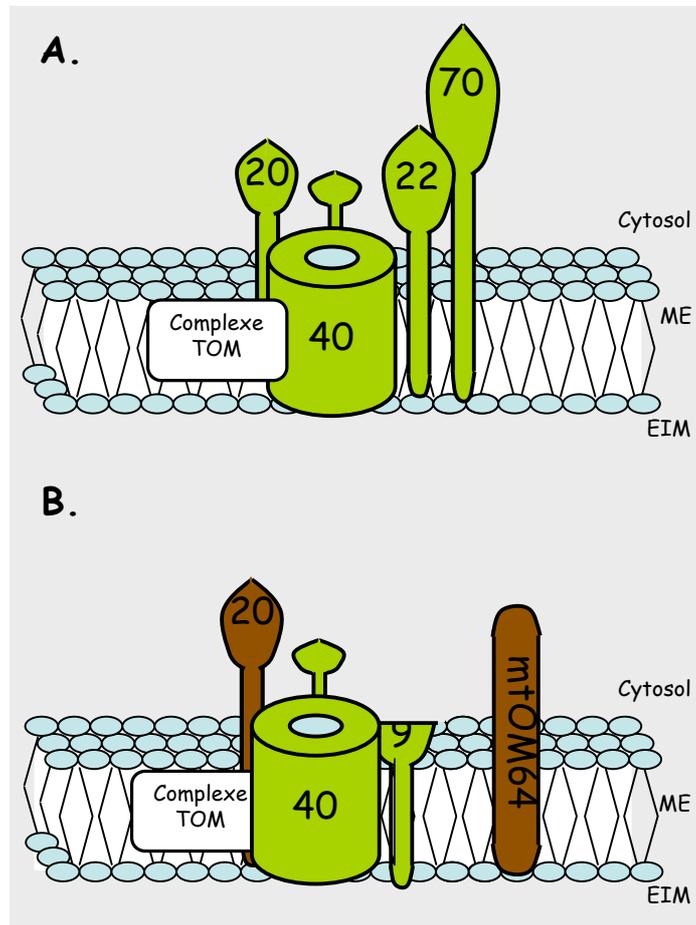
#### - Protéines destinées à l'espace inter membranaire (Figure 33)

L'espace inter membranaire contient de nombreuses protéines riches en cystéines dont la masse moléculaire est inférieure à 20 KDa (TIM9, TIM10...).

Un complexe d'importation qui leur est spécifique, le MIA (« Mitochondrial Intermembrane space import and Assembly ») a été identifié (Stojanovski et al., 2008). Ainsi, après leur diffusion au travers du complexe TOM, les précurseurs se lient au constituant majeur de MIA, MIA40. Son association avec Erv1 permet l'oxydation du précurseur protéique et l'assemblage des protéines sous forme oligomérique.

#### - Protéines destinées à la membrane externe (Figure 34)

Le dernier système est consacré aux protéines de la membrane externe souvent riches en tonneaux  $\beta$  (porine, TOM40, Mdm10). Comme pour les précédents exemples, l'insertion initiale se fait *via* les récepteurs TOM20 et TOM22 du complexe TOM. Arrivé dans l'espace inter membranaire, le précurseur protéique est pris en charge par les complexes formés par les chaperones TIM9/TIM10 et TIM8/TIM13. Ils guident le précurseur jusqu'à un autre complexe situé dans la membrane externe, le complexe SAM (« Sorting and Assembly Machinery »), qui permet l'insertion de la protéine dans la membrane externe, grâce notamment à son constituant principal : Sam50. D'autres partenaires protéiques (Sam35, Sam37 et Mdm10) interviennent également au cours de cette étape et de l'assemblage du précurseur en une protéine fonctionnelle (Becker et al., 2008).



**Figure 35:** Représentation schématique du complexe TOM (A) dans les mitochondries de levure et (B) dans la mitochondries végétales.

Adapté de (Schneider *et al.*, 2007)

(Avec **mtOM64**: Outer Mitochondrial Membrane protein of 64 Kda,  
**ME**: Membrane Externe, **EIM**: Espace Inter Membranaire)

## 1.b - Importation dans les mitochondries de plante

La plupart des études portant sur l'analyse du mécanisme d'importation des protéines mitochondriales a été faite chez la levure *S. cerevisiae*. Les systèmes d'importation chez les champignons, les animaux et les plantes sont considérés comme similaires. En effet, différents composés sont exprimés de façon ubiquitaire dans les trois règnes, comme par exemple les sous-unités du complexe SAM (Baker et al., 2007), ou la protéine majoritaire du complexe MIA, Mia40 (Stojanovski et al., 2008).

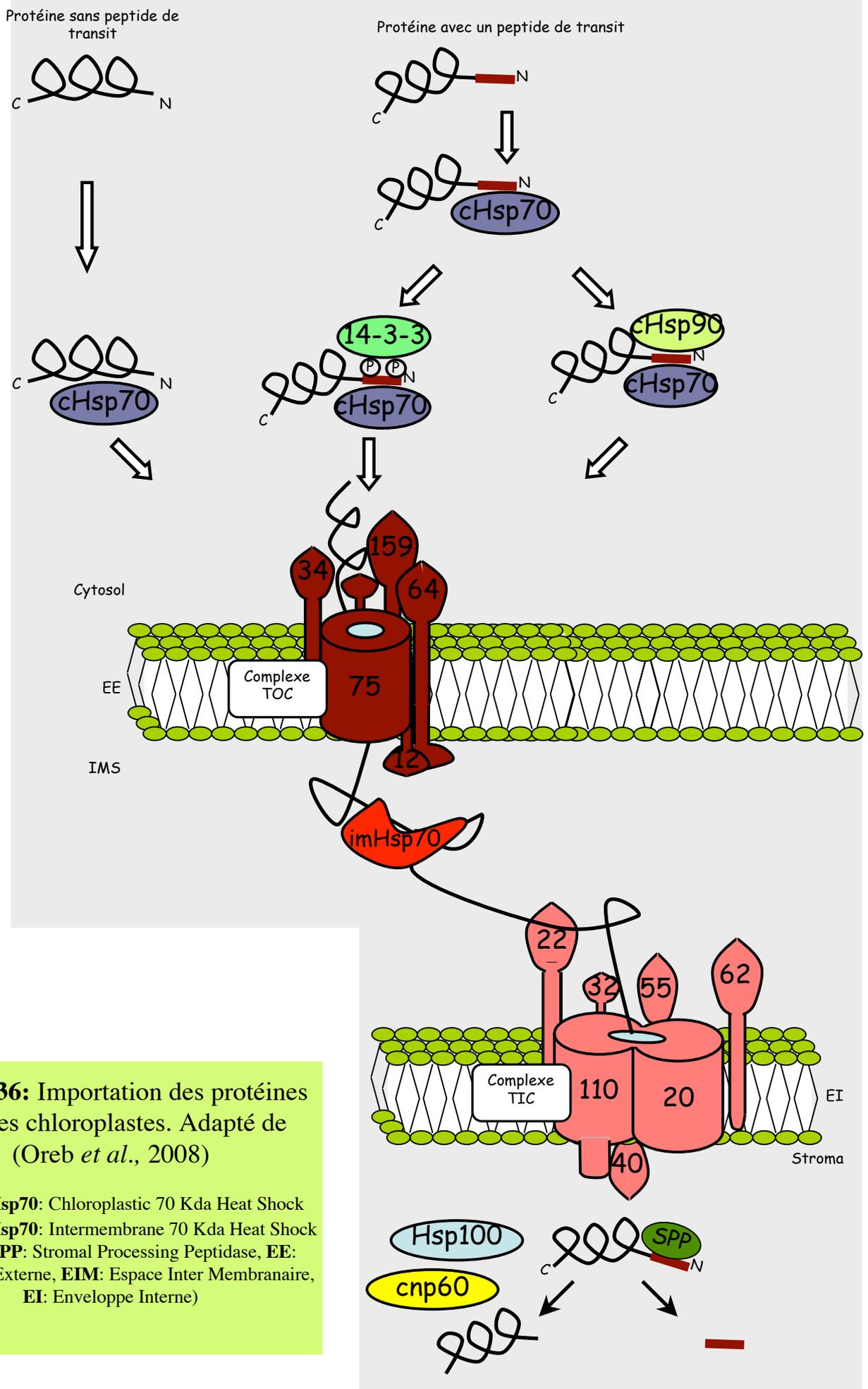
Des études plus détaillées ont cependant montré que le système d'importation des protéines chez les plantes présente quelques différences (**Figure 35**). Ainsi, les trois récepteurs TOM20, TOM70 et TOM22 ne trouvent pas d'homologues chez les végétaux :

La purification et la caractérisation du complexe TOM des plantes supérieures a permis de mettre en évidence deux protéines de 20 et 70 kDa. Le rôle de celles-ci reste cependant à déterminer. En effet, l'analyse de la structure de la protéine de 20 kDa n'a pas permis de mettre en évidence les motifs TPR (« Tetratricopeptide repeat ») caractéristiques des interactions protéine-protéine que l'on retrouve au sein du récepteur de levure TOM20 (Likic et al., 2005).

A l'inverse, l'analyse de la séquence complète d'une protéine de 9 kDa montre de fortes similarités de séquence de cette protéine avec le récepteur TOM22. Ainsi, il semble que toute une région, correspondant à la partie N-terminale de la protéine, portant le domaine correspondant au récepteur est éteinte au cours de l'évolution (Perry et al., 2008).

Enfin, des travaux réalisés par l'équipe de Whelan (Chew et al., 2004) ont permis l'identification d'une protéine : mtOm64 (« Outer mitochondrial Membrane protein ») de 64 kDa, qui présente des motifs riches en TPR (« Tetratricopeptide repeat »). Cette protéine présente une grande identité de séquence (52%) avec la sous-unité du complexe d'importation chloroplastique TOC64. Les auteurs suggèrent que cette protéine pourrait jouer le rôle de récepteur au sein du complexe de translocation des protéines mitochondriales.

Ainsi, l'absence de conservation des récepteurs du complexe d'importation protéique mitochondrial chez les végétaux, serait une conséquence de l'apparition des chloroplastes au sein des cellules, l'évolution des séquences d'adressage et des récepteurs permettant une augmentation de la sélectivité et de la spécificité lors de l'adressage des précurseurs vers les mitochondries ou les chloroplastes (Chew et al., 2004).



**Figure 36:** Importation des protéines dans les chloroplastes. Adapté de (Oreb *et al.*, 2008)

(Avec **cHsp70**: Chloroplasic 70 Kda Heat Shock Protein **imHsp70**: Intermembrane 70 Kda Heat Shock Protein, **SPP**: Stromal Processing Peptidase, **EE**: Enveloppe Externe, **EIM**: Espace Inter Membranaire, **EI**: Enveloppe Interne)

## 2.Importation des protéines dans les chloroplastes

### 2.a - Protéines destinées au stroma

Comme pour les mitochondries, plus de 95% des protéines chloroplastiques sont codées par les gènes localisés dans le noyau. Elles doivent ensuite être transportées puis importées au sein des chloroplastes. Or, les chloroplastes sont les organites les plus récents de la cellule eucaryote, et à leur arrivée, des mécanismes d'importation étaient déjà en place pour l'importation, entre autres, des protéines mitochondriales. Les chloroplastes ont donc dû développer un système d'importation spécifique pour assurer la spécificité de l'adressage des protéines chloroplastiques. Ainsi, les membranes des chloroplastes contiennent deux complexes : TOC et TIC, respectivement localisés dans l'enveloppe externe et l'enveloppe interne (**Figure 36**) (Oreb et al., 2008).

La première étape de l'importation chloroplastique a lieu dans le cytosol : après la prise en charge des précurseurs par les molécules chaperonnes Hsp70 deux voies majeures peuvent être suivies par les précurseurs possédant dans leur partie N-terminale un peptide de transit. Certains, phosphorylés ou non (May and Soll, 2000), sont reconnus par la protéine 14-3-3, pour former un complexe qui guide le précurseur jusqu'à l'enveloppe externe des chloroplastes. Les autres s'associent juste à une deuxième protéine chaperonne, cHsp90. Les précurseurs sans séquence d'adressage, également associés aux chaperonnes Hsp70 sont directement dirigés vers les chloroplastes, sans autre intermédiaire.

La suite de l'importation est commune aux différents précurseurs.

Le complexe TOC contient 5 protéines : TOC159, TOC75, TOC64, TOC34 et TOC12, nommés ainsi en fonction de leur poids moléculaire.

TOC34 et TOC159 sont deux récepteurs qui reconnaissent les précurseurs protéiques par l'intermédiaire de leur domaine GTPase. TOC64 est associé à la périphérie du complexe. C'est une protéine intégrale de membrane qui expose du côté de sa surface cytosolique des motifs TPR (« Tetratricopeptide Repeat »), motifs impliqués dans les interactions protéines-protéines. Ainsi, TOC64 intervient dans la liaison avec les protéines chaperonnes associées au précurseur. Celui-ci est ensuite transféré à une protéine membranaire constituée de 16 feuilletts  $\beta$  : TOC75. Cette sous-unité du complexe TOC agit comme un pore qui va permettre la translocation des protéines au travers de l'enveloppe externe des chloroplastes. Une fois arrivées dans l'espace intermembranaire, celles-ci seront prises en charge par un complexe constitué par TOC64, TOC12, TIC22 et imHsp70. Il agit comme un récepteur et récupère le



précurseur du côté *trans* de l'enveloppe externe pour le transférer, dans un état non structuré, aux composants du complexe TIC.

De nombreux composants du complexe TIC ont été identifiés, mais les connaissances exactes concernant leur rôle et leur structure reste à ce jour controversées. Il semble néanmoins que la protéine soluble TIC22, associée à la surface de la membrane interne soit le premier constituant du complexe TIC à interagir avec le précurseur. Ensuite, deux candidats contribuent à la formation d'un canal, TIC20 et TIC110. Trois autres sous unités, TIC55, TIC62 et TIC32 sont associées à ce canal et interviennent dans la régulation de l'importation des précurseurs chloroplastiques. Enfin, l'association des domaines situés dans le stroma de TIC110 avec TIC40 sert de point d'ancrage aux précurseurs associés aux chaperonnes Hsp100 et cnp60, avant l'intervention de la peptidase chloroplastique SPP (cf. III.2.C (Richter and Lamppa, 2003)) qui permet le clivage du peptide de transit et la libération de la protéine mature.

### **2.b - Protéines destinées à la membrane externe**

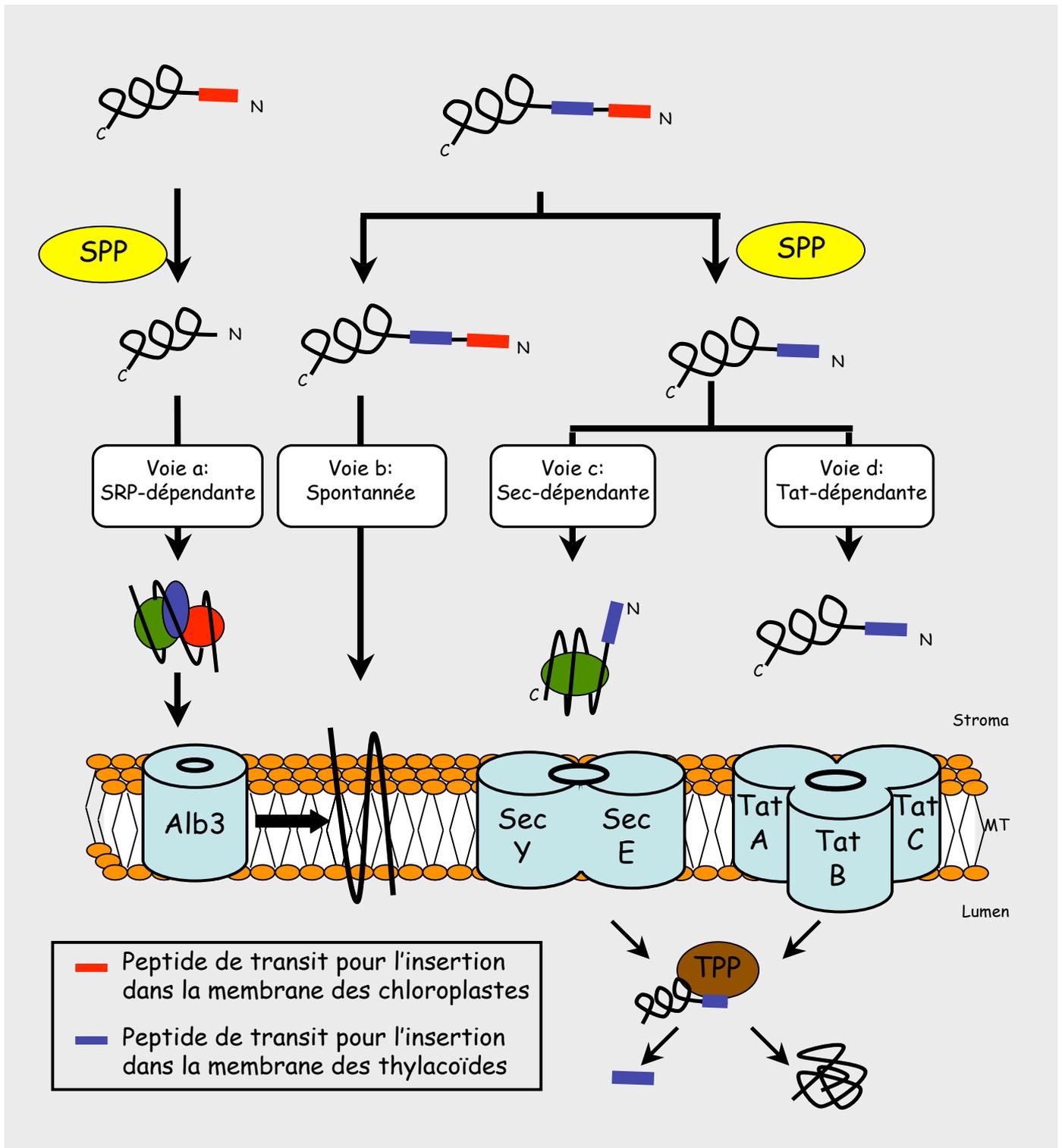
La majorité des protéines destinées à la membrane externe ne possèdent pas de peptides transit. Leur insertion dans la membrane se fait *via* un signal interne hydrophobe, indépendamment du système d'importation classique TOC/TIC. Récemment, des travaux réalisés par l'équipe de Hwang (Bae et al., 2008) ont montré que la protéine cytosolique AKR2A (« Arabidopsis ankyrin repeat protein ») reconnaissait spécifiquement ce type de protéines afin de les guider vers la membrane externe.

### **2.c - Protéines destinées à l'espace intermembranaire**

A l'inverse des mitochondries, peu de protéines sont localisées dans l'espace intermembranaire des chloroplastes et un nombre limité d'études a été réalisé sur l'importation de ce type de protéines. On connaît en détail le mécanisme d'importation de seulement deux protéines : TIC22 et MGD1 (« monogalactosyldiacylglycerol synthase 1 »). Toutes deux sont synthétisées avec un peptide de transit et utilisent le système TOC pour la translocation au travers de la membrane externe. Le précurseur de TIC22 est ensuite dirigé vers l'espace intermembranaire avant d'être maturé (Kouranov et al., 1999). Le précurseur de MGD1 utilise la voie classique et une fois maturé dans le stroma il rejoint l'espace intermembranaire (Vojta et al., 2007).

### **2.d - Protéines destinées à la membrane interne**

La majorité des protéines destinées à la membrane interne utilisent la voie classique d'importation : synthétisées avec un peptide de transit, elles sont importées au travers des complexes TOC et TIC. Deux systèmes peuvent ensuite être utilisés pour l'étape finale



**Figure 37:** Importation des protéines dans les thylakoïdes des chloroplastes. Adapté de (Gutensohn *et al.*, 2006)

(Avec **SPP**: Stromal Processing Peptidase, **TPP**: Thylakoïdes Processing Peptidase **MT**: Membrane des Thylakoïdes, **TAT**: Twin Arginine translocase)

d'insertion dans la membrane : dans un certain nombre de cas, les protéines possèdent un signal interne de sortie qui arrête la translocation au niveau de la membrane interne et induit un transfert des protéines au sein de la membrane ; enfin, des protéines comme TOC40 et TOC110 transitent dans le stroma avant d'être redirigées vers la membrane (Jarvis, 2008), (Inaba and Schnell, 2008).

### **2.e - Protéines destinées aux thylacoïdes**

Une fois dans le stroma, une partie des protéines va ensuite pouvoir rejoindre les thylacoïdes. Quatre voies sont décrites. Initialement identifiées pour les protéines codées par le génome nucléaire, elles permettent également le transport des protéines codées par le génome chloroplastique (**Figure 37**) (Gutensohn et al., 2006).

Deux voies permettent l'insertion des protéines dans la membrane des thylacoïdes : la voie SRP-dépendante et la voie spontanée. L'ensemble des protéines qui empruntent ces voies possèdent un peptide de transit composé de deux parties : la partie N-terminale pour l'importation dans le stroma, et une partie additionnelle, pour l'importation dans les thylacoïdes.

La **voie SRP-dépendante (Figure 37a)** est la plus utilisée. Elle sert à l'intégration de protéines comme la LHCP (« Light Harvest Complex Protein »). L'insertion, dépendante de l'hydrolyse du GTP, est médiée par trois facteurs situés dans le stroma des chloroplastes (cpSRP54, cpSRP43 et cpFtsy) et par une protéine de la membrane des thylacoïdes, homologue chloroplastique de Oxa1, Alb3 (Yi and Dalbey, 2005) (Nussaume, 2008).

La **voie spontanée (Figure 37b)** dépend de la présence de deux domaines hydrophobes localisés dans la partie N-terminale de la protéine. Elle concerne un nombre limité de protéines, parmi lesquelles on retrouve les protéines responsables de l'assemblage de l'ATP synthase chloroplastique (Michl et al., 1994).

Les deux autres voies permettent le transport des protéines au sein du lumen des thylacoïdes.

Les protéines qui empruntent ces voies possèdent également un peptide organisé en deux parties : la partie N-terminale assure la translocation au travers des enveloppes des chloroplastes, suivie par un second signal qui assure la translocation au travers de la membrane des thylacoïdes. Celui-ci présente une organisation caractéristique : tout d'abord un segment chargé positivement, suivi par un domaine central hydrophobe, pour finir par une région polaire dans la partie C-terminale. Une fois la protéine importée au sein du lumen, cette séquence d'adressage est éliminée par une endopeptidase liée à la surface interne de la membrane des thylacoïdes : TPP (« Thylakoïdal Processing Peptidase »).



La **voie SEC-dépendante (Figure 37c)** est indépendante du potentiel de membrane mais nécessite l'hydrolyse de l'ATP. Elle est utilisée pour des protéines telles que les sous-unités du photosystème I. On connaît principalement trois protéines impliquées dans cette voie : SecA, localisée dans le stroma des chloroplastes qui lie le précurseur avant de le transférer aux protéines SecY et SecE, enchâssés dans la membrane des thylacoïdes (Asakura et al., 2008).

La **voie TAT (« Twin Arginine Translocase ») (Figure 37d)** est utilisée par les protéines qui possèdent deux résidus arginine en amont du domaine central hydrophobe. Cette voie, dépendante du potentiel de protons générés par la photosynthèse, implique une translocase constituée de trois sous-unités TatA, TatB et TatC (Braun and Theg, 2008).

## C-CLIVAGE DE LA SEQUENCE D'ADRESSAGE : MPP ET SPP

Une fois la pré-protéine transloquée dans la matrice des mitochondries ou dans le stroma des chloroplastes, le signal d'adressage doit être éliminé pour permettre le bon repliement de la protéine. Cette étape est assurée par des métallopeptidases appartenant à la famille des pritrilysines, la MPP (« Mitochondrial Processing Peptidase ») dans les mitochondries et SPP (Stromal Processing Peptidase) dans les chloroplastes.

**MPP** est une enzyme hétéro-dimérique de 110 kDa, dont la sous-unité  $\alpha$  est responsable de la liaison avec le précurseur, alors que la sous-unité  $\beta$  porte l'activité enzymatique (Gakh et al., 2002). Elle est intégrée au complexe cytochrome *bc1* de la chaîne respiratoire, et ceci dans les mitochondries de plante uniquement. Cette enzyme reconnaît les motifs caractéristiques que l'on retrouve dans plus de 60% des séquences d'adressage mitochondrial. Ces motifs peuvent être divisés en trois groupes :

- 4/5<sup>ème</sup> des séquences d'adressage possèdent un résidu Arginine (Arg) à la position (-2) ou (-3) avant le site de clivage ( $\downarrow$ ) : [Arg-X $\downarrow$ Ser-Thr/Ser-Thr] ou [Arg-X-Phe/Tyr $\downarrow$ Ala/Ser-Thr/Ser/Ala]
- 1/5<sup>ème</sup> des séquences ne possèdent pas de résidu arginine conservé en amont du site de clivage reconnu par la MPP.

**SPP** est une enzyme monomérique de 100 kDa localisée dans le stroma des plastes. Contrairement aux MPP, son fonctionnement nécessite de l'ATP. Enfin, elle reconnaît un motif faiblement conservé au niveau du site de clivage : [Val/Ile-X-Ala/Cys $\downarrow$ Ala] (Richter and Lamppa, 2003).



Après l'élimination de la séquence d'adressage, **les protéines** doivent encore subir une dernière étape avant d'être fonctionnelles. Cette étape fait intervenir des chaperonnes. Elles permettent à la protéine de prendre sa conformation tridimensionnelle et d'acquérir ainsi son activité. Il s'agit dans la matrice mitochondriale des chaperonnes mHsp60 et 70 et de leurs co-chaperonnes. Dans le stroma, le repliement des protéines est assuré par Hp100, Hsp70 et Cpn60.

Enfin les peptides potentiellement dangereux, correspondants aux pré-séquences mitochondriales et aux peptides de transit chloroplastiques sont rapidement dégradés. Cette étape est assurée par une métalopeptidase localisée dans le stroma des chloroplastes et la matrice des mitochondries, la protéase PreP (Glaser et al., 2006).

## **D-CAS PARTICULIER : PROTEINES DOUBLEMENT ADRESSEES AUX MITOCHONDRIES ET AUX CHLOROPLASTES.**

### **1. Généralités sur le double adressage**

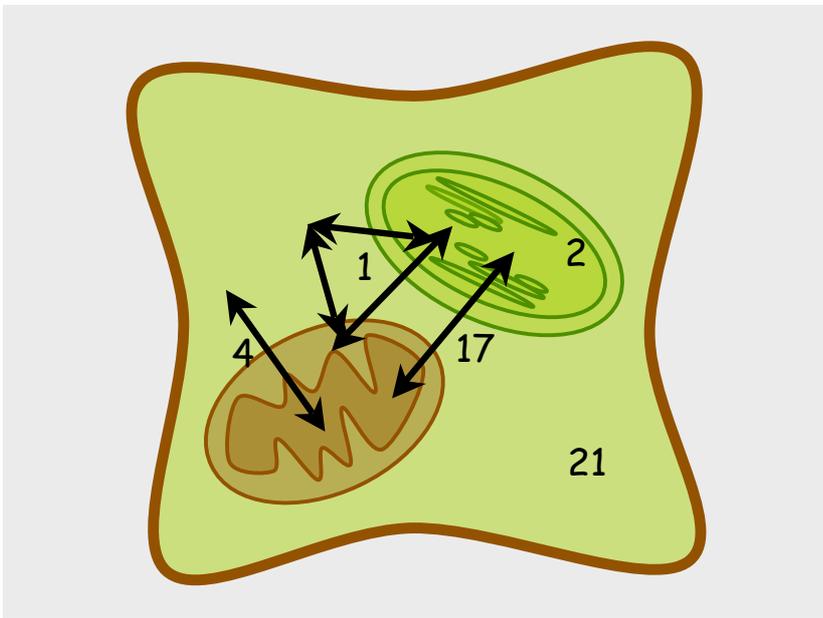
Comme décrit ci-dessus, les séquences d'adressage sont très variées. Elles peuvent se localiser dans différentes régions du précurseur protéique : dans la partie N-terminale pour les séquences d'adressage mitochondriales, chloroplastiques ou réticulaires, dans la partie interne des protéines destinées au noyau ou dans la partie C-terminale pour les signaux permettant l'adressage aux peroxysomes.

Ainsi un précurseur peut contenir plusieurs signaux dans sa séquence qui lui permettront de passer **successivement** de l'un à l'autre des compartiments. On peut citer l'exemple des récents travaux réalisés par l'équipe de Samuelsson (Villarejo et al., 2005) qui ont permis de montrer que l'anhydrase carbonique d'*A. thaliana* était N-glycosylée dans le réticulum endoplasmique avant d'atteindre sa destination finale : les chloroplastes.

Sans être exhaustif, on peut citer un certain nombre de cas où l'on retrouve **simultanément** une même protéine dans plusieurs compartiments (Small et al., 1998) :

#### Double localisation des protéines mitochondriales :

- double localisation mitochondriale et **nucléaire** pour différentes enzymes impliquées dans la maturation des ARNt dans la levure (Martin and Hopper, 1994)
- le cytochrome b5 est une protéine localisée à la fois dans la membrane des mitochondries et dans la membrane du **réticulum endoplasmique** de *Brassica obracea* (Zhao et al., 2003).



**Figure 38:** Localisation des aaRS d'*A. thaliana* (Adapté de Duchêne *et al.* 2005)

- l'alanine : glyoxylate amino-transferase est un cas très particulier : cette enzyme est localisée uniquement dans les mitochondries des carnivores, dans les **peroxysomes** des herbivores et doublement localisée chez les omnivores tels que le rat.

- plusieurs membres de la famille des aminoacyl-ARNt synthétases, en plus d'être localisées dans les mitochondries sont localisées dans le **cytosol** (Duchene et al., 2005).

#### Double localisation des protéines chloroplastiques :

- la dihydrofolate réductase-thymidilate synthase est une enzyme bi-fonctionnelle impliquée dans la régénération du dihydrofolate. Sa double localisation, **nucléaire** et chloroplastique, a été mise en évidence dans *Daucus carota*.

- RB60 est une disulfide isomérase qui intervient dans la régulation de la traduction chloroplastique. Une étude récente (Levitan et al., 2005) a montré qu'en plus de sa localisation chloroplastique, on retrouve également RB60 dans le **reticulum** de *C. reinhardtii*.

- il existe deux versions protéiques d'un même gène codant pour une Hsp70 chez *Citrullus vulgaris*, une version longue que l'on retrouve dans les chloroplastes, alors que la version courte est localisée dans les **peroxysomes** (Wimmer et al., 1997).

Mais le cas le plus complexe de double localisation concerne les membres de la famille des aminoacyl-ARNt synthétase (aaRS) d'*A. thaliana* (Duchene et al., 2005) (**Figure 38**) :

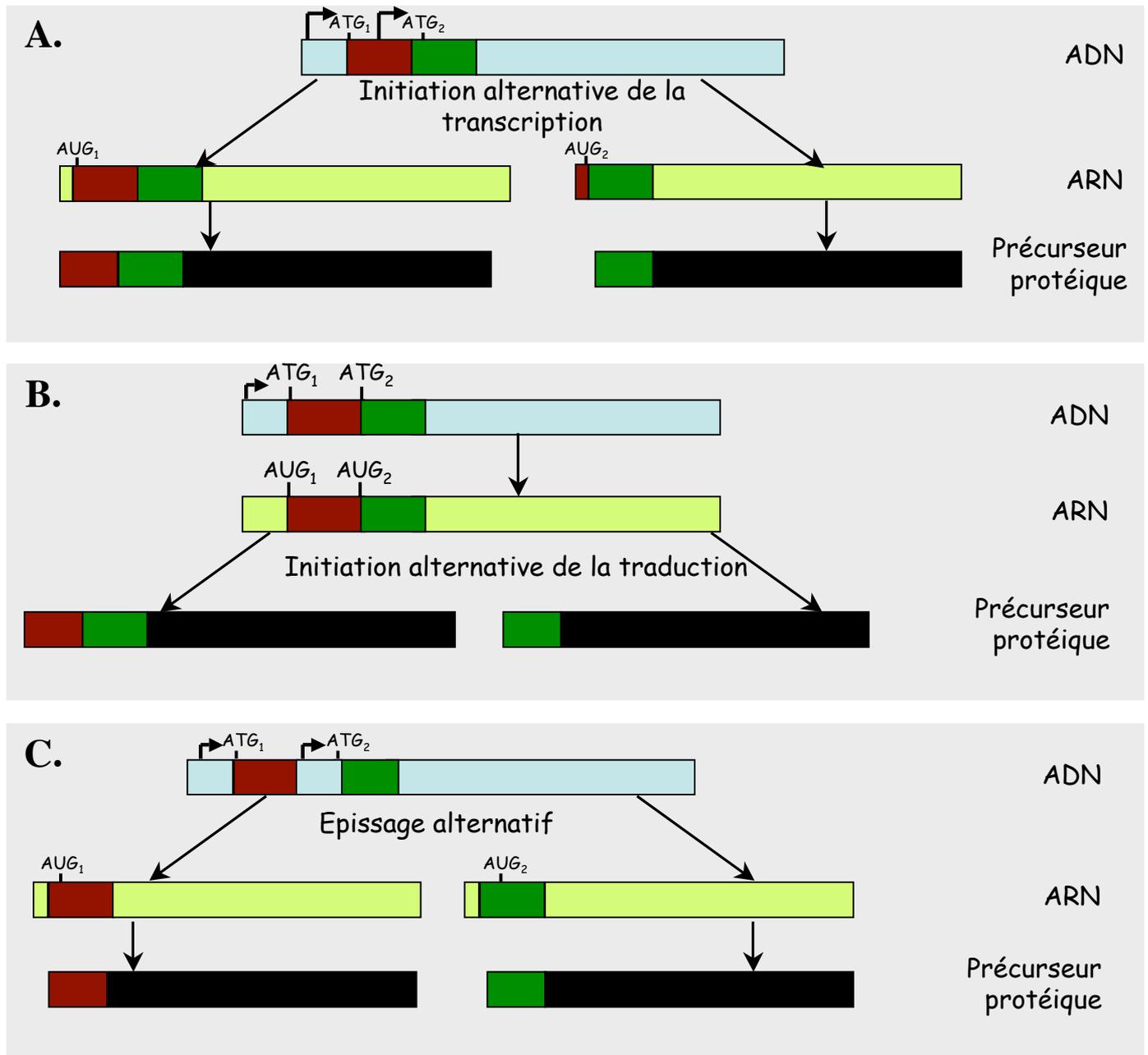
Vingt quatre d'entre elles possèdent dans leur partie N-terminale une séquence d'adressage.

Parmi ces protéines, 5 sont localisées à la fois dans les mitochondries et le cytosol, 1 se retrouve simultanément dans trois compartiments : mitochondries, cytosol et chloroplastes, et enfin, 17 sont doublement adressées aux mitochondries et aux chloroplastes.

C'est à ce dernier exemple que nous nous sommes plus particulièrement intéressés.

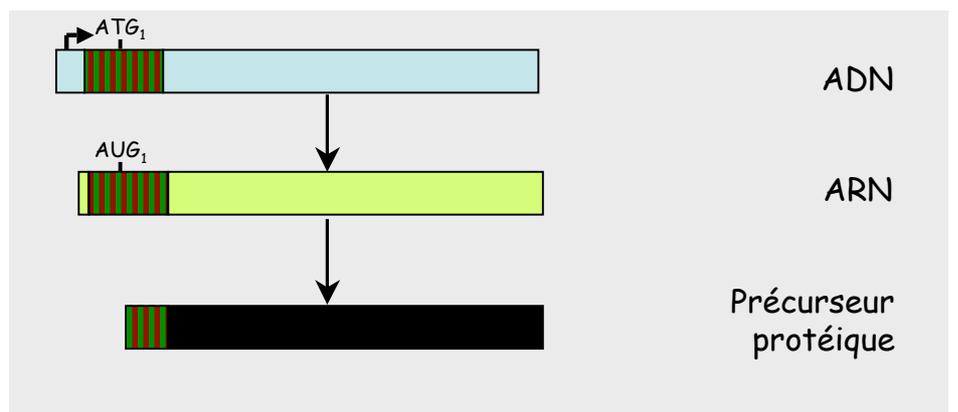
## **2.Double adressage mitochondrial/chloroplastique**

Mitochondries et chloroplastes ont en commun un certain nombre de fonctions, en particulier tous les mécanismes permettant le décodage de l'information génétique contenue dans leur génome. La majorité des enzymes impliquées dans ces réactions sont codées par le génome nucléaire puis importées depuis le cytosol vers l'un ou l'autre des organites. Ces protéines spécifiques sont codées par des gènes distincts, et portent dans leur partie N-terminale l'information nécessaire pour l'adressage vers l'un ou l'autre des compartiments. Pourtant, dans certains cas, le génome nucléaire ne contient qu'un seul gène. Ainsi, le produit



**Figure 39:** Un gène nucléaire à l'origine de deux protéines: Séquences d'adressage « jumelles ». **A.** par initiation alternative de la transcription, **B.** par initiation alternative de la traduction, **C.** par épissage alternatif.

**Figure 40:** Un gène nucléaire à l'origine de deux protéines: Séquence d'adressage « ambiguë ».



d'un gène unique se retrouvera à la fois dans les mitochondries et dans les chloroplastes. Deux grands mécanismes permettent cette double localisation (Peeters and Small, 2001) :

Séquence d'adressage mitochondriale et chloroplastique peuvent se succéder en amont de la séquence codant pour la protéine à importer. On parlera de séquences d'adressage jumelles (**Figure 39**). Initiation alternative de la transcription (**A**), de la traduction (**B**) ou épissage alternatif des exons (**C**) sont trois mécanismes qui permettront ensuite la formation de deux protéines différentes, à partir du même gène chacun des précurseurs ayant une séquence d'adressage différente à son extrémité N-terminale.

On peut également retrouver dans la partie N-terminale de la protéine une séquence d'adressage qualifiée « d'ambiguë », qui sera reconnue comme un signal d'importation par les deux organelles (**Figure 40**).

### 3. Séquences d'adressage ambiguës

La première protéine portant une séquence ambiguë, identifiée en 1995, est la glutathion réductase (GR) de pois (Creissen et al., 1995). Depuis, d'autres protéines ont été identifiées (**Table 7**), et l'on compte actuellement chez *A. thaliana* une trentaine de protéines portant ce type de signal, dont la majorité sont impliquées dans l'expression des gènes au sein des organites, comme les aaRS, ou les ARN polymérases.

Ainsi, treize ans après leurs découvertes, le nombre de travaux réalisés pour caractériser les séquences de double adressage est limité, et les caractéristiques propres à ce type de signal ne sont pas aujourd'hui clairement définies. Seules deux grandes études ont été réalisées :

Une analyse *in silico* a été réalisée par l'équipe de Ian Small (Small et al., 2004). Au cours de cette étude, les auteurs ont comparé 19 séquences d'adressage ambiguës avec des séquences d'adressage de protéines connues pour être mitochondriales ou chloroplastiques. Cette analyse a permis de conclure que les séquences ambiguës possédaient les caractéristiques classiques des deux autres types de séquences, à quelques exceptions près : le contenu en résidu alanine y est moins élevé que dans les séquences classiques (7,4% pour les séquences ambiguës contre 12% pour les séquences mitochondriales ou chloroplastiques) ; à l'inverse, elles sont plus riches en résidus phénylalanine et leucine (22% contre 14%).

Deux études de mutagenèse ont également été réalisées sur la Glutathion Réductase (GR) par le laboratoire de E. Glaser :

La première étude a été réalisée en 2002 (Rudhe et al., 2002). Des tests d'importation *in vitro* ont été réalisés sur la GR délétée de ces 4, 16 ou 30 premiers résidus. Ces expériences

Protéines	N° Accession	Références
Alanyl-ARNt synthétase	At1g50200	Duchêne et al., 2005
Alanyl-ARNt synthétase 2	At5g2280	Duchêne et al., 2005
Ascorbate peroxydase	At4g08390	Chew et al., 2003
Asparaginyl-ARNt synthétase	At4g17300	Peeters et al., 2000
Asparagyl-ARNt synthétase	At4g33760	Duchêne et al., 2005
Cryptochrome (CRY3)	At5g24850	Brudler et al., 2003
Cysteinyl-ARNt synthétase	At2g31170	Peeters et al., 2000
DNA polymerase (Poly)	At3g20540	Elo et al., 2003
Formate deshydrogenase	At5g14780	Herman et al., 2002
Glutathion reductase	At3g54660	Chew et al., 2003
Glutamine synthetase (GLN2)	At5g24850	Taira et al., 2004
Glutamyl-ARNt synthétase	At5g64050	Duchêne et al., 2005
Glycyl-ARNt synthétase	At1g29880	Duchêne et al., 2001
Glycyl-ARNt synthétase 2	At3g48110	Duchêne et al., 2005
Histidyl-ARNt synthétase	At3g46100	Akashi et al., 1998
Isoleucyl-ARNt synthétase	At5g49030	Duchêne et al., 2005
Lysyl-ARNt synthétase	At3g13490	Duchêne et al., 2005
Mercaptopyruvate sulfurtransferase	At1g79230	Nakamura et al., 2000
Methionine amino-peptidase (MAP1C)	At3g25740	Giglione et al., 2000
Methionine amino-peptidase (MAP1D)	At4g37040	Giglione et al., 2000
Methionyl-ARNt synthétase	At3g5540	Menand et al., 1998
Monodehydroascorbate reductase	At1g63940	Chew et al., 2003
NADPH deshydrogenase NDC1	At5g08740	Carrie, et al., 2008
Peptide deformylase (PDF1B)	At5g14660	Giglione et al., 2000
Phenyl-ARNt synthétase	At3g58140	Duchêne et al., 2005
Phosphatidylglycerophosphatesynthase 1	At2g39290	Babiychuk et al., 2003
Prolyl-ARNt synthétase	At5g52520	Duchêne et al., 2005
Pseudouridine synthase	At2g30320	Urantowka et al., 2005
Ribosomal protein 16S (RP16S)	At4g34620	Ueda et al., 2008
RNA binding protein	At3g23830	Vermel et al., 2002
RNA polymerase 2	At5g15700	Hedtke et al., 2000
Seryl-ARNt synthétase	At1g11870	Duchêne et al., 2005
Threonyl-ARNt synthétase 2	At2g04842	Duchêne et al., 2005
Tyrosyl-ARNt synthétase	At3g02660	Duchêne et al., 2005
Tryptophanyl-ARNt synthétase	At2g25840	Duchêne et al., 2005
Valyl-ARNt synthétase 2	At5g16715	Duchêne et al., 2005
Zinc metalloprotease AtPreP	At3g19170	Bhushan et al., 2003
Zinc metalloprotease AtPreP2	At1g49630	Stahl et al., 2002

**Table 7:** Liste des protéines doublement adressées dans les mitochondries et les chloroplastes par une séquence d'adressage ambiguë chez *Arabidopsis thaliana*. (Adapté de Whelan et al. 2004)

ont permis de mettre en évidence l'organisation de cette séquence sous forme de domaines : la région C-terminale de la séquence d'adressage est impliquée dans l'importation vers les chloroplastes alors que la partie plus interne permet l'adressage vers les mitochondries.

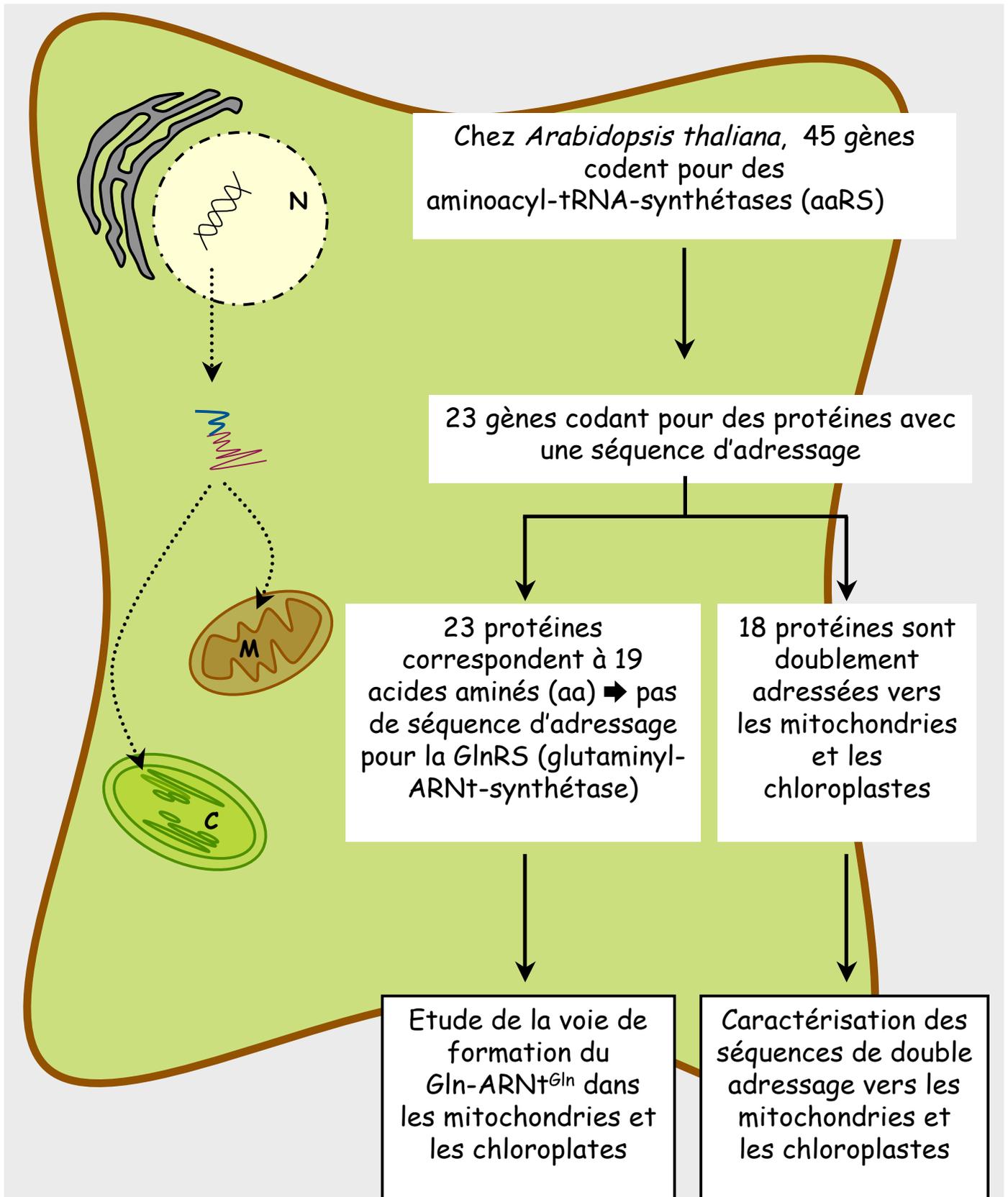
L'équipe de Glaser a également réalisé en 2003 une étude de mutations ponctuelles sur la séquence d'adressage de la GR. Cette étude a permis de mettre en évidence deux points importants (Chew et al., 2003).

- D'une part, le remplacement des résidus Arginines en résidus négativement chargés, et ceci peu importe leur localisation le long de la séquence, altère l'importation des protéines vers les mitochondries. On observe les mêmes effets sur l'importation dans les mitochondries lorsque l'on modifie les résidus hydrophobes situés dans la partie N-terminale de la séquence.
- D'autre part l'importation des protéines dans les chloroplastes est grandement affectée par les mutations des résidus hydrophobes.

Enfin on note qu'en plus d'étudier les signaux responsables du double adressage des travaux ont également permis à l'équipe de Glaser d'analyser la maturation du précurseur par les peptidases MPP et SPP (cf. III.C) (Rudhe et al., 2004).



# *Projet de thèse*



**Figure 41:** Point de départ des travaux effectués pendant ma thèse  
Avec N: noyau, M: mitochondries, C: chloroplastes

L'étude effectuée au laboratoire sur la localisation des d'aminacyl-ARNt synthétases (aaRS) est le point de départ des travaux réalisés au cours de ma thèse (Duchene et al., 2005) (**Figure 41**). Chez les plantes, la synthèse des protéines se fait dans le cytosol, les chloroplastes et les mitochondries. Tous les facteurs intervenant dans la traduction doivent être présents dans ces trois compartiments et chaque machinerie traductionnelle doit posséder des jeux complets d'aminacyl-ARNt synthétases (aaRS) et d'ARN de transfert (ARNt). Cependant, au cours de l'évolution, les génomes mitochondriaux et chloroplastiques ont perdu de nombreux gènes. Ainsi, la totalité des aaRS sont maintenant codées par des gènes nucléaires. L'importation vers les mitochondries et les chloroplastes se fait *via* un processus spécifique, impliquant la partie N-terminale des protéines.

La première partie de mon travail porte sur la voie de biosynthèse du Gln-ARNt<sup>Gln</sup> dans les organites. En effet, parmi les 45 gènes identifiés chez *Arabidopsis thaliana* codant pour une aaRS, la seule séquence codant pour une Glutaminyl-ARNt synthétase (GlnRS) ne possède pas de séquence d'adressage détectée par les programmes de prédiction. Il n'y a donc, *a priori* pas de GlnRS dans les mitochondries ou les chloroplastes. J'ai donc étudié la voie de formation du Gln-ARNt<sup>Gln</sup> dans ces organites (Résultats, Chapitre I, Article I).

De plus, sur les 45 gènes identifiés codant pour une aaRS, 23 codent pour une protéine avec une séquence d'adressage dans leur partie N-terminale, et les tests d'importation *in vitro* et *in vivo* montrent que 18 de ces 23 protéines possèdent une séquence d'adressage appelée séquence ambiguë. Ces séquences permettent à une protéine, synthétisée à partir d'un gène nucléaire unique, d'être à la fois destinée aux mitochondries et aux chloroplastes. La seconde partie de mon travail a ainsi consisté en l'étude de ce type de séquence encore très peu étudié afin de mieux les caractériser. Cette étude a été réalisée en deux temps :

Nous avons tout d'abord essayé de déterminer si l'adressage vers l'un ou l'autre des compartiments dépendait de la présence de résidus particuliers, très conservés au sein des différentes espèces (Résultats, Chapitre II, Article II).

Enfin, nous nous sommes intéressés à l'organisation des séquences d'adressage ambiguës, afin de déterminer si celles-ci étaient subdivisées en domaines, spécifiques de l'adressage mitochondrial ou chloroplastique (Résultats, Chapitre III).



# *Matériel et Méthodes*



# Chapitre I Matériel



## 1.MATERIEL VEGETAL

### *Solanum tuberosum* :

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

Des feuilles de pomme de terre ont été utilisées pour la préparation d'ARNt chloroplastiques.

### *Pisum sativum* :

Les chloroplastes et les mitochondries sont extraits de feuilles de pois (variété Douce Provence) obtenues à partir de plantules âgées de dix jours.

### *Nicotiana benthamiana* :

Les transformations par l'intermédiaire d'*Agrobacterium* ont été réalisées avec les plants de tabac à un stade de développement relativement jeune (avant la floraison).

### *Arabidopsis thaliana* :

Des plants d'*A. thaliana* (écotype Colombia) sont cultivés en serres à 25°C avec une photopériode de 16 h de jour et 8 h de nuit pendant 6 à 7 semaines pour la préparation des chloroplastes.

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

## 2.SOUCHES BACTERIENNES

### A-SOUCHES D'*ESCHERICHIA COLI*

#### M15 (Qiagen) :

Na1, StrS, RifS, Thi<sup>-</sup>, Lac<sup>-</sup>, Ara<sup>+</sup>, Gal<sup>+</sup>, Mtl<sup>-</sup>, F<sup>-</sup>, RecA<sup>+</sup>, Uvr<sup>+</sup>, Lon<sup>+</sup>

#### TG2 :

*supE hsdΔ5 thi Δ(lac-proAB) Δ(srl-recA)306::Tn10 (tet<sup>r</sup>) F' {traD36 proAB<sup>+</sup> lac I<sup>q</sup>ZΔM15}*

**TOPO10F'** (Invitrogen) :

F' {(lacI<sup>q</sup>Tn10(Tet<sup>R</sup>)} mcrA d(mrr-hshRMS-mcrBC) p80lacZdM15 dlacX74recA1araD139 d(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str<sup>R</sup>) endA1 nupG

**B-SOUCHE D'AGROBACTERIUM TUMEFACIENS****LBA4404 :**

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

**3.PLASMIDES*****pUC18, pUC19***

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

***pKS(+), pSK(-)***

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

### *pCR®II-TOPO*

Le vecteur pCR®II-TOPO (Invitrogen) de 3,9 kb possède des extrémités 3' dT sortantes ainsi que 2 sites de restriction *EcoRI* flanquant le site d'insertion, ceci afin d'exciser facilement le fragment inséré. De même, la cassette de clonage est entourée des promoteurs reconnus par les ARN polymérases des phages Sp6 et T7, ce qui permet la transcription spécifique d'un brin de l'ADN inséré dans la cassette. Ce vecteur contient aussi le gène codant pour la  $\beta$ -lactamase qui confère aux bactéries transformées la résistance à l'ampicilline ainsi qu'un gène de la  $\beta$ -galactosidase permettant la sélection des bactéries ayant un insert selon le principe de l' $\alpha$ -complémentation.

### *pBIN+*

Ce plasmide de 12,3 kb dérive du plasmide *pBIN19*. Il est utilisé pour obtenir des cellules transgéniques. Il est dit binaire car son origine de répllication RK2 permet la production de plasmides dans *E. coli* et *A. tumefaciens*. Il possède également l'origine de répllication Col E1 lui permettant de multiplier environ par 4 le nombre de copies chez *E. coli* par rapport au réplicon RK2. Il contient les gènes NPT III et NPT II qui confèrent la résistance à la kanamycine. Le gène NPT III permet la sélection des bactéries transformées (*E. coli* et *A. tumefaciens*). Le gène NPT II permet la sélection des cellules végétales transformées. Ce vecteur contient le gène de la  $\beta$ -galactosidase permettant la sélection des bactéries ayant un insert selon le principe de l' $\alpha$ -complémentation.

### *pQE60*

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

### *pOL GFP65C*

Pour l'expression transitoire dans les protoplastes de *N. benthamiana* le plasmide pOL GFP65C a été utilisé. Il dérive du plasmide pCK GFP65C qui contient la séquence de la

mGFP4 entre un promoteur doublé 35S (« promoteur 2x35S » issu du virus de la mosaïque du chou-fleur) et un terminateur de même origine (« polyA 35S »).

## 4.CONSTRUCTIONS

Des plasmides recombinants construits au laboratoire ont servi à mon travail.

Certains dérivent du vecteur pBluescript dans lequel est inséré le gène chimérique correspondant à la fusion de la séquence d'adressage de 10 aminoacyl-ARNt synthétase avec la GFP (« Green Fluorescent Protein »). Ces aminoacyl-ARNt synthétase sont :

La glutamyl-ARNt synthétase (AGI n° At5g64050) ; la méthionyl-ARNt synthétase (AGI n° At3g5540) ; la phénylalaninyl-ARNt synthétase (AGI n° At3g58140) ; la prolyl-ARNt synthétase (AGI n° At5g52520) ; la tyrosyl-ARNt synthétase (AGI n° At3g02660) ; la valyl-ARNt synthétase (AGI n° At5g49030) ; l'isoleucyl-ARNt synthétase (AGI n° At5g49030) ; l'asparaginyl-ARNt synthétase (AGI n° At4g33760) ; la thréoninyl-ARNt synthétase (AGI n° At2g04842) et la lysyl-ARNt synthétase (AGI n° At3g13490).

Les constructions réalisées permettent l'obtention par transcription/traduction *in vitro*, des protéines correspondantes.

Des plasmides dérivés du vecteur pUC19 dans lequel est inséré le gène codant pour l'ARNt<sup>Glu</sup> cytosolique (CTC), mitochondrial (TTC) ou l'ARNt<sup>Gln</sup> cytosolique (CTG), mitochondrial (TTG) ou chloroplastique (TTG) d'*A. thaliana* ont également été utilisés. La construction permet l'obtention par transcription *in vitro* de molécules d'ARNt de taille mature.

## 5.ANTICORPS POLYCLONAUX

### Anti-AdT

Ce sont des anticorps polyclonaux dirigés contre deux sous-unités (GatB 56 kDa et GatA 52 kDa) de l'amidotransférase ARNt-dépendante d'*Arabidopsis thaliana*. Ces anticorps ont été produits à l'animalerie de l'IBMP-IBMC. Les protéines surexprimées ont été préparées par Marc Bailly, et injectées par B. Jessel.

### Anti-UGPase

Ce sont des anticorps polyclonaux dirigés contre une protéine cytosolique de l'orge : l'UDP-Glucose Pyrophosphorylase (51 kDA). Ces anticorps sont produits par la société Agrisera.

### **Anti-PDH**

Ce sont des anticorps dirigés contre une protéine de la matrice mitochondriale du maïs : la pyruvate deshydrogenase E1 $\alpha$  (40 kDA). Ces anticorps ont été fournis par T. Elthon.

### **Anti-LHC II**

Ce sont des anticorps dirigés contre une protéine de l'antenne collectrice de photons (« light harvesting complex ») chloroplastique de *Chlamydomonas.*: (26 kDa). Ces anticorps ont été fournis par G. Bonnard (IBMP).

## **6.OLIGONUCLEOTIDES**

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

## **7.OUTILS INFORMATIQUES**

Comparaisons de séquences, alignements de séquences et analyses de restriction ont été réalisés à l'aide du logiciel MacVector (version 7.2.3).

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

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

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

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

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

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

## Séquences d'ARNt et de gènes d'ARNt :

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

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

## Données de séquençage de génomes mitochondriaux et chloroplastiques :

NCBI

[http://megasun.bch.umontreal.ca/ogmp/projects/other/mt\\_list.html](http://megasun.bch.umontreal.ca/ogmp/projects/other/mt_list.html)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/ORGANELLES/organelles.html>

Données des protéines mitochondriales :

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

Programmes de prédiction de structure :

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

## Logiciels de prédiction d'adressage

<http://urgi.versailles.inra.fr/predotar/predotar.html>

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

<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>

<http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/ihg/mitoprot.html>

<http://cello.life.nctu.edu.tw/>

<http://wolfpsort.org/>

<http://cubic.bioc.columbia.edu/cgi-bin/var/nair/loctree/query>

# **Chapitre II**

## **Méthodes**



## 1. TECHNIQUES SPECIFIQUES A L'ADN

### A-AMPLIFICATION PAR PCR (« POLYMERASE CHAIN REACTION »)

Il s'agit d'une amplification exponentielle de l'ADN réalisée par une série de cycles de type dénaturation-hybridation-élongation avec deux amorces nucléotidiques spécifiques des extrémités du fragment à amplifier. Le milieu réactionnel de 50  $\mu$ L contient :

- 1 à 100 ng d'ADN matrice
- 50 pmoles de chaque oligonucléotide amorce
- 200  $\mu$ M de chaque dNTP
- 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>
- 5  $\mu$ L de **Tampon PCR 10x** (Invitrogen)
- 2,5 U de *Taq* ADN polymérase

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

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

- Une étape de dénaturation de l'ADN : 30 sec à 92°C (3 min lors du premier cycle)
- Une étape d'hybridation des amorces : 30 sec à une température de T<sub>m</sub> -10°C à T<sub>m</sub> -5°C
- Une étape de synthèse de l'ADN : 30 s à 1 min (selon la taille du fragment à amplifier) à 72°C.

### B-MUTAGENESE PAR PCR

En fonction des mutations à introduire, deux techniques de mutagenèse par PCR ont été utilisées :

### 1. Technique 1 (Figure 42A) :

Pour des mutations situées aux extrémités du fragment à amplifier, l'introduction des mutations se fait en une seule étape de PCR en utilisant deux amorces (**Figure 42A** : amorces 1 et 2) portant les mutations.

### 2. Technique 2 (Figure 42B) :

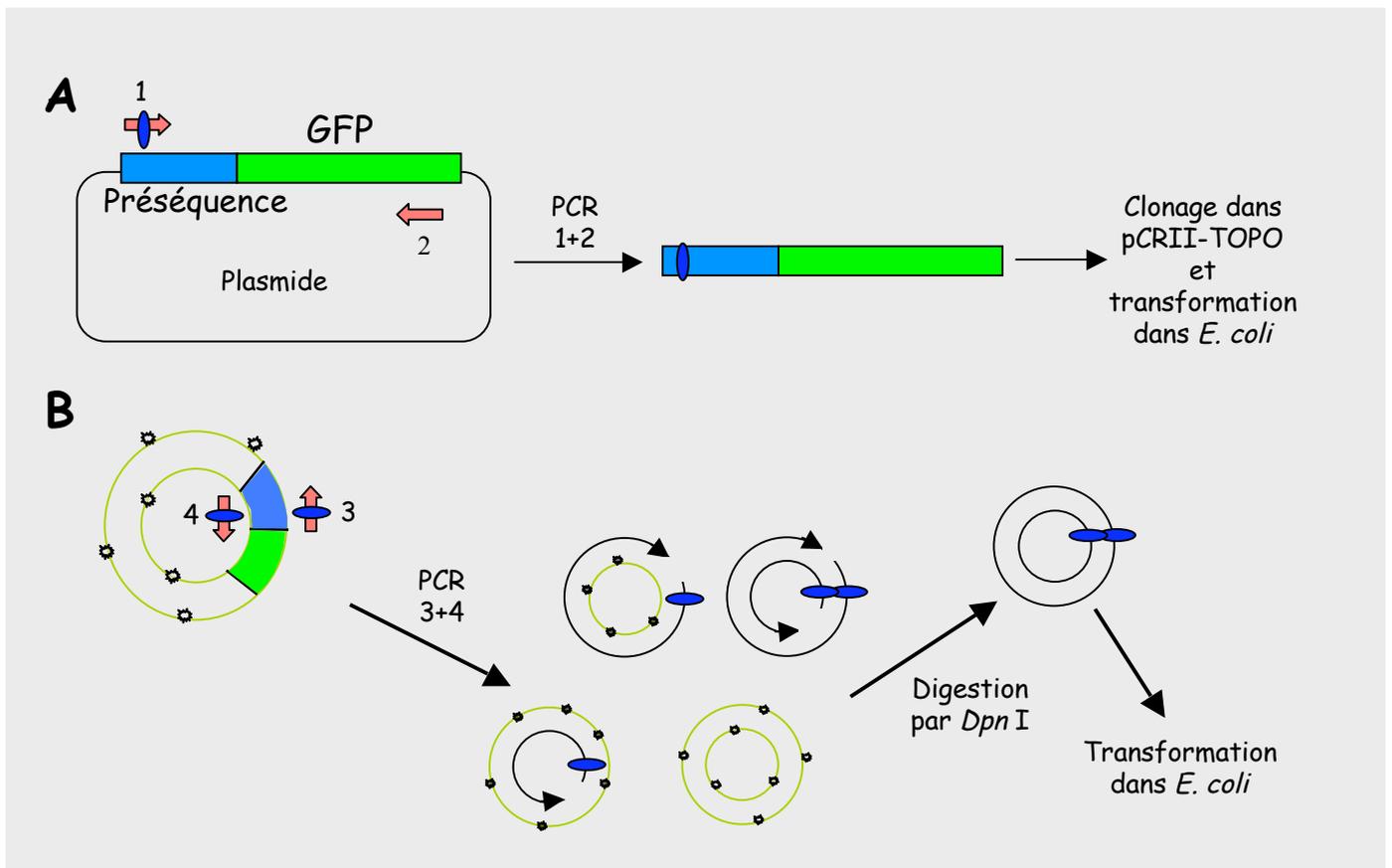
Pour des mutations internes, nous avons utilisé le kit de mutagenèse : « QuickChange site-directed mutagenesis » de Stratagène qui permet d'éviter les étapes de clonage. Dans la réaction de PCR, l'ADN polymérase *PfuTurbo* en présence de l'ADN double brin, réplique avec une haute fidélité les deux brins parentaux à partir des amorces portant la mutation (**Figure 42B** : amorces 3 et 4) et va générer l'ADN portant la mutation. Les produits PCR sont ensuite incubés en présence d'une endonucléase de restriction *DpnI* spécifique des ADN méthylés et hemiméthylés, qui clivera les deux brins d'ADN parentaux. En effet, l'ADN plasmidique isolé à partir des souches bactériennes d'*E. coli* TOP 10F' est méthylé et sera coupé par l'endonucléase *Dpn I*, contrairement à l'ADN synthétisé au cours de l'amplification par PCR qui lui, ne sera pas méthylé. L'ADN muté non digéré est alors utilisé classiquement pour transformer des bactéries.

## C-ELECTROPHORESE SUR GEL D'AGAROSE

Les molécules d'ADN peuvent être séparées en fonction de leur taille par migration électrophorétique sur gel agarose. L'ADN est chargé (1/3 de volume de **tampon de charge**) sur un gel d'agarose (entre 0.8% et 1% (p/v)) dans du **tampon TAE 0,5x**. La migration de l'ADN s'effectue sous une tension de 100 V. Les fragments d'ADN sont ensuite visualisés par fluorescence sous UV grâce au bromure d'éthidium incorporé dans le gel.

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

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



**Figure 42 : Les deux techniques de mutagenèse par PCR.**

L'introduction des mutations se fait en une seule étape de PCR (A) ou en utilisant le kit « QuickChange site-directed mutagenesis » (B).

Avec: mutations oligonucléotides  
 méthylation

## D-PURIFICATION DES FRAGMENTS D'ADN ISSUS DE GELS D'AGAROSE

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

## E-TECHNIQUES DE CLONAGE

### 1. Clonage de fragments coupés par des enzymes de restriction

#### 1.a - Digestion par des enzymes de restriction

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

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

#### 1.b - Déphosphorylation de l'extrémité 5'-phosphate d'un plasmide

Dans le cas où le vecteur est digéré par une enzyme de restriction unique, il faut déphosphoryler l'extrémité 5'-phosphate afin d'éviter la re-circularisation du vecteur sans l'insert. Cette réaction se fait grâce à la phosphatase alcaline de veau CIP (pour « Calf Intestin Phosphatase »). La réaction se fait à 37°C pendant 15 min. L'ADN plasmidique ainsi traité peut être directement utilisé pour l'étape de ligation après l'inactivation de l'enzyme CIP par une extraction phénolique.

#### 1.c - Ligation

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

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

**Tampon de ligation 5x** : Tris-HCl pH 7,6 250 mM - MgCl<sub>2</sub> 50 mM - ATP 5 mM - DTT 5 mM - PEG 8000 25% (p/v).

### 1.d - Préparation des bactéries compétentes

#### - Bactéries compétentes par électroporation

Les bactéries sont cultivées dans 500 mL de milieu LB jusqu'à l'obtention d'une densité optique à 600 nm de 0,5. Puis les cultures sont placées 30 min dans la glace avant d'être centrifugées 10 min à 1500 g. Le culot obtenu est repris dans 50 mL d'eau stérile. Une nouvelle centrifugation est effectuée dans les mêmes conditions et le culot est repris dans 20 mL d'eau stérile. Ensuite les bactéries sont de nouveau soumises à une série de deux centrifugations, mais elles sont cette fois-ci reprise dans un mélange eau/glycérol (10%). Après la dernière centrifugation les cellules sont reprises dans 5 mL du mélange eau/glycérol et laissées 1 heure sur la glace, avant d'être repartie dans des tubes par fraction de 50 µL.

#### - Bactéries compétentes par choc thermique

La souche est cultivée dans 500 mL de milieu LB jusqu'à l'obtention d'une densité optique à 600 nm de 0,35 à 0,4. Elle est alors refroidie dans la glace et la suite des opérations est entièrement réalisée à 4°C. Après centrifugation 10 min à 2700 g, les cellules sont reprises dans 150 mL de CaCl<sub>2</sub>/MgCl<sub>2</sub> stériles (20 mM / 80 mM). Après une nouvelle centrifugation de 10 min à 2700 g, les cellules sont reprises dans 10 mL de CaCl<sub>2</sub> stériles 50 mM et laissées 1 heure dans la glace. A ce stade, les cellules sont considérées comme compétentes, c'est-à-dire aptes à intégrer l'ADN étranger.

### 1.e - Transformation et sélection

#### - Transformation par électroporation

Cette technique est utilisée pour transformer les souches M15 et TG2 d'*Escherichia coli*. Pour cela, un µL de la réaction de ligation est ajouté à 60 µL de bactéries compétentes. Les bactéries sont transformées par électroporation (Electroporateur Bio-Rad 2,5 kV, 25 µF, 200 W) puis reprises dans 500 µL de **milieu LB**. Après une incubation d'une heure à 37°C permettant la régénération de la paroi bactérienne et l'expression du/des gène(s) de résistance codé(s) par le vecteur, les bactéries sont étalées sur des boîtes de Pétri contenant du **milieu LB-Agar**, le ou les antibiotique(s) de sélection en concentration adéquate et s'il s'agit du système de criblage bleu/blanc, 30 µL d'IPTG à 50 mg/mL et 30 µL de X-Gal à 50 mg/mL. Après une nuit à 37°C, les colonies contenant un plasmide recombinant sont blanches.

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

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

#### - Transformation par choc thermique

Cette technique est utilisée pour transformer la souche TOPO10F' d'*Escherichia coli*. et la souche LBA4404 d'*Agrobacterium tumefaciens*. Cette fois, après addition d'un  $\mu\text{L}$  de la réaction de ligation aux bactéries compétentes, le milieu réactionnel est placé 30 min dans la glace avant le choc thermique de 35 sec à 42°C. Puis 250  $\mu\text{L}$  de milieu LB sont ajoutés avant une incubation d'une heure à 37°C pour *E. coli* ou d'une heure trente à 28°C pour *A. tumefaciens*. Les bactéries sont ensuite étalées sur des boîtes de milieu gélosé contenant les antibiotiques adaptés.

## **2. Clonage direct d'un produit PCR**

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

### **2.a - Principe**

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

## 2.b - Méthode

Le produit de la réaction de PCR (2  $\mu\text{L}$ ) est incubé 5 min à température ambiante dans 2  $\mu\text{L}$  d'eau et 1  $\mu\text{L}$  de vecteur pCR<sup>®</sup>II-TOPO. Un  $\mu\text{L}$  de solution saline (1,2 M NaCl, 60 mM MgCl<sub>2</sub>) est ajouté et l'incubation est prolongée de 5 min à température ambiante. La totalité du milieu réactionnel est ajoutée à un tube de bactéries compétentes OneShot<sup>®</sup>TOP 10F' *E. coli*. Les bactéries sont ensuite transformées par choc thermique. La suspension bactérienne (100  $\mu\text{L}$ ) est étalée sur des boîtes de Pétri contenant du **milieu LB-agar**, 100  $\mu\text{g/ml}$  d'ampicilline, de l'IPTG (30  $\mu\text{L}$  à 50 mg/mL) et du X-gal (30  $\mu\text{L}$  à 50 mg/mL). Après une nuit d'incubation, les bactéries transformées sont identifiées par le principe du criblage blanc/bleu.

## F-CRIBLAGE DE COLONIES PAR PCR

Cela consiste à vérifier la présence du fragment d'ADN d'intérêt par réaction de PCR directement à partir de colonies bactériennes. Pour cela, un milieu réactionnel de 20  $\mu\text{L}$  proportionnel à un milieu de PCR de base est préparé avec les amorces permettant d'identifier l'insert, puis les bactéries d'une colonie sont transférées dans ce milieu à l'aide d'un cure-dent. Les étapes et nombres de cycles sont les mêmes que pour la PCR (cf. II.1.A). La première étape de dénaturation de 3 min à 94°C suffit à lyser les bactéries et à libérer l'ADN.

## G-PREPARATION DE L'ADN PLASMIDIQUE

### 1.Minipréparation d'ADN plasmidique

Le kit de minipréparation Nucleospin<sup>®</sup> Plasmid (Macherey-Nagel) a été utilisé. Il utilise le principe de la lyse alcaline (Birnboim and Doly, 1979) suivie d'une purification sur colonne. Les termes mini et midi désignent le volume de départ de la culture bactérienne. Pour une minipréparation, il s'agit de 2 ml de milieu de culture. Le protocole expérimental fourni avec le kit a été suivi à la lettre.

### 2.Midipréparation d'ADN plasmidique

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

## H-SEQUENÇAGE DE L'ADN

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

## I-MARQUAGE D'OLIGONUCLEOTIDES

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

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

**Tampon PNK 10x** : Tris-HCl pH 7,6 500 mM - MgCl<sub>2</sub> 100 mM - DTT 50 mM - spermidine 1 mM - EDTA 1 mM.

Après incubation, le volume est ajusté à 50  $\mu\text{L}$  d'eau et la radioactivité non incorporée est éliminée par chromatographie d'exclusion sur une colonne de Séphadex G50 (seringue de 1 mL). La colonne est séchée par centrifugation 30 sec à 200 g. La solution est déposée et éluée dans les mêmes conditions.

## 2.TECHNIQUES SPECIFIQUES A L'ARN

### A.EXTRACTION D'ARNt

#### 1.ARNt totaux

Pour extraire les ARNt totaux de tubercules de pommes de terre, 12 mL de jus de broyage sont mélangés à 18 mL de phénol saturé en eau et à du **tampon d'extraction**. Après

2 heures de vortex, le tout est centrifugé 20 min à 15000 g. La phase aqueuse est ensuite mise à précipiter pendant environ 1 heure à  $-20^{\circ}\text{C}$  en présence de 2,5 volumes d'éthanol et de 0,1 volume d'acétate de sodium pH 4,5 1M. Après remise en solution du culot dans de l'eau, les grands acides nucléiques sont culotés par une précipitation au lithium (LiCl 3,3M ; Tris-HCl 33mM pH 7,5). Après centrifugation 20 min à 15000 g, la phase aqueuse est récupérée et d'autres extractions au phénol saturé en eau sont réalisées jusqu'à ce que l'interface soit propre. Enfin, les ARNt contenus dans les phases aqueuses sont prélevés et concentrés grâce à une dernière précipitation éthanolique avant d'être repris dans un volume minimum d'eau.

Des ARNt totaux sont également extraits à partir de feuilles d'*A. thaliana*. Ces organes sont broyés au mortier dans de l'azote liquide, la poudre est ensuite reprise dans du **tampon d'extraction**, à raison de 3 mL de tampon pour 1 g de poudre. L'extraction se poursuit ensuite comme dans le cas des ARN de tubercules de pomme de terre.

**Tampon d'extraction** : Tris-HCl pH 7,5 10 mM -  $\text{MgCl}_2$  10 mM - SDS 1% (p/v)

## 2. ARNt mitochondriaux et chloroplastiques

Les organites culotés (100  $\mu\text{g}$  équivalent protéines) sont repris dans 100  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$ ) et mise à précipiter à  $-20^{\circ}\text{C}$  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  $\mu\text{L}$  d'eau.

## B-ELECTROPHORESE DENATURANTE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE

La migration sur gel de polyacrylamide est utilisée pour la séparation des molécules d'ARN. Le gel (8 x 12 x 0,03 cm) est préparé à partir d'une solution d'acrylamide/N,N' méthylène bisacrylamide (19/1) de 15% et 7 M urée (dénaturant) dans du **tampon TBE 1x**. La polymérisation du gel est catalysée par l'addition d'APS (0,1% (p/v)) et de TEMED (0.035% (v/v)). Avant dépôt, les acides nucléiques sont additionnés d'un volume de **tampon de charge**. La migration s'effectue sous 25 mA dans le **tampon TBE 1x**. Le bleu de bromophénol et le xylène cyanol constituent des témoins de migration (l'équivalence en

nucléotides (nt) dépend de la concentration du gel : 15 et 60 nt sur un gel 15%). Les acides nucléiques sont ensuite visualisés après transfert, par coloration de la membrane au bromure d'éthidium.

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

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

## C-« NORTHERN BLOT »

### 1. Transfert des ARN

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

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

### 2. Hybridation de la sonde

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

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

## D-TRANSCRIPTION *IN VITRO*

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

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

**Tampon de transcription 5x** : HEPES-KOH pH 7,5 400 mM - MgCl<sub>2</sub> 120 mM - spermidine 10 mM - DTT 200 mM,

**Mix enzymatique** : T7 RNA polymérase - pyrophosphatase - inhibiteur de RNase

## E-DETERMINATION DE L'ACTIVITE AMINOACCEPTRICE DES ARNt

### 1.Préparation des extraits enzymatiques

#### 1.a - Extrait enzymatique total de feuilles d'*A. thaliana*

L'extrait enzymatique contenant les aminoacyl-ARNt synthétases est obtenu (selon le protocole décrit par (Maréchal-Drouard et al., 1995) à partir de la partie aérienne de plants d'*A.thaliana*. Dix grammes sont broyés dans un mortier avec de l'azote liquide en présence de 2 mL d'un **tampon enzyme 5x**, contenant 5 mM de  $\beta$ -mercaptoéthanol, 0,5 mM de phénylméthylsulfonyl fluoride et 80  $\mu$ L de cocktail anti-protéases Complete<sup>TM</sup> (Boehringer-Mannheim). Le broyat est centrifugé 20 min à 48000 g et le surnageant (environ 10 ml) est amené à 0,15 M NaCl et 50 mM Tris-HCl pH 7,5. Ce liquide est déposé sur une colonne de DEAE-cellulose (5 ml) pré-équilibrée avec **du tampon enzyme 1x** contenant 0,15 M NaCl et 5 mM  $\beta$ -mercaptoéthanol. Cette étape permet à la fois l'élimination des ribosomes et des ARNt. Les premières fractions (environ 4mL) correspondant à l'exclu ne sont pas conservées tandis que les fractions suivantes (environ 4 mL) contenant les protéines sont déposées sur 4 colonnes de Sephadex G75 (1 mL par colonne). Les colonnes sont préalablement équilibrées avec **du tampon enzyme 1x** contenant 5 mM  $\beta$ -mercaptoéthanol et séchées juste avant

emploi par centrifugation de 10 min à 200 g. Après centrifugation dans les mêmes conditions, les 4 éluats sont supplémentés en leupeptine (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ),  $\alpha$ 2-macroglobuline 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,  $\beta$ -mercaptoéthanol 5 mM, phénylméthylsulfonyl fluoride 0,5 mM et 160  $\mu\text{L}$  de cocktail anti-protéases Complete™ afin de protéger l'extrait protéique de la dégradation. 10% de propanediol sont ajoutés pour la congélation de l'extrait à  $-80^\circ\text{C}$  sous forme d'aliquotes de 500  $\mu\text{L}$ .

**Tampon enzyme 5x** : Tris-HCl pH 7,5 250 mM -  $\text{MgCl}_2$  50 mM - glycérol 50% (v/v) - EDTA 5 mM

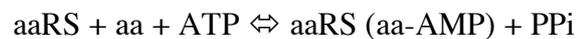
### 1.b - Extraits enzymatiques de mitochondries (*S. tuberosum*/*A. thaliana*), de chloroplastes (*A. thaliana*)

L'extrait enzymatique est obtenu en ajoutant à un volume d'organites préalablement préparés un volume de **tampon enzyme 2x**. L'extrait est ensuite congelé et décongelé dans de l'azote liquide, puis soniqué 30 sec pour casser les membranes mitochondriales ou chloroplastiques qui se trouvent dans le culot après centrifugation (30 min à 20000 g). Les étapes suivantes se font comme pour la préparation de l'extrait enzymatique de cellules entières.

## 2.Aminoacylation *in vitro*

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

-Etape d'activation :



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



L'activité aminoacceptrice de l'ARNt est déterminée à partir d'une incubation à  $37^\circ\text{C}$  dans un volume réactionnel de 75  $\mu\text{L}$  comprenant :

-12,75  $\mu\text{L}$  de **milieu M17**

-1,125  $\mu\text{L}$   $\text{MgCl}_2$  1 M

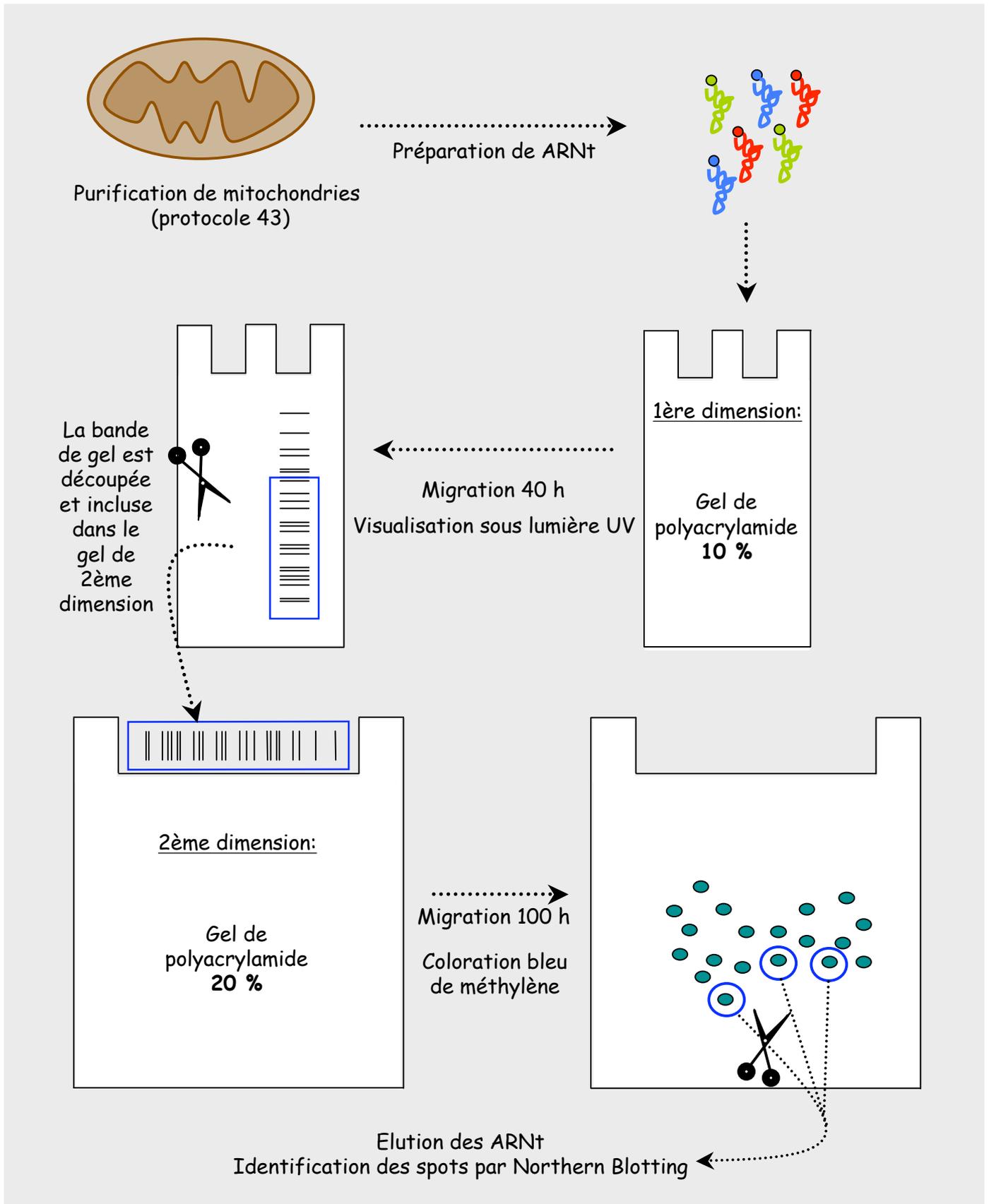
- 3  $\mu\text{g}$  d'ARNt transcrit ou de 10  $\mu\text{g}$  d'ARNt extraits de plantes (ARNt mitochondriaux, ARNt totaux ou ARNt chloroplastiques)
- 3.5  $\mu\text{Ci}$  de glycine tritiée ( $[^3\text{H}]\text{Glu}$  ou ( $[^3\text{H}]\text{Gln}$ )
- 5  $\mu\text{g}$  d'extrait enzymatique

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

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

### 3. Amidation *in vitro*

L'amidation a été réalisée en collaboration avec Marc Bailly, à l'IBMC. Le milieu réactionnel de 50  $\mu\text{L}$  renferme : 100 mM de tampon Na-Hepes pH 7,2, 10 mM d'ATP, 12 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 30 mM de KCl, 2 mM de L-Gln, 100 pmol de  $[\text{C}^{14}]\text{Asp-ARNt}$  ou 10 pmol de  $[\text{C}^{14}]\text{Glu-ARNt}$  et 1  $\mu\text{M}$  d'AdT purifiée d'*A. thaliana* ou 15  $\mu\text{g}$  d'extrait brut mitochondrial ou chloroplastique. Après 15 min d'incubation à 37°C, la réaction est stoppée par extraction au phénol, puis au chloroforme. La phase aqueuse, prélevée après centrifugation, est ajustée à 50 mM de KOH, incubée 30 min à 70°C pour libérer l'acide aminé, puis neutralisée par ajout de 50 mM d'HCl. Le milieu est évaporé sous vide, le dépôt sec est repris dans 5  $\mu\text{l}$  d'eau, puis les produits formés sont analysés par dépôt de 1  $\mu\text{L}$  sur plaque de cellulose (Macherey Nagel). Au bout de 12 h de migration dans le solvant isopropanol/acide formique/eau, (80/10/10/4, v/v/v/v), la plaque est séchée, exposée sous une plaque accumulatrice de rayonnement (Image Plate type Bas III Fuji) qui est révélée dans un analyseur de bio-image (Fujix- Bas 2000, Fuji), piloté par le logiciel Mac Bas. Les aa sont identifiés par co-migration d'aa radioactifs témoins.



**Figure 43 : Fractionnement des ARNt par électrophorèse bidimensionnelle sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes.**

## F-FRACTIONNEMENT DES ARNT PAR ELECTROPHORESE BIDIMENTIONNELLE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE EN CONDITIONS DENATURANTES

La technique d'électrophorèse bidimensionnelle sur gel de polyacrylamide, mise au point par Fradin et coll. (Fradin et al., 1975) s'est avérée être un outil puissant pour la purification des ARNt isoaccepteurs. Depuis, cette technique a permis notamment la purification des ARNt de mitochondries de levures (Martin et al., 1977). Les conditions décrites par (Steinmetz, 1985), lors de la purification des ARNt chloroplastiques, ont été utilisées ici pour la purification des ARNt de mitochondries de pomme de terre. Les ARNt sont d'abord séparés par migration électrophorétique dans une première dimension sur gel de polyacrylamide 10 %, à pH 8,3 et en urée 4 M ; puis dans une deuxième dimension perpendiculaire à la première sur gel de polyacrylamide à 20 % à pH 8,3 et en urée 4 M. Les taches de ARNt sont colorées ; les ARNt sont extraits des taches puis identifiés par aminoacylation (**Figure 42**).

### 1.Préparation des gels de polyacrylamide et électrophorèse

L'électrophorèse de la première dimension est effectuée dans un **gel de polyacrylamide 10 %** dont les dimensions sont les suivantes : 40 x 20 x 0,4 cm. La solution d'ARNt à déposer est additionnée d'un volume égal de xylène cyanol 0,1 % (P/V), saccharose 60% (P/V), EDTA 2,5 mM, acétate de sodium pH 4,5 10 mM, urée 8 M. Il est possible de fractionner convenablement environ 300 µg d'ARNt total sur ce type de gel. La migration se fait à 4°C, sous une tension de 450 volts, pendant 40 heures (le xylène est alors à 2-3 cm du bas du gel).

Après migration, le gel est posé sur une plaque de cellulose renfermant un indicateur de fluorescence (Polygram Cel 400-U.V.-254-Macherey-Nagel, Duren, RFA) et les bandes d'ARNt sont visualisées sous lumière U.V.. La bande de gel renfermant les ARNt est découpée puis incluse, selon un sens perpendiculaire au sens de migration de la première dimension, dans un **gel de polyacrylamide 20 %** dont la polymérisation se fait en chambre froide. L'électrophorèse en deuxième dimension se fait à 4°C, pendant environ 100 heures et sous une tension de 300 volts.

**Gel de polyacrylamide 10 % :** 10 % acrylamide (P/V) - 0,4 % bisacrylamide (P/V) – 4 M urée - 0,08 M TEB (tris-borate pH 8,3 0,09 M, EDTA 2,5 mM) - peroxydisulfate d'ammonium (P/V) - TEMED 0,1 % (V/V).

**Gel de polyacrylamide 20 % :** 20 % acrylamide (P/V) - 0,8 % bisacrylamide (P/V) – 4 M urée - 0,09 M TEB - peroxydisulfate d'ammonium (P/V) - TEMED 0,1 % (V/V).

## 2. Détection et élution des ARNt

La technique de coloration utilisée est celle décrite par (Peacock and Dingman, 1967), avec quelques modifications. Après migration, les taches d'ARNt sont détectées par coloration du gel dans une solution de bleu de méthylène 0,2 %, acétate de sodium 0,2 M pH 4,8, pendant 5 à 10 minutes, puis décoloration sous l'eau courante pendant 30 à 60 minutes. Les ARNt apparaissent comme des taches de couleur bleue foncée. Les fragments de gel contenant les ARNt sont ensuite découpés, broyés et les ARNt sont extraits du gel avec 300 à 500 µl d'un tampon d'élution : acétate d'ammonium 0,5 M, acétate de magnésium 10 mM, EDTA 0,1 mM, SDS 0,1 % (Maxam and Gilbert, 1977). L'élution se fait sous agitation mécanique, à température ambiante, durant 15 à 16 heures. Après addition d'un volume égal de phénol saturé en eau, l'ensemble est agité quelques minutes. La phase aqueuse est récupérée après centrifugation, dans une centrifugeuse de table Janetzki, à vitesse maximale. Les ARNt, débarrassés du tampon et du phénol par deux précipitations éthanoliques successives en présence de 5 µl d'ATP entraîneur 0,1 M, pH 4,8, sont remis en solution dans de l'eau. L'identification des ARNt est effectuée par aminoacylation d'une aliquote de la solution de ARNt.

## 3. QUANTIFICATION DE L'ADN ET DE L'ARN

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

-1  $A_{260}$  équivaut à 50 µg/mL d'ADN double brin

-1 A<sub>260</sub> équivaut à 33 µg/mL d'un oligonucléotide (20 nt)

-1 A<sub>260</sub> équivaut à 40 µg/mL d'ARN ou d'ADN simple brin.

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

## 4. TECHNIQUES RELATIVES AUX PROTEINES

### A-QUANTIFICATION DES PROTEINES

La quantification des protéines est faite par la méthode de Bradford. Cette méthode est basée sur la modification de la longueur d'onde d'absorption du bleu de Coomassie G-250 en milieu acide après sa fixation sur les acides aminés (595 nm) (Bradford, 1976). Huit cent µL de réactif de Bradford (BioRad) sont mélangés à l'extrait protéique à quantifier et l'absorbance est mesurée à 595 nm. Cette mesure de DO permet de déterminer la quantité de protéines présentes en se référant à une gamme étalon de BSA établie avec des quantités connues. Il est à noter que les échantillons contenant des détergents tels que le SDS ou le Triton X-100 en quantité importante ne peuvent être quantifiés par cette méthode car ces derniers interfèrent avec le réactif de Bradford.

La quantité de mitochondries utilisées lors des différentes expériences a été évaluée par cette technique et il s'agira en fait de mg d'équivalents en protéines mitochondriales lorsque dans le texte nous parlerons de mg de mitochondries.

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

## **B-TECHNIQUES DE CONCENTRATION DES PROTEINES : CELLULE DE CONCENTRATION (« CENTRIFUGAL FILTER DIVICES » AMICON CORPORATION)**

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

## **C-ELECTROPHORESE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE**

### **1.Électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)**

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

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

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

**Gel de séparation** : Acrylamide 10 à 15% selon la taille des protéines à fractionner - Tris-HCl pH 8,8 100 mM - SDS 0.1% (p/v)

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

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

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

## 2. Détection des protéines après fractionnement électrophorétique

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

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

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

## D-IMMUNOREVELATION DE TYPE « WESTERN BLOT »

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

### 1. Transfert des protéines sur membrane

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

**Tampon de transfert** : Tris 48 mM - glycine 39 mM

## 2. Coloration des protéines après électrotransfert sur membrane

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

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

## 3. Fixation des anticorps

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

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

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

## 4. Révélation de la fixation des anticorps

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

## E-PURIFICATION DES ANTICORPS

### 1.Obtention de l'anticorps anti-AdT

L'immunisation de lapins en vue de l'obtention d'anticorps polyclonaux à été réalisée par B. Jessel à l'animalerie de l'IBMP-IBMC. Les protéines surexprimées par Marc Bailly ont été purifiées et injectées à deux lapins.(3 injections de xxµg de protéines dans de l'adjuvant de freund (complet pour la première injection et incomplet pour les suivantes), une injection toutes les deux semaines). A partir de la quatrième injection, des saignées sont réalisées en alternance avec les injections. Après la dernière injection, les lapins sont saignés à blanc.

### 2.Purification des anticorps anti-AdT

Les anticorps spécifiques ont été purifiés sur colonne d'affinité. La colonne est constituée d'une matrice de Sepharose-CNBr (CNBr-activated Sepharose 4B, Amersham Pharmacia Biotech) activée par de l'HCl 1 mM sur laquelle est ensuite fixé le peptide antigène. Puis 400 µg de polypeptide purifié, repris dans 700 µL de **tampon de couplage**, est couplé à la matrice une nuit à 4°C. Les fonctions cyanogènes de la matrice réagissent avec les aminés primaires du polypeptide de manière à former des liaisons covalentes. Après lavage dans 5 mL de tampon de couplage, les sites restés libres sont bloqués par addition de Tris-HCl 0,1 M pH 8,0 pendant 2 h à température ambiante. La matrice est ensuite retenue sur une colonne puis lavée avec 3mL de **tampon S1** puis 3mL de **tampon S2** pour éliminer les polypeptides non couplés.

Le sérum à purifier (2mL), dilué 10 fois dans le tampon PBS 10X, est centrifugé à 10 000g pendant 10 min puis le surnageant est chargé sur la colonne. La matrice est lavée avec 20 mL de tampon PBS 1X.

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). 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%.

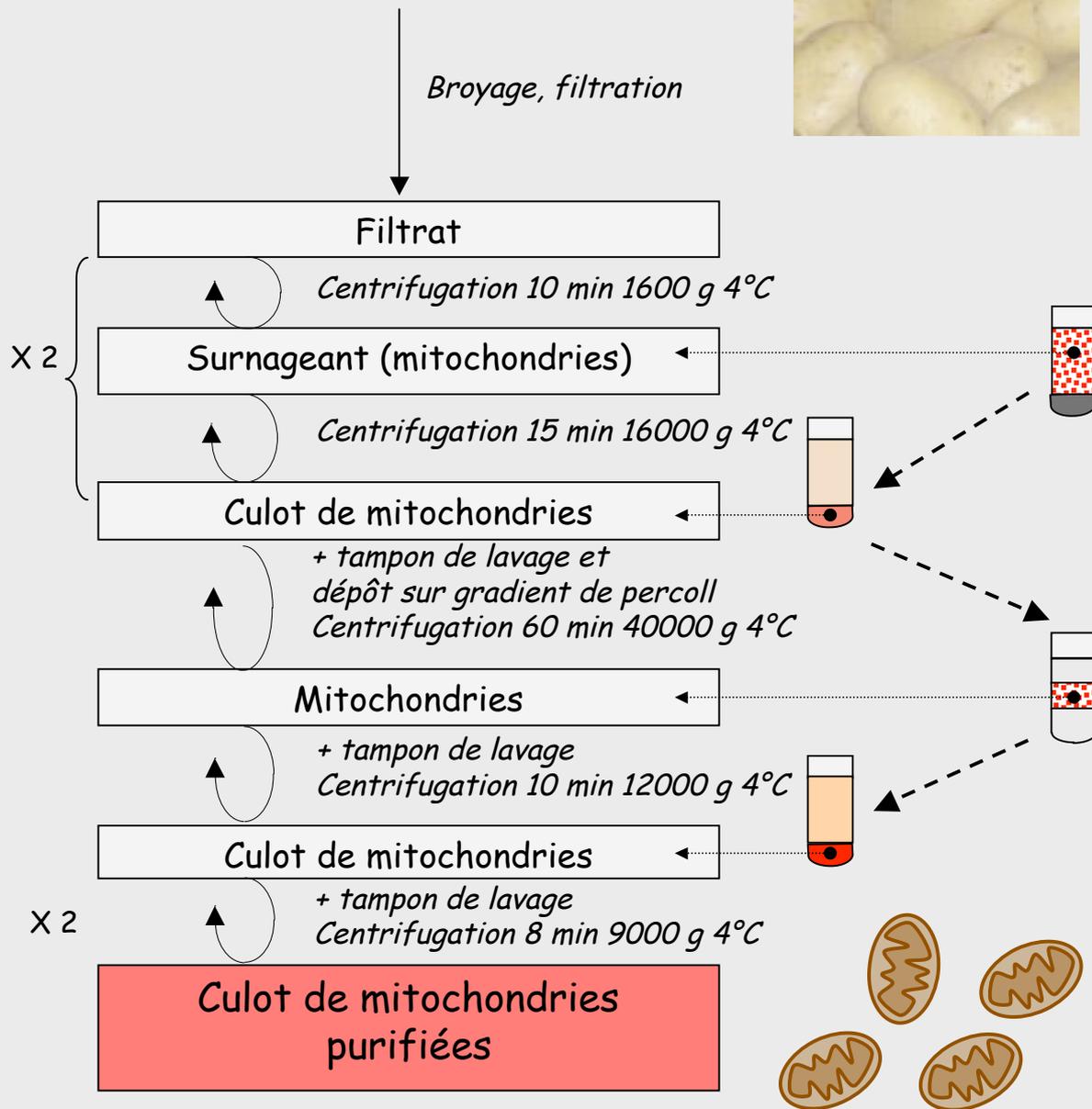
**Tampon de couplage:** 0,1M NaHCO<sub>3</sub> - 0,5 M NaCl pH 8,3

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

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

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

## Tubercules de pommes de terre



**Figure 44:** Les différentes étapes de purification des mitochondries de pommes de terre.

## F.SUREXPRESSON DE PROTEINES DANS *E.COLI*

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

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

## 5.TECHNIQUES RELATIVES AUX ORGANELLES DE PLANTES

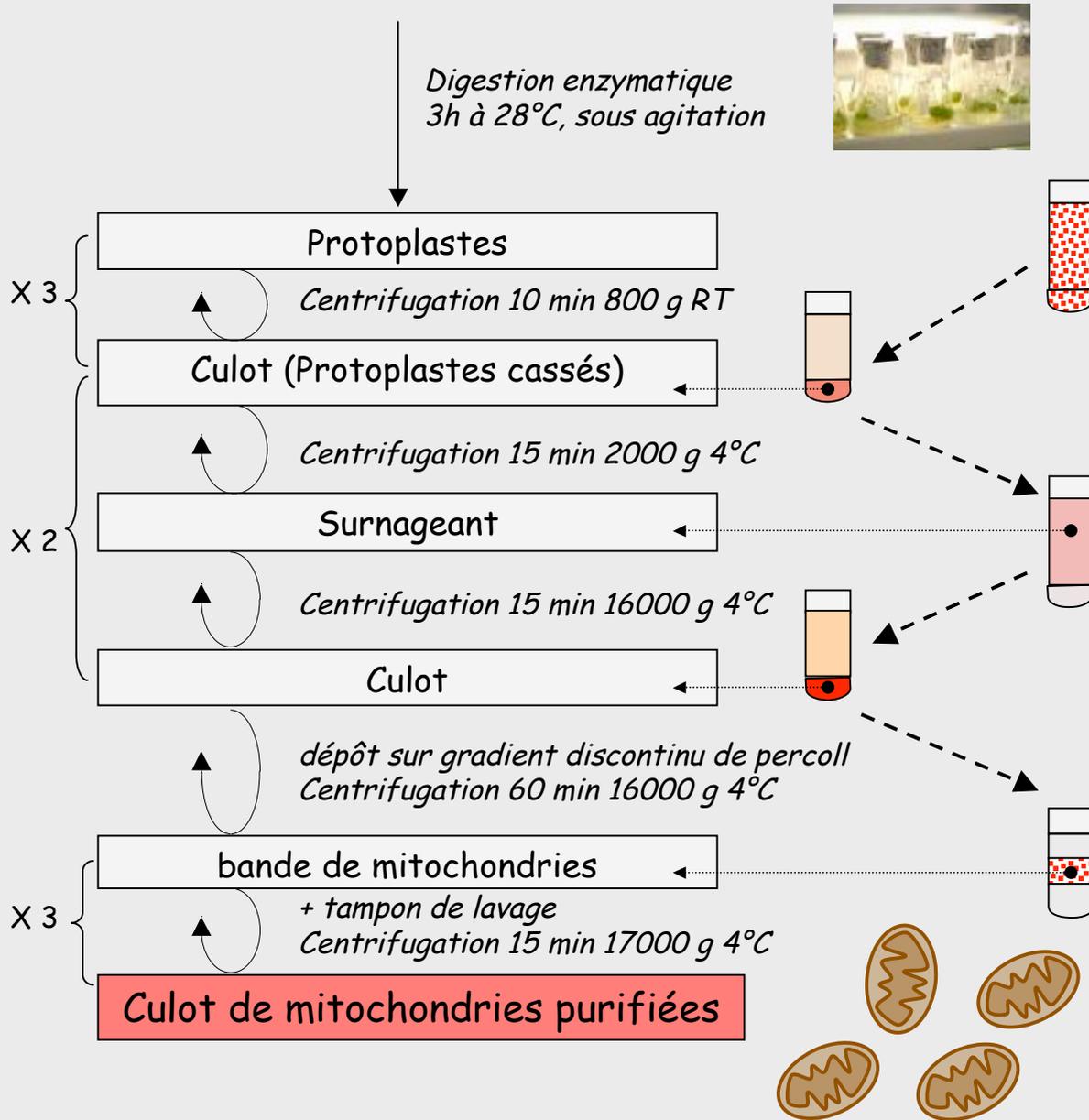
### A-PURIFICATION DES ORGANITES

#### 1.Purification des mitochondries

##### 1.a - Mitochondries de *S. tuberosum* (Figure 44)

Ce protocole est une combinaison des techniques décrites par (STRUGLICS, 1993 (Neuburger et al., 1982). Le rendement est d'environ 10-15 mg de protéines mitochondriales par kg de tubercules de pommes de terre. Toutes les étapes se déroulent à 4°C. Les tubercules sont pelés, coupés en morceaux. Pour 5 kg de tubercules, la quantité de jus obtenue au moyen d'une centrifugeuse à jus (type Moulinex) est d'environ 2 L. Ce jus est récolté directement dans 1 L de **tampon d'extraction 3x**. Le pH est maintenu à 7,5 au cours de ces opérations par addition de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1 M. Il est préférable de laisser décanter la solution quelques minutes pour faire précipiter l'amidon avant de la filtrer sur une toile de Nylon de 46  $\mu\text{m}$  de diamètre

## Culture de cellules blanches d'*Arabidopsis thaliana*



**Figure 45:** Les différentes étapes de purification des mitochondries d'*Arabidopsis thaliana*

de maille. La solution est ensuite enrichie en mitochondries par une série de centrifugations différentielles à basse vitesse (1600 g, rotor Beckman J6B) pour éliminer l'amidon résiduel et les débris cellulaires, puis à haute vitesse (16000 g, rotor Beckman JA10.5 puis JA25.5) répétées deux fois. Les mitochondries sont enfin purifiées sur des **gradients de percoll** de 30 mL (40000 g pendant 60 min, rotor Beckman JA25.5). Trois lavages successifs avec le **tampon de lavage** permettent l'élimination du percoll. Pour une utilisation ultérieure, les mitochondries sont culotées, congelées dans l'azote liquide et conservées à -80°C.

Nous utilisons également un deuxième protocole qui utilise le même principe mais qui permet la purification de petites quantités de mitochondries de pomme de terre (300 g de tubercules sont utilisés). Dans ce protocole, les mitochondries sont purifiées sur des gradients de percoll de 3 mL (40000 g pendant 15 min, rotor Beckman TLA-100).

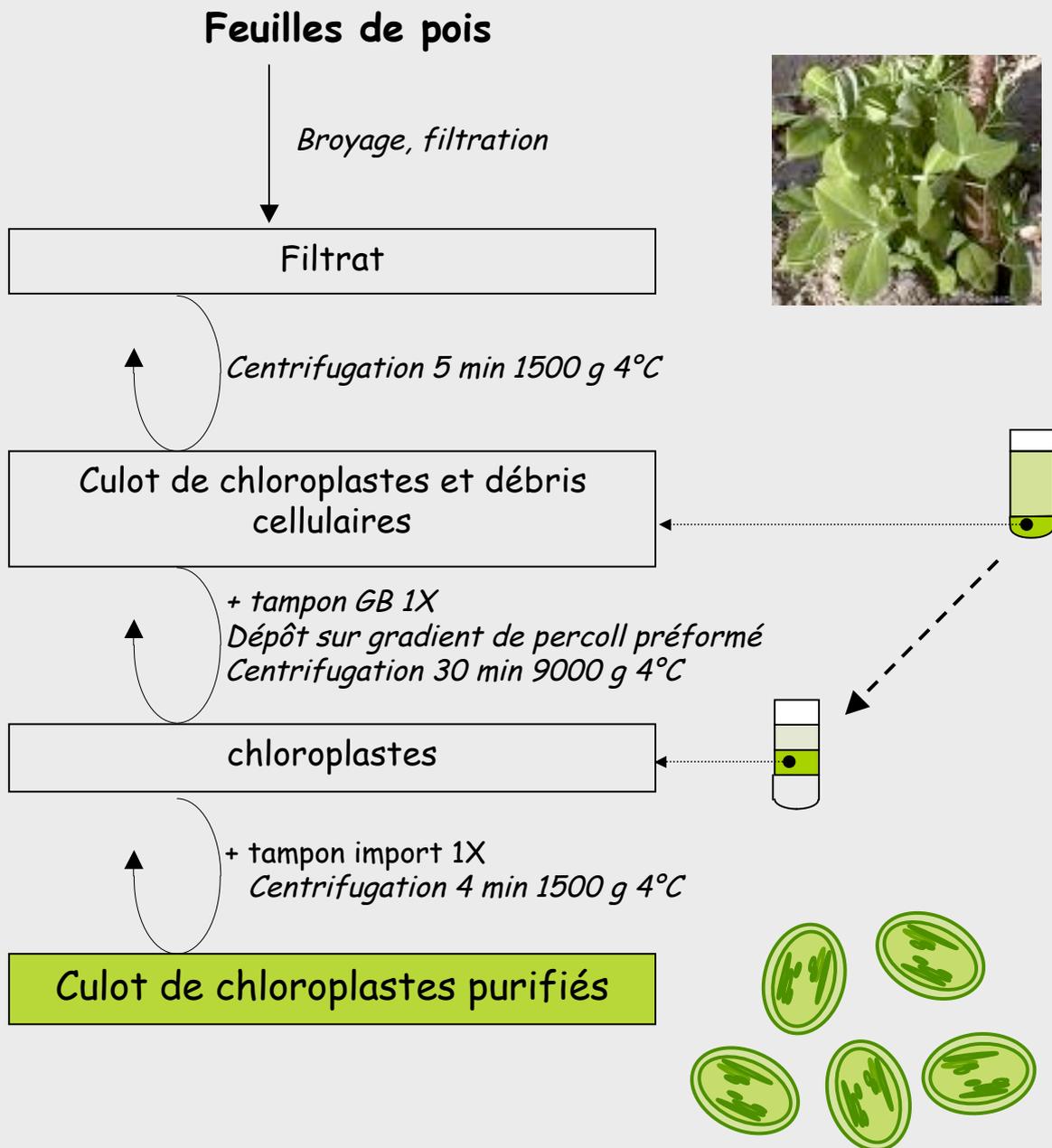
**Tampon d'extraction 3x** : Saccharose 0,9 M - diphosphate de sodium pH 7,5 90 mM - EDTA 6 mM; PVP 25k 2,4% (p/v) - cystéine 0,15% (p/v), glycine 15 mM, BSA 0,9% (p/v),  $\beta$ -mercaptoéthanol 6 mM

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

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

### 1.b - Mitochondries d'*A.thaliana* (Figure 45)

Les mitochondries ont été isolées de cultures cellulaires blanches d'*A.thaliana* âgées de 5 jours. Pour cela, 5 cultures de 200 mL sont filtrées à travers un filtre de nylon de 100  $\mu$ m de maille. Les cellules retenues sur le filtre (environ 70 g) sont reprises dans une **solution enzymatique**, et sont mises pendant 3h à 25°C sous agitation à 45 rpm, dans le noir. Ce traitement permet la dégradation de la paroi. La suspension de protoplastes ainsi obtenue est centrifugée 10 min à 800 g puis lavée trois fois dans la **solution I**. Puis les protoplastes sont remis en suspension dans 50 mL de **tampon d'extraction**. Ils sont ensuite cassés par trois passages au travers d'un filtre de nylon de 45, 30 puis 10  $\mu$ m. Le filtrat est centrifugé 15 min à basse vitesse (2000 g, rotor Beckman J6B). Le surnageant récupéré est centrifugé 15 min à 16000 g (rotor Beckman JA10.5). Le culot est repris dans du **tampon d'extraction** et une nouvelle série de centrifugations basses vitesses (2000 g, rotor Beckman J6B)/ hautes vitesses (16000 g, rotor Beckman JA10.5) est réalisée. Le culot est finalement repris dans un



**Figure 46:** Les différentes étapes de purification des chloroplastes à partir de pois

minimum de **tampon de lavage** avant d'être déposé sur un gradient discontinu formé par 3 niveaux de **solutions de percoll 18%**, **23%** et **40%** (respectivement 10, 12 et 10 mL). Après centrifugation (1 heure à 40000 g, rotor Beckman JA25.5), la bande blanche de mitochondries à l'interphase 18%-23% est prélevée. Ces dernières sont lavées 3 fois 15 min à 17000 g (rotor Beckman JA25.5) avec du **tampon de lavage** pour éliminer le percoll. Les mitochondries sont, soit utilisées directement, soit congelées dans l'azote liquide et conservées à  $-80^{\circ}\text{C}$  pour une extraction ultérieure des ARN.

**Solution enzymatique** : Pectolyase Y23 0,1% - cellulase RS Ozonuka 1% - mannitol 0,4 M - MES pH 5,7 3,5 mM.

**Solution I** : Mannitol 0,4 M - MES pH 5,7 3,5 mM.

**Tampon d'extraction**: Saccharose 0,4 M - Tris-HCl pH 7,5 50 mM - EDTA 3 mM - BSA 0.1% (p/v) - DTT 2 mM

**Tampon de lavage** : Saccharose 0,3 M - MOPS/KOH pH7,2 10 mM - EGTA 1 mM, pH 7,2

**Solution de percoll 18%** : percoll 18% (v/v) - saccharose 0,3 M - MOPS/KOH pH7,2 50 mM

**Solution de percoll 23%** : percoll 23% (v/v) - saccharose 0,3 M - MOPS/KOH pH7,2 50 mM

**Solution de percoll 40%** : percoll 40% (v/v) - saccharose 0,3 M - MOPS/KOH pH7,2 50 mM

### 1.c - Mitochondries de *P. sativum*

Les mitochondries sont obtenues à partir de feuilles de plantules de pois préalablement placées à l'obscurité 15 à 20 heures. Vingt grammes de feuilles de pois sont broyées en présence de 60 mL de **tampon de broyage 1X** dans un mixeur de type Waring Blendor, par trois mises en route d'environ 10 secondes de l'appareil à basse vitesse. Ce broyat est filtré sur une toile de nylon de 45  $\mu\text{m}$  de diamètre. Le reste du protocole est le même que celui utilisé pour les mitochondries de pommes de terre.

## 2.Purification des chloroplastes

### 2.a - Chloroplastes de *P. sativum* (Figure 46)

La purification des chloroplastes est réalisée selon le protocole décrit par Bruce et al. (Bruce et al., 1994). Les feuilles de pois sont broyées comme au cours de la préparation de

mitochondries de pois, dans le **tampon GB 1X**. Toutes les étapes se déroulent à 4°C. Le broyat obtenu est filtré sur 6 couches de gaze et le filtrat est centrifugé 5 min à basse vitesse (1500 g, rotor Beckman JA25.5). Le culot est repris dans un minimum de **tampon GB 1X** et déposé sur des **gradients de percoll préformés**. L'ensemble est centrifugé 30 min, à 9000 g sans frein, puis les bandes correspondant aux chloroplastes intacts, situées dans le bas du tube, sont prélevées et diluées trois fois avec du **tampon IB 1X**. Ce mélange subit une dernière centrifugation de 4 min à 1500 g. Les culots ainsi obtenus sont repris dans 300 µL de **tampon IB 1X**.

La quantité de chloroplastes est évaluée par dosage de la chlorophylle. Celui-ci s'effectue en diluant 10 µL de suspension de chloroplastes dans un mL d'acétone 80%.

La concentration de la chlorophylle est estimée par la formule suivante (Robinson, 1988) :

$$[\text{Chlorophylle (mg/mL)}] = (20,2 \times A_{645}) + (8,02 \times A_{660})$$

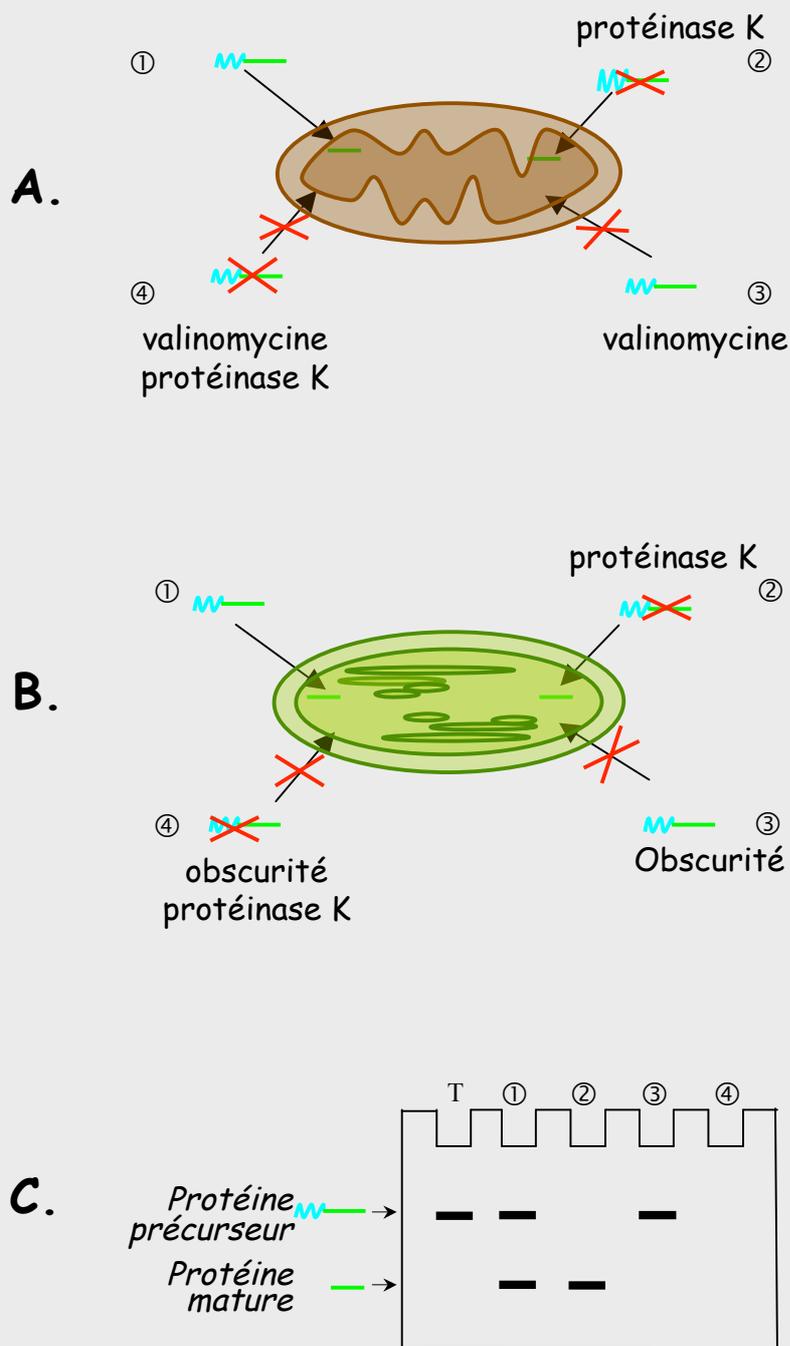
**Tampon GB 1X** : Hepes pH 7,3 50 mM - sorbitol 330 mM - BSA 0,1% (p/v) - MgCl<sub>2</sub> 1 mM - MnCl<sub>2</sub> 1 mM - EDTA 2 mM - glutathion réduit 1 g. L<sup>-1</sup>.

**Tampon IB 1X**: Hepes pH 7,2 50 mM - sorbitol 330 mM.

**Gradients percoll préformés** (par une centrifugation de 35 min à 40000 g sans frein, Beckman JA2.5): percoll 50% (v/v) dans Tampon GB 1X.

## 2.b - Chloroplastes d'*A.thaliana*

Ce protocole a été mis au point à partir du protocole de (Demarsy et al., 2006). Les chloroplastes sont obtenus à partir des feuilles de jeunes plantules âgées de six semaines. Elles sont broyées, en chambre froide en présence de **tampon HB**. Le broyat est filtré sur quatre épaisse couches de gaze et sur une toile à blutter de 45 µm de maille, puis centrifugé 3 minutes à 5000g. Le culot de chloroplastes est repris dans 4 mL de **tampon RB** et déposé sur un **coussin de percoll 40%**. Après 5 minutes de centrifugation à 5 000 g, les chloroplastes cassés et autres résidus forment une bande située dans la partie supérieure du gradient, à la limite du coussin. Les chloroplastes intacts eux, sédimentent. Ils sont donc repris dans 6 volumes de tampon RB et centrifugés 3 minutes à 5000 g pour éliminer le percoll. Enfin le culot de chloroplastes est repris dans un volume minimum de tampon RB, la concentration de la chlorophylle étant préalablement estimée (cf.II.5.A.2.a). Ils sont ensuite congelés à sec à -80°C.



**Figure 47: Expériences d'importation *in vitro* de protéines dans les mitochondries isolées (A) ou dans les chloroplastes isolés (B).** En C est schématisé le résultat d'une expérience *in vitro* analysée sur gel de polyacrylamide.

T = produit de traduction ①, ②, ③ et ④ représentent les quatre essais réalisés pour chaque expérience d'importation *in vitro* décrits dans le texte.

**Tampon HB:** Sorbitol 450 mM - Tricine-KOH pH 8,4 20 mM - BSA 0,1% (p/v) - EDTA 10 mM – NaHCO<sub>3</sub> 10 mM

**Tampon RB:** Sorbitol 300 mM - Tricine-KOH pH 7,6 20 mM - EDTA 2,5 mM - MgCl<sub>2</sub> 5 mM

**Coussin de percoll :** percoll 40% (v/v) dans du Tampon RB 2X.

## B-TEST D'IMPORTATION *IN VITRO* DES PROTEINES

### 1. Transcription et traduction *in vitro*

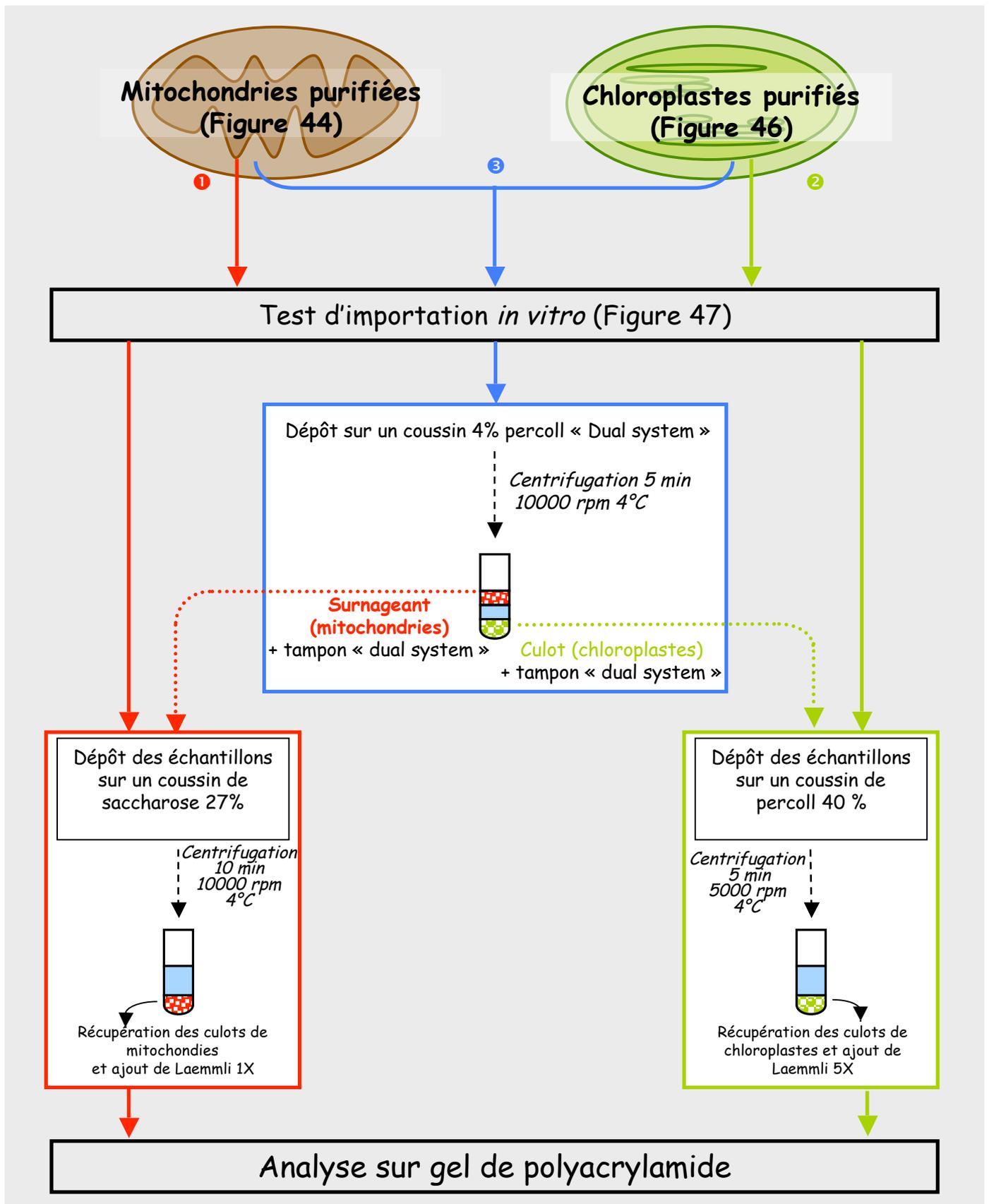
Le précurseur de la protéine dont on souhaite étudier l'importation dans les mitochondries est synthétisé par une transcription et une traduction couplées dans un lysat de réticulocytes de lapin en présence de méthionine marquée au [<sup>35</sup>S]. Nous utilisons le système « TNT<sup>®</sup> Coupled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

- 25  $\mu$ L de TNT<sup>®</sup> Rabbit Retyculocytes Lysate (Promega)
- 2  $\mu$ L du tampon de transcription TNT<sup>®</sup> (Promega)
- 1  $\mu$ L de la T7 ARN polymérase TNT<sup>®</sup> (Promega)
- 1  $\mu$ L d'un mélange d'acides aminés sans la méthionine 1 mM
- 6  $\mu$ L de [<sup>35</sup>S] méthionine 10  $\mu$ Ci/ $\mu$ L (activité spécifique de 1000 Ci/mmol)
- 1 à 2  $\mu$ g d'un plasmide contenant le promoteur d'une T7 ARN polymérase et l'ADNc complet de la protéine d'intérêt.

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

### 2. Test d'importation *in vitro* dans les mitochondries (Figures 47A et 47C)

Pour chaque test d'importation (Rudhe et al., 2002b), on utilise l'équivalent de 50  $\mu$ g de protéines mitochondriales de pommes de terre reprises dans un volume final de 50  $\mu$ L contenant 25  $\mu$ L de **tampon d'import** en présence d'ATP 2 mM, d'ADP 40  $\mu$ M, auquel on ajoute environ 5  $\mu$ L du produit de traduction. Après 30 min à 25°C sous agitation, les mitochondries sont déposées sur un **coussin de saccharose à 27%** (p/v) et centrifugées 10 min à 9 000 g. Le surnageant est éliminé et le culot de mitochondries est repris dans 10  $\mu$ L de **tampon Laemmli 2X** pour l'analyse sur gel de polyacrylamide.



**Figure 48:** Représentation schématique des expériences d'importation *in vitro*. Avec (A) Test d'importation dans les mitochondries isolées; (B) Test d'importation dans les chloroplastes isolés; (C) Test de double importation, dans les mitochondries et les chloroplastes.

Dans la pratique, une expérience d'importation nécessite un certain nombre de contrôles. On réalise donc quatre types d'essai :

- Le premier tube (1) ne subit pas de traitement.
- Un traitement à la protéinase K (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) pendant 10 min à température ambiante est réalisé dans le tube (2), après incubation des mitochondries avec les protéines radioactives. La protéinase K est inhibée par addition de PMSF (2 mM). Ce traitement permet de mettre en évidence la résistance à la protéinase K des protéines importées dans les mitochondries .
- Dans le tube (3), les mitochondries sont traitées à la valinomycine (2  $\mu\text{M}$ ) pendant 10 min à 4°C, avant l'addition des protéines marquées. Ce traitement a pour effet de neutraliser le potentiel membranaire, bloquant ainsi le transport du précurseur à travers le canal d'importation des protéines.
- Dans le tube (4), les mitochondries sont d'abord traitées à la valinomycine puis incubées avec la protéine radioactive avant d'être traitées à la protéinase K. Dans ces conditions, toutes les protéines doivent être dégradées. Cette étape permet de montrer que la bande correspondant à la protéine mature n'est pas un produit de dégradation résistant à la protéinase K.

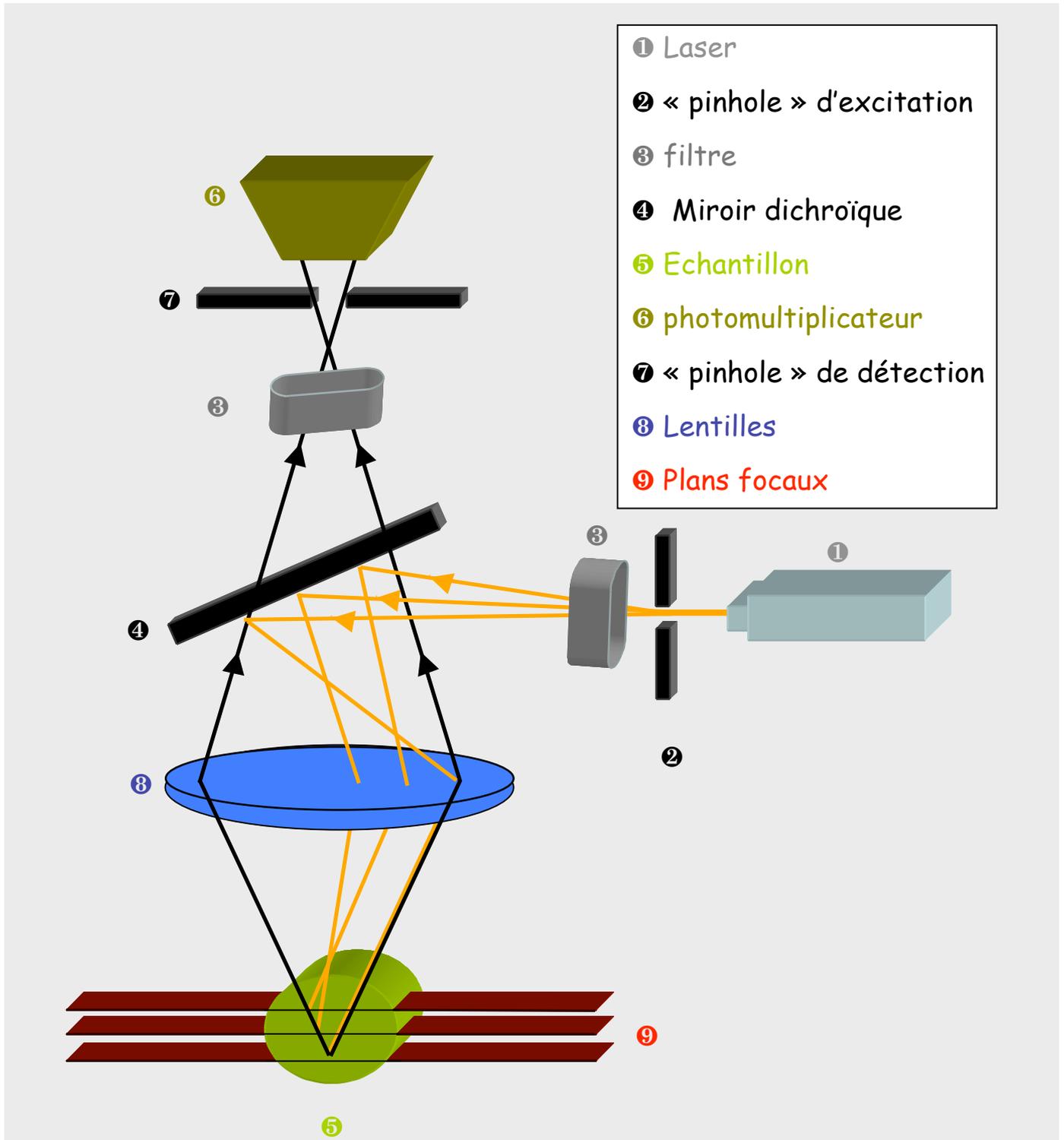
**Tampon import 1X** : phosphate de potassium pH 7,5 1 mM - mannitol 0,3 M - Hepes 20 mM - KCl 80 mM - malate 1 mM - NADH 1mM - DTT 1 M.

**Coussin saccharose 27%** : saccharose 27% (p/v) - phosphate de potassium 10 mM - EDTA 1 mM - BSA 0.1 g.L<sup>-1</sup>.

**Tampon Laemmli 2X** : Tris-HCl pH 6,8 100 mM - SDS 4% (p/v) -  $\beta$ -Mercaptoéthanol 4% (v/v) - glycérol 15% - bleu de bromophénol 0,05% (p/v).

### 3. Test d'importation *in vitro* dans les chloroplastes (Figures 47B et 47C)

Un mélange de volume final de 50  $\mu\text{L}$ , contenant 17  $\mu\text{L}$  méthionine 200 mM, 1  $\mu\text{L}$  de GTP 50 mM, 5  $\mu\text{L}$  de traduction et 25  $\mu\text{L}$  de **tampon IB 2X** est préparé (Robinson, 1988). La réaction est initiée en ajoutant 100  $\mu\text{L}$  de chloroplastes (à 1 $\mu\text{g}$  de chlorophylle/ $\mu\text{L}$ ). Après une incubation de 30 min à 25°C sous lumière continue, le mélange est déposé sur un mL de **coussin de percoll 40%**. Les chloroplastes sont récupérés sous forme de culot après une centrifugation de 5 min à 2200 g et repris dans 5  $\mu\text{L}$  de **tampon Laemmli 5X** pour l'analyse sur gel de polyacrylamide.



**Figure 49 :** Représentation schématique du microscope optique confocal.

Comme pour les tests d'importation dans les mitochondries, des contrôles sont mis en place :

- Le tube (1) ne subit pas de traitement.
- Un traitement à la protéinase K est effectué dans le tube (2) après incubation avec les protéines radioactives.
- Le tube (3) est placé à l'obscurité. En absence de lumière, la photosynthèse s'arrête, il n'y a plus de synthèse d'ATP et le transport des protéines est inhibé.
- Le tube (4) est incubé à l'obscurité avec les protéines radioactives avant d'être traité à la protéinase K.

**Coussin percoll 40%** : percoll 40% (v/v) dans Tampon IB 1X.

#### 4. Système *in vitro* de double importation, dans les mitochondries et les chloroplastes (Figure 48)

Afin de compléter notre étude, nous avons utilisé le système *in vitro* de double importation (« Dual system ») des protéines dans les mitochondries et les chloroplastes, mis au point par Rudhe C. et al. (Rudhe et al., 2002a) et utilisé par AK Berglund. Pour ceci, les mitochondries (l'équivalent de 50  $\mu\text{g}$  de protéines mitochondriales) sont mélangées aux chloroplastes (l'équivalent de 15  $\mu\text{g}$  de chlorophylle). Le tout est incubé 30 minutes à 25°C, en présence de lumière et d'un **tampon d'import « Dual system »**, qui fournit les conditions nécessaires à l'importation dans les deux organelles.

Les deux types d'organelles sont ensuite re-purifiés . Pour cela, le mélange préalablement déposé sur un **coussin « Dual system »** est centrifugé 5 min à 9000 g.

- Le culot contient les chloroplastes. Il est dilué dans du tampon d'import « Dual system », déposé sur un **coussin de percoll 40%**, et centrifugé 5 minutes à 2200 g.
- La partie supérieure du coussin « Dual system » contient les mitochondries. Elle est récupérée, déposée sur un **coussin de saccharose à 27%** (p/v) et centrifugée 10 min à 9000 g.

Après ces étapes de centrifugation, les culots de mitochondries et de chloroplastes sont repris dans du **tampon Laemmli** pour l'analyse sur gel de polyacrylamide.

**Tampon de lavage « Dual System »** : saccharose 300 mM - Hepes pH 7,3 15 mM - phosphate de potassium 5 mM - BSA 0,2%.

**Tampon import « Dual System » 2X** : Hepes pH 7,4 30 mM - saccharose 600 mM - phosphate de potassium 10 mM - BSA 0,4 g.L<sup>-1</sup> - MgCl<sub>2</sub> 8 mM - méthionine 8 mM - ATP 2

mM - GTP 2 mM - ADP 0,4 mM - succinate 10 mM - DTT 9 mM - acétate de potassium 20 mM - NaHCO<sub>3</sub> 20 mM.

**Coussin « Dual System »** : percoll 4% (v/v) dans Tampon de lavage « Dual System » 1X.

## 6.OBSERVATIONS MICROSCOPIQUES

### A-CARACTERISTIQUES DU MICROSCOPE CONFOCAL LSM

Le microscope confocal utilisé lors de cette étude est un microscope inversé à balayage laser Zeiss LSM 510. Il est équipé d'un laser Argon qui émet trois raies (458, 488 et 514 nm) et de deux lasers Hélium/Néon (HeNe I et II) émettant respectivement une raie à 543 nm et à 633 nm.

Si l'inconvénient majeur de la microscopie à fluorescence conventionnelle est une perte de résolution due à l'émission de fluorescence défocalisée qui se superpose à l'image du plan focal, la microscopie confocale permet de pallier à ces inconvénients : elle consiste à pratiquer des coupes optiques virtuelles dans l'objet observer et à n'enregistrer que l'image de la fluorescence émise dans le plan focal.

Le principe du microscope confocal est le suivant (**Figure 49**) :

Le laser du microscope émet la lumière d'excitation qui va tout d'abord passer par un « pinhole » d'excitation. Ce « pinhole » réduit la source à un point lumineux. Le faisceau est alors filtré (filtre d'excitation) de manière à sélectionner la ou les raies d'excitation utiles ainsi que leurs intensités respectives. Il est ensuite réfléchi sur un miroir dichroïque qui renvoie sélectivement la lumière d'excitation mais laisse passer la lumière émise par les fluorochromes. Le miroir envoie la lumière d'excitation sur l'objectif du microscope qui permet de focaliser en un point de l'échantillon. La lumière d'excitation va exciter les fluorochromes de l'échantillon qui vont renvoyer la lumière à une longueur d'onde différente (longueur d'onde d'émission). La lumière émise par les fluorochromes au niveau de ce point situé sur le plan focal est alors focalisée par l'objectif sur le capteur (photomultiplicateur). Par contre, si la lumière est émise par des fluorochromes situés au-dessus ou au-dessous du plan focal, elle est filtrée à l'entrée du détecteur par la présence d'un « pinhole de detection ». Le capteur transforme le signal lumineux en signal électrique qui va alors être analysé par l'ordinateur. Le microscope possède différents jeux de laser, filtres d'excitation et miroir

Pour visualiser	Laser	Excitation maximale	Emission maximale	Filtre dichroïque d'excitation	Filtre d'émission LP
GFP	Argon	489 nm	508 nm	488 nm	505 nm
Chlorophylle	Argon	450 nm	660 nm	488 nm	585 nm
Mitotracker <sup>TM</sup>	HeNe I	554 nm	576 nm	543 nm	560 nm
RFP	HeNe I	558 nm	583 nm	543 nm	560 nm
ERtracker <sup>TM</sup>	Diode	430 nm	660 nm	405 nm	475 nm

**Table 8 :** Longueurs d'ondes d'excitation et d'émission des fluorochromes utilisées au cours de cette étude et filtres d'excitation et miroirs dichroïque permettant d'observer les fluorochromes.

dichroïque qui permettent d'observer des fluorochromes de diverses natures. Les caractéristiques des jeux de filtres, ainsi que les spectres des fluorochromes utilisés sont présentés (**Table 8**).

## **B-PREPARATION DES PROTOPLASTES DE *N. BENTHAMIANA***

### **1. Transformation des cellules végétales par *A. tumefaciens***

Après transformation par électroporation avec le plasmide pBIN comportant la séquence d'intérêt, les bactéries *A. tumefaciens* (LBA4404) sont cultivées sur **du milieu YEB** en présence des antibiotiques adaptés, à 28°C pendant 48 h. Puis à partir d'une colonie, une préculture liquide de 3 mL est lancée pendant 48 h, à 28°C sous agitation. Pour l'agroinfiltration, 0,2 mL de cette préculture est incubé à 28°C durant la nuit, dans 10 mL de milieu YEB contenant de l'acetosyringone (150 µM, solubilisé dans du DMSO) permettant l'induction des gènes de virulence d'*Agrobacterium*. La culture est ensuite centrifugée 15 min à 4300 g à température ambiante. Le culot est repris dans du **tampon de resuspension** de façon à obtenir une absorbance de 0,5. Après une légère incision, les feuilles de *N. benthamiana* sont agroinfiltrées à l'aide d'une seringue de 2 mL dépourvue d'aiguille.

**Milieu YEB** : extrait de bœuf 5 g/L – bacto tryptone 5 g/L – bacto peptone 1 g/L – extrait de levure 1 g/L, pH 7,4 – après stérilisation, rajouter MgSO<sub>4</sub> 2 mM – saccharose 5 g/L.

**Tampon de resuspension** : MgCl<sub>2</sub> 10 mM – Acetosyringone 150 µM.

### **2. Préparation des protoplastes de *N. benthamiana***

Après deux jours, les feuilles infiltrées sont découpées au scalpel. Le matériel lacéré est déposé dans une boîte de Pétri contenant du **tampon de digestion**. L'ensemble est laissé à macérer 3 h environ à 30°C. Après incubation, en agitant doucement, les protoplastes se détachent et la fraction liquide est transférée dans un tube. Après un repos de 5 min, les protoplastes intacts remontent à la surface par effet de densité.

**Tampon de digestion** : MS Salt (Duchefa) 4,3 g/L - MES pH 5,6 5 g/L – saccharose 60 mM – mannitol 0,45 M – Macerozyme R-10 0,2 % - Driselase 0,5 % - Cellulase 1 %.

## C-COLORATION DES MITOCHONDRIES

Pour localiser les mitochondries, nous avons utilisé un fluorochrome MitoTracker™ Orange CM-H<sub>2</sub>TMRos (Molecular Probes, Eugenes). Il s'agit du 4-chlorométhyltétraméthylrosamine qui dérive de la rosamine. C'est un colorant vital qui pénètre spécifiquement dans les mitochondries grâce à leur potentiel membranaire. Cette molécule fluoresce dans le rouge lorsqu'elle est excitée à 551 nm. Le colorant est ajouté aux protoplastes transformés à une concentration finale de 0,5 pM. La fluorescence est visible environ 20 minutes après son addition.

## D-COLORATION DU RETICULUM

Pour visualiser le réticulum au sein des protoplastes, nous avons utilisé un fluorochrome ERTracker™ Blue-White DPX (Molecular Probes, Eugenes). Il s'agit d'un dérivé du 2 amino-ethyl-sulfonamide (DPX). Ce colorant vital marque spécifiquement le réticulum et fluoresce dans un large spectre (430-640 nm) lorsqu'il est excité à 374 nm. Le colorant est ajouté aux protoplastes à une concentration finale de 1,1 µM. La fluorescence est visible environ 45 minutes après son addition.

## E- Brefeldine A

La bréfeldine A (ou BFA) est un composé lipidique d'origine fongique qui interrompt la structure et la fonction de l'appareil de golgi dans les cellules animales, celles des végétaux supérieurs et chez la levure *S. cerevisiae*. Le traitement des cellules par la BFA entraîne une perturbation de la structure des compartiments membranaires et en particulier de l'appareil de golgi. Les plants de tabac sont infiltrés avec une solution 10 mg/ml 24 heures avant l'observation en microscopie.

## F-TRAITEMENT DES IMAGES

Toutes les images ont été traitées par le logiciel LSM 510 version 2.8 disponible en libre utilisation sur la station d'analyse d'image du microscope confocal et LSM Image

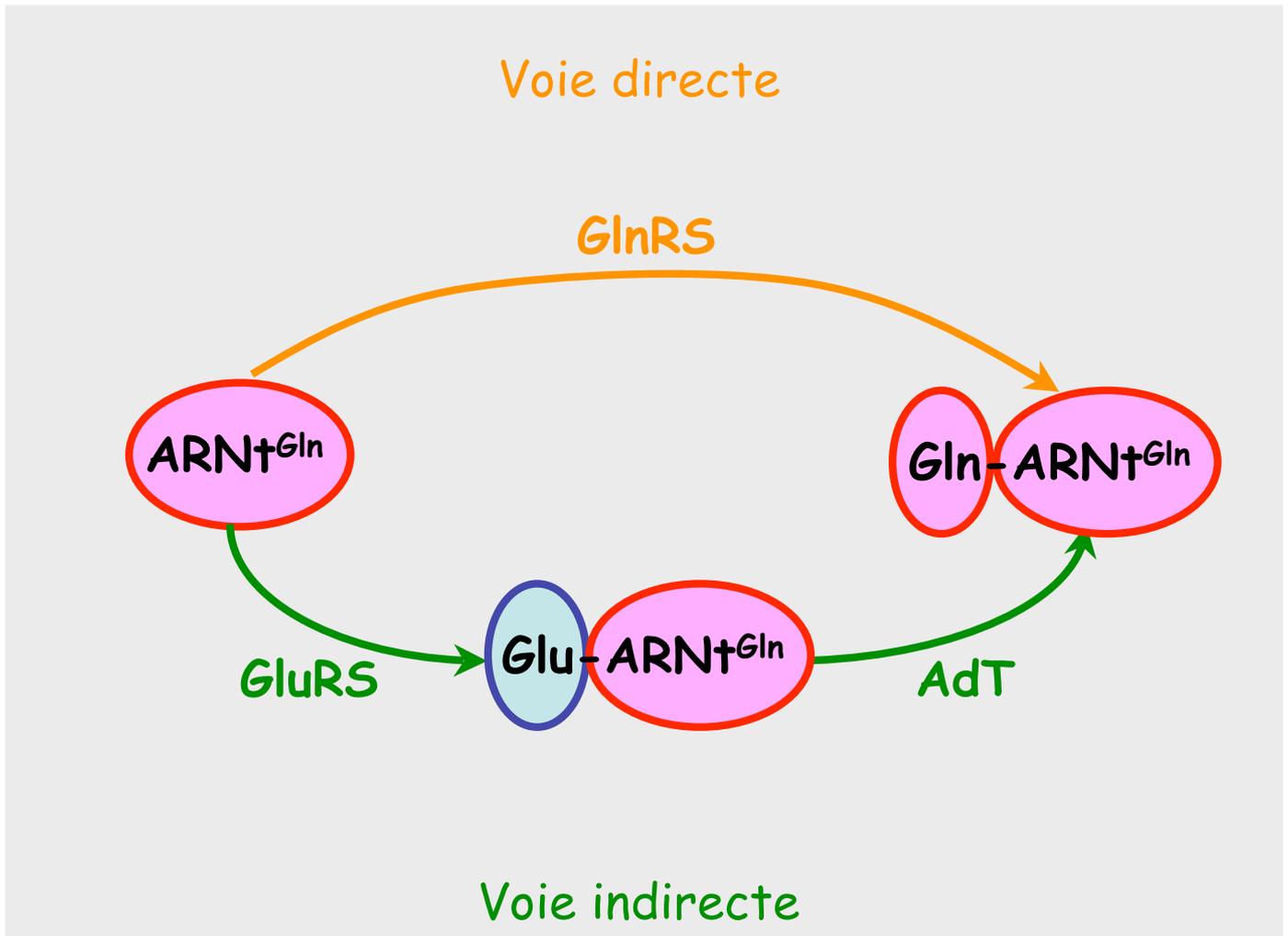
Browser ([http :www.zeiss.de/imageBrower](http://www.zeiss.de/imageBrowser)). Les figures ont été assemblées sous Adobe Photoshop (version 7.0).



# *Résultats*



**Chapitre I**  
**Voie de biosynthèse du**  
**Gln-ARNt<sup>Gln</sup> dans les**  
**mitochondries et les**  
**chloroplastes de plante**



**Figure 50:** Deux voies de synthèse sont possibles pour le Gln-ARNt<sup>Gln</sup>.  
 Avec GlnRS: glutaminyl-ARNt synthétase; GluRS: glutamyl-ARNt synthétase;  
 AdT: Amidotransférase ARNt dépendante.

Vingt trois aaRS identifiées chez *A.thaliana* possèdent une séquence d'adressage potentiellement mitochondriale ou chloroplastique (Duchene et al., 2005). Or, ces 23 aaRS correspondent à seulement 19 acides aminés : la seule séquence de GlnRS identifiée sur le génome nucléaire ne possède pas de séquence d'adressage vers les organites détectée par les logiciels de prédiction. Nous nous sommes donc intéressés à l'aminoacylation de l'ARNt<sup>Gln</sup> dans les mitochondries et les chloroplastes de plante. En effet, si l'aminoacylation est généralement obtenue par la liaison directe d'un acide aminé sur son ARNt grâce à l'aaRS correspondante, pour l'ARNt<sup>Gln</sup>, différents cas sont possibles : voie de synthèse traditionnelle (= voie directe) dans le cytosol des eucaryotes et dans quelques bactéries avec l'utilisation de la glutaminyl-ARNt synthétase (GlnRS), ou voie de transamidation (= voie indirecte) dans les chloroplastes, les archaebactéries et la plupart des bactéries. Cette voie implique une GluRS non discriminante capable de charger le Glutamate sur les ARNt<sup>Glu</sup> et ARNt<sup>Gln</sup>, ainsi qu'une amidotransférase ARNt dépendante (AdT) capable de convertir le Glu-ARNt<sup>Gln</sup> en Gln-ARNt<sup>Gln</sup> (**Figure 50** et Introduction, chapitre II.4).

Dans les organites, une activité AdT a été mise en évidence dans les chloroplastes d'orge en 1988 (Schon et al., 1988) mais les gènes responsables n'ont jamais été identifiés. Au niveau mitochondrial, une activité GlnRS a été mise en évidence dans les mitochondries de protozoaires et de levure, et une activité AdT est suggérée dans les mitochondries de mammifères (cf. Introduction II.4.A).

Nous avons donc recherché quelle est la voie de synthèse du Gln-ARNt<sup>Gln</sup> utilisée dans les mitochondries végétales, et quels étaient les gènes impliqués pour les activités mitochondriales et chloroplastiques.

Nous avons tout d'abord analysé, chez *Arabidopsis thaliana* et *Solanum tuberosum*, l'expression de l'ARNt<sup>Gln</sup>. Il s'avère que le seul isoaccepteur codé par le génome mitochondrial (anticodon UUG) est exprimé au sein de l'organite ; contrairement à ce que l'on observe chez les levures (Rinehart et al., 2005) les trypanosomes (Rinehart et al., 2004), (Nabholz et al., 1997) ou l'homme (Rubio et al., 2008) où les deux ARNt<sup>Gln</sup> codés par le génome nucléaire (anticodons UUG et CUG) ne sont pas importés dans les mitochondries.

Nous nous sommes ensuite intéressés aux enzymes impliquées dans la voie de synthèse de l'ARNt<sup>Gln</sup>.

La seule enzyme impliquée dans la voie directe est la **glutaminyl-ARNt synthétase (GlnRS)**.

Aucun gène correspondant à une GlnRS destinée aux organites n'avait été identifiée lors de l'étude réalisée en 2005, et les tests enzymatiques réalisés par l'équipe de D. Söll ne permettaient pas de détecter une activité dans les chloroplastes (Schon et al., 1988). Les tests enzymatiques réalisés au cours de cette étude sur les fractions mitochondriales n'ont pas non plus permis de mettre en évidence une activité enzymatique correspondant à la GlnRS.

Nous nous sommes donc intéressé à la voie indirecte de biosynthèse du Gln-ARNt<sup>Gln</sup>, et à la première enzyme impliquée : **la glutamyl-ARNt synthétase (GluRS)**.

Deux gènes codent pour cette enzyme dans le génome d'*A. thaliana*, mais un seul (At5g64050) code pour une GluRS avec une séquence d'adressage, qui permet à l'enzyme d'être localisée à la fois dans les mitochondries et les chloroplastes (Duchene et al., 2005).

Nous avons donc commencé par réaliser des tests enzymatiques qui ont permis de détecter une activité GluRS dans les extraits mitochondriaux d'*A. thaliana* et de *Solanum tuberosum* et dans les extraits chloroplastique d'*A. thaliana*. Puis nous nous sommes intéressés au caractère non discriminant de l'enzyme présente dans les organites : si cette GluRS est impliquée dans la voie de biosynthèse du Gln-ARNt<sup>Gln</sup>, elle doit être capable d'aminocycler à la fois les ARNt<sup>Glu</sup> et ARNt<sup>Gln</sup>. Nous avons donc cloné les gènes d'ARNt<sup>Glu</sup> et ARNt<sup>Gln</sup> d'*A. thaliana*. Les transcrits *in vitro* obtenus à partir de ces gènes ne sont cependant pas glutamylés par un extrait enzymatique mitochondrial ou chloroplastique, à l'exception d'un transcrit correspondant à ARNt<sup>Glu</sup> cytosolique. Cette absence d'aminocyclation pourrait s'expliquer par l'absence de bases modifiées sur les transcrits. Nous avons donc purifié directement les ARNt<sup>Glu</sup> et ARNt<sup>Gln</sup> à partir d'extraits de mitochondries de pommes de terre. Pour cela nous avons utilisé la technique d'électrophorèse bidimensionnelle sur gel de polyacrylamide mise au point par Steinmetz (Steinmetz, 1985). Les ARNt<sup>Glu</sup> et ARNt<sup>Gln</sup> mitochondriaux ainsi purifiés sont reconnus et glutamylés par l'enzyme présente dans les extraits enzymatiques mitochondriaux, mettant ainsi en évidence son caractère non discriminant.

Nous avons également essayé de surproduire la GluRS présente dans les organites, codée par le gène At5g64050 (Duchene et al., 2005). Pour ceci, nous avons cloné la séquence

de l'enzyme privée de son extrémité N-terminale dans le vecteur pQE60. Une faible surproduction de la protéine a pu être obtenue, mais celle-ci n'a jamais pu être purifiée en conditions natives. L'expression de la GluRS dans *Bacillus subtilis* s'est également avéré être toxique pour *E. coli* (Baick et al., 2004), en raison de la formation de Glu-ARNt<sup>Gln</sup>.

L'absence de GlnRS et la présence d'une GluRS non-discriminante dans les mitochondries nous ont donc incité à nous intéresser à la deuxième enzyme impliquée dans la voie de synthèse indirecte du Gln-ARNt<sup>Gln</sup>, **l'amidotransférase ARNt dépendante (AdT)**.

Deux types d'AdT existent, avec une structure trimérique (GatCAB) ou dimérique (GatDE) (cf. Introduction II.4.C.1). Seuls trois gènes (At3g25660, At1g48520 et At4g32915) codant potentiellement pour les 3 sous-unités gatA, gatB et gatC de l'AdT ont été identifiés au sein du génome nucléaire d'*A. thaliana*. Les trois séquences codantes entières ont été clonées dans le plasmide pCR-II. Puis Marc Bailly, doctorant dans le laboratoire de Daniel Kern à l'Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IBMC) de Strasbourg a sous-cloné les séquences codantes dépourvues des portions correspondant aux séquences d'adressage dans le vecteur d'expression d'*E. coli* pCYB1, pour reconstituer l'opéron artificiel gatCAB.

La localisation de gatC, gatA et gatB a été montrée par les tests d'importation des protéines radioactives synthétisées *in vitro* à partir des constructions dans le plasmide pCRII. Ces tests ont mis en évidence la double localisation mitochondriale et chloroplastique des trois protéines. En parallèle, GatCAB a été surproduite et purifiée à partir de l'opéron artificiel (M. Bailly). Des anticorps ont été générés contre cette protéine purifiée et la double localisation des trois sous-unités a été confirmée par western blot.

Enfin, des tests de transamidation ont montré la présence d'une activité AdT dans les extraits mitochondriaux et chloroplastiques ainsi que la fonctionnalité de la protéine GatCAB purifiée.

Ainsi, cette étude a permis de découvrir la première amidotransférase mitochondriale. Il s'agit également du premier exemple d'enzyme multimérique, doublement adressée dans les mitochondries et les chloroplastes, dont chaque sous-unité possède, comme la GluRS, une séquence d'adressage ambiguë.

Nous avons également pu démontrer que, contrairement à ce que l'on observe dans les mitochondries de protozoaires et de levures, c'est la voie de transamidation indirecte qui est utilisée pour la synthèse du Gln-ARNt<sup>Gln</sup> dans les mitochondries et les chloroplastes végétaux.



# *Article 1*



**Dual-targeted tRNA-dependent amidotransferase ensures both mitochondrial and chloroplastic Gln-tRNAGln synthesis in plants**

Claire PUJOL, Marc BAILLY, Daniel KERN, Laurence MARECHAL-DROUARD, Hubert BECKER, and Anne-Marie DUCHENE

**Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008, Vol. 105, Pages 6481-6485**

**Pages 93-** :

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

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

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2007.03.015>

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/>

**Dual-targeted tRNA-dependent amidotransferase ensures both mitochondrial and chloroplastic Gln-tRNAGln synthesis in plants : Supporting Information**

Claire PUJOL, Marc BAILLY, Daniel KERN, Laurence MARECHAL-DROUARD, Hubert BECKER, and Anne-Marie DUCHENE

**Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008, Vol. 105, Pages 6481-6485**

**Pages 93- :**

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

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

<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0712299105>

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/>



**Chapitre II**  
**Caractérisation des**  
**séquences de double**  
**adressage :**

**Importance des résidus les plus conservés pour  
l'adressage vers l'un ou l'autre des  
compartiments**

Au début de ma thèse, très peu de travaux avaient été menés sur les séquences de double adressage vers les chloroplastes et les mitochondries. Nous avons donc tenté de déterminer quels étaient les acides aminés (aa) essentiels dans ces séquences d'adressage pour l'importation des protéines dans les mitochondries ou les chloroplastes.

Pour cela nous avons comparé 4 types de séquences protéiques :

- les 100 premiers aa des 35 protéines d'*A. thaliana*, alors connues pour posséder des séquences d'adressage ambiguë ;
- les 100 premiers aa d'une cinquantaine de protéines uniquement mitochondriales ;
- les 100 premiers aa d'une quarantaine de protéines uniquement chloroplastiques ;
- les séquences correspondant aux protéines ci-dessus privées de leurs 200 premiers aa (protéines dites « matures ») ;

Les protéines uniquement mitochondriales et chloroplastiques ont été choisies, soit parce que leur fonction est uniquement mitochondriale ou chloroplastique, soit parce que la question du double adressage a clairement été posée dans leur cas. La plupart des séquences d'adressage mitochondriales ou chloroplastiques de plantes font moins de 100 acides aminés, la plus longue identifiée faisant 146 acides aminés. La majorité des informations d'adressage se retrouve donc dans les 100 premiers résidus. Par contre, au-delà de 200 aa, on ne s'attend plus à trouver des signaux d'adressage.

Les quatre types de séquences ont tout d'abord été analysés de façon globale :

Les trois types de séquence d'adressage ont la même composition en acides aminés : elles sont enrichies en Sérine et Arginine et pauvres en Aspartate et Glutamate comparé aux protéines « matures ». On retrouve donc là des caractéristiques déjà mises en évidence (cf. Introduction III.2.D). Par contre on n'observe pas de différences nettes entre séquence de double adressage et séquences d'adressage mitochondriales et chloroplastiques.

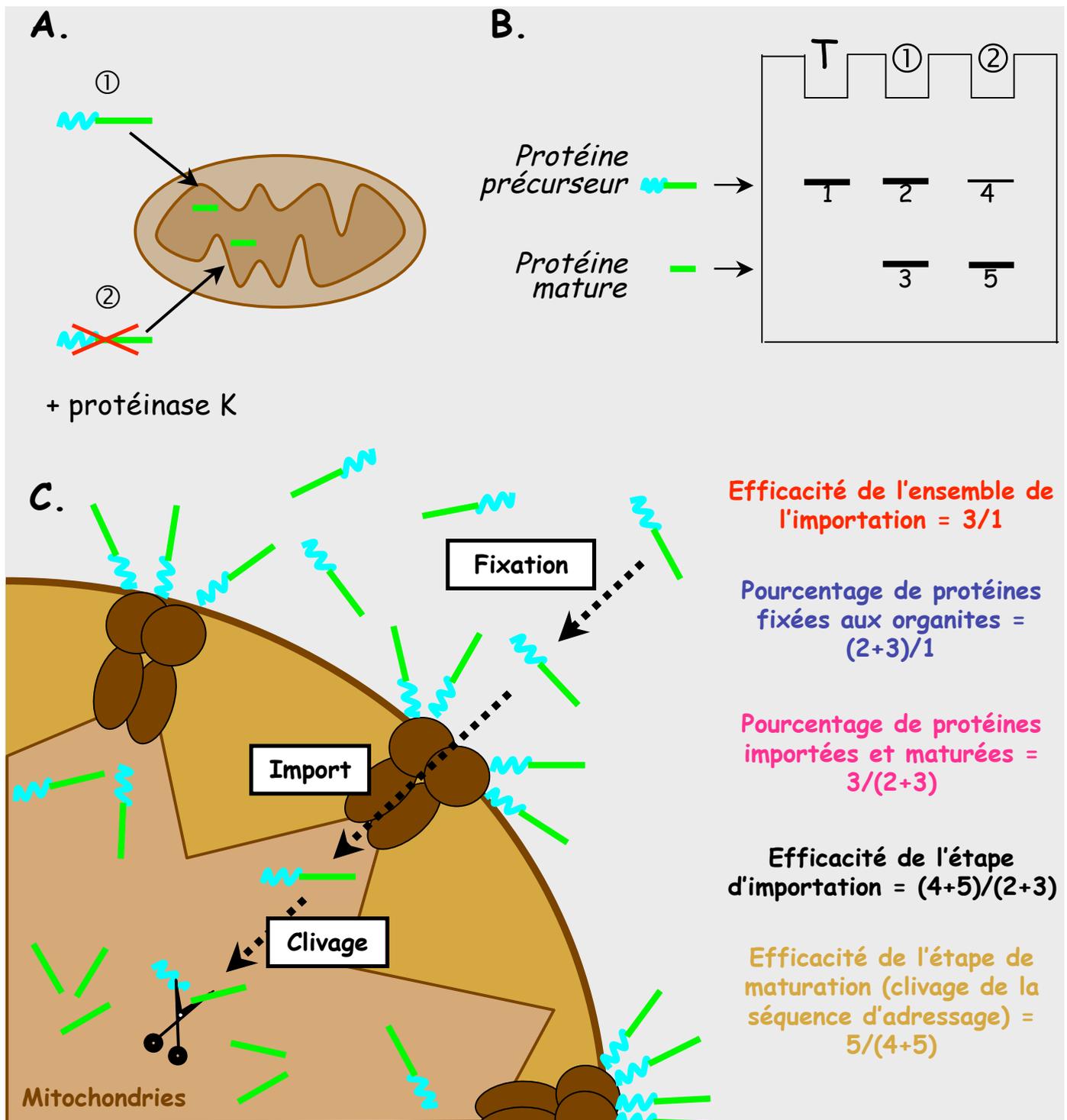
Pour essayer de mettre en évidence des différences plus fines, les trois types de séquences d'adressage ont été analysées par séries de 20 aa. La composition en Arginine dans la partie la plus N-terminale des séquences d'adressage mitochondriale apparaît alors clairement différente de celle des séquences doubles ou chloroplastiques : la majorité des séquences d'adressage mitochondrial compte 2, 3 ou 4 Arginines dans leurs 20 premiers aa contre 0 à 1 pour les séquences chloroplastiques. Les séquences doubles ont un comportement intermédiaire. Une analyse fine des 20 premiers résidus des séquences a également montré

que dans 60% des cas, on retrouve une Alanine en deuxième position de la séquence d'adressage des protéines destinées aux chloroplastes, contre seulement le quart des protéines mitochondriales et la moitié des protéines doublement adressées.

Cette analyse suggère ainsi l'importance de l'Alanine en 2<sup>ème</sup> position pour l'adressage des protéines vers les mitochondries et l'importance des Arginines dans les 20 premiers résidus pour l'adressage des protéines vers les chloroplastes.

Pour vérifier expérimentalement l'importance des résidus Alanine et Arginine, nous avons décidé de réaliser des mutations ponctuelles sur des séquences de double adressage. Sur la trentaine de protéines possédant une séquence ambiguë chez *A. thaliana*, presque la moitié correspondent aux aaRS. Nous en avons donc sélectionné trois (la Glutamyl-ARNt synthétase ou GluRS (At5g64050), la Méthionyl-ARNt synthétase ou MetRS (At3g55400) et la Phénylalaninyl-ARNt synthétase ou PheRS (At3g58140) pour lesquelles il existait le plus de séquences homologues dans d'autres plantes. L'alignement de ces séquences montre que les trois protéines matures GluRS, MetRS et PheRS sont extrêmement bien conservées d'une plante à l'autre. Par contre les séquences d'adressage sont beaucoup plus variables, avec des blocs d'aa relativement bien conservés et d'autres divergents. On notera que pour les trois séquences, le résidu Alanine en position 2 est parfaitement conservé dans la GluRS et la MetRS (9 et 8 séquences respectivement) et très conservé dans la PheRS (5 séquences sur 7). Pour les Arginines, certains résidus sont également très fortement conservés et ont donc été choisis pour la mutagenèse.

Pratiquement, nous possédions déjà les constructions permettant la synthèse de protéines chimériques avec la partie N-terminale des aaRS d'*A. thaliana* fusionnée à la GFP (respectivement les 81, 71 et 100 premiers résidus de la GluRS, MetRS et PheRS). Les mutations ponctuelles sur le 2<sup>ème</sup> résidu de la séquence et sur les Arginines ont été introduites par PCR. Une étape de transcription/traduction *in vitro* a ensuite permis d'obtenir les protéines chimères radioactives. Incubée avec les mitochondries de pomme de terre et les chloroplastes de pois, la pré-protéine est reconnue par les complexes d'importation situés à la surface des organites puis elle est importée, la séquence d'adressage est clivée et la protéine mature est libérée. Après l'importation, les organites sont re-purifiés sur gradient pour éliminer toutes les protéines en excès. Ce système d'importation *in vitro* présente quelques inconvénients (absence de système cellulaire intact, absence de compétition entre les organites) mais il présente l'avantage majeur de permettre l'analyse des mécanismes



**Figure 51:** Analyse des résultats d'importation: (A): Traitements utilisés lors de l'incubation des protéines avec les organites; (B): Représentation schématique des résultats obtenus sur gel de polyacrylamide; (C): Détails des étapes analysées.

impliqués dans l'importation des protéines. En effet, la quantification de l'intensité des bandes présentes sur le gel en fonction des traitements permet de décortiquer étape par étape l'importation des protéines, de la fixation des précurseurs à la surface des organites jusqu'à l'action de la peptidase et la libération de la protéine mature (**Figure 51**).

Tout d'abord, nous avons comparé les imports des trois constructions sauvages dans les deux organites. Si l'efficacité du processus global (obtention d'une protéine mature) est similaire dans les deux organites (5 à 10% de la quantité de protéine initiale), une analyse plus fine révèle des différences nettes entre organites. Ainsi, l'étape de maturation est extrêmement efficace dans les chloroplastes, tandis que c'est l'étape d'accrochage qui est la plus efficace dans les mitochondries. Nous avons également pu observer que le site de clivage d'une séquence n'est pas forcément le même dans les deux organites, et des produits maturés de différentes tailles peuvent être trouvés.

Trois groupes de résidus Arginine ont été mutés : en position 4 pour la MetRS (MetRS<sub>4</sub>) et en position 12-14 d'une part, 36-37 d'autre part pour la GluRS (respectivement GluRS<sub>12-14</sub> et GluRS<sub>36-37</sub>). Dans les trois cas, l'importation dans les mitochondries est fortement réduite alors que l'importation dans les chloroplastes est peu affectée voire légèrement augmentée et c'est l'étape de passage des membranes mitochondriales qui est fortement affectée pour les trois mutants. On note que l'étape de maturation est également réduite pour la troisième construction (GluRS<sub>36-37</sub>). Ces résultats sont en accord avec les prédictions. En effet, l'analyse *in silico* a révélé la surabondance des résidus Arginines dans la partie la plus N-terminale des séquences d'adressage mitochondriales, suggérant que ces Arginines étaient importantes pour l'importation dans les mitochondries. Nous montrons que dans les séquences de double adressage, la perte de ces résidus Arginine diminue fortement l'importation dans les mitochondries en affectant peu l'importation dans les chloroplastes. Par contre nous n'observons pas de différence selon la localisation du résidu Arginine le long de la séquence.

L'analyse des résultats obtenus pour les constructions mutées au niveau du résidu situé en deuxième position est plus complexe : si d'après l'analyse *in silico*, l'Alanine est importante pour l'adressage chloroplastique, expérimentalement, la mutation de ce résidu a des effets très variables, de la disparition totale de la protéine mature, à son augmentation pour certaines constructions et ceci dans les mitochondries comme dans les chloroplastes. L'exemple le plus frappant est celui de la PheRS. La séquence d'*A. thaliana* que nous

utilisons possède une Thréonine en position 2 tandis que 5 des 6 séquences des autres plantes ont une Alanine à cette position. Il est à noter que les séquences d'adressage de la PheRS sont relativement bien conservées entre plantes. L'analyse des expériences d'importation indiquent :

- D'une part, la mutation de la Thréonine en Alanine dans la construction At-PheRS-GFP n'affecte pas l'apparition de la protéine mature dans les mitochondries. Par contre elle réduit de façon significative et inattendue la quantité de protéine mature dans les chloroplastes.
- D'autre part la mutation de la Thréonine en Glycine a elle un effet beaucoup plus dramatique puisque aucune protéine mature n'est obtenue, ni dans les mitochondries ni dans les chloroplastes, chloroplastes où l'accrochage même de la protéine aux membranes est aboli.

Ces résultats contradictoires sont difficiles à interpréter. L'effet de la mutation en 2<sup>ème</sup> position dépendant clairement de la construction utiliser, on peut suggérer que le résidu en 2<sup>ème</sup> position pourrait interagir avec d'autres aa dans la séquence N-terminale.

Au cours de cette étude nous avons également testé l'importation *in vitro* de deux mutants délétés dans leur portion N-terminale.

En effet, les travaux de l'équipe d'E. Glaser (Rudhe et al., 2002b) suggèrent l'organisation des séquences ambiguës sous forme de domaines, avec des domaines pour la localisation mitochondriale et des domaines pour la localisation chloroplastique des protéines.

La délétion la plus importante correspond à la délétion des 29 premiers résidus de la séquence d'adressage. L'effet est radical, puisque l'on observe une abolition totale de l'importation dans les mitochondries et dans les chloroplastes. L'importation dans les deux organites est également diminuée lorsque les 14 premiers résidus de la séquence d'adressage sont éliminés.

Ainsi, au cours de cette étude nous avons mis en évidence l'importance des Arginines dans les séquences ambiguës pour l'adressage des protéines vers les mitochondries. Nous avons également montré l'importance du résidu localisé en deuxième position de la séquence. Il reste cependant beaucoup de travail pour comprendre l'organisation exacte, peut-être sous forme de domaines, de ces séquences ambiguës.

# *Article 2*



**How can organellar protein N-terminal sequences be dual targeting signals? In silico analysis and mutagenesis approach**

Claire PUJOL, Laurence MARECHAL-DROUARD and Anne-Marie DUCHENE

**Journal of molecular biology, 2007, Vol. 369, Numéro 2, Pages 356-367**

**Pages 97- :**

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

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

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2007.03.015>

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 Table 1: List of *A. thaliana* organellar proteins used for comparison studies

### 35 *A. thaliana* dual proteins

- > At2g31170 CysRS
- > At3g55400 MetRS
- > At4g17300 AsnRS
- > At3g46100 HisRS
- > At5g64050 GluRS
- > At3g13490 LysRS
- > At5g52520 ProRS
- > At3g02660 TyrRS
- > At1g11870 SerRS
- > At4g33760 AspRS
- > At1g50200 AlaRS
- > At5g22800 AlaRS2
- > At3g58140 PheRS
- > At2g04842 ThrRS2
- > At5g16715 ValRS2
- > At2g25840 TrpRS
- > At3g48110 GlyRS2
- > At5g49030 IleRS
- > At4g08390 Ascorbate peroxidase
- > At3g20540 DNA polymerase polc
- > At5g14780 Formate dehydrogenase
- > At3g54660 Glutathione reductase
- > At1g79230 Mercaptopyruvate sulfurtransferase
- > At3g25740 Methionine amino-peptidase MAP1C
- > At4g37040 Methionine amino-peptidase MAP1D
- > At1g63940 Monodehydroascorbate reductase
- > At5g14660 Peptide deformylase PBF1B
- > At2g39290 Phosphatidylglycerophosphate synthase
- > At2g30320 Pseudouridine synthase
- > At3g23830 RNA binding protein
- > At5g15700 RNA Polymerase 2
- > At3g19170 Zinc metalloprotease AtPreP
- > At1g49630 Zinc metalloprotease AtPreP2
- > At5g24850 cryptochrome CRY3
- > At5g35630 Glutamine synthetase (GS) GLN2

### 54 *A. thaliana* mitochondrial proteins

- >At1g24180 pyruvate dehydrogenase E1 alpha subunit
- >At1g48030 dihydrolipoamide dehydrogenase, mitochondrial
- >At1g53240 malate dehydrogenase NAD mitochondrial
- >At1g54220 pyruvate Dehydrogenase dihydrolipoamide acetyltransferase subunit (E2 subunit)
- >At1g59900 pyruvate dehydrogenase E1 alpha subunit
- >At2g05710 aconitate hydratase
- >At2g17130 NAD isocitrate dehydrogenase subunit 1/2 (beta/gamma)

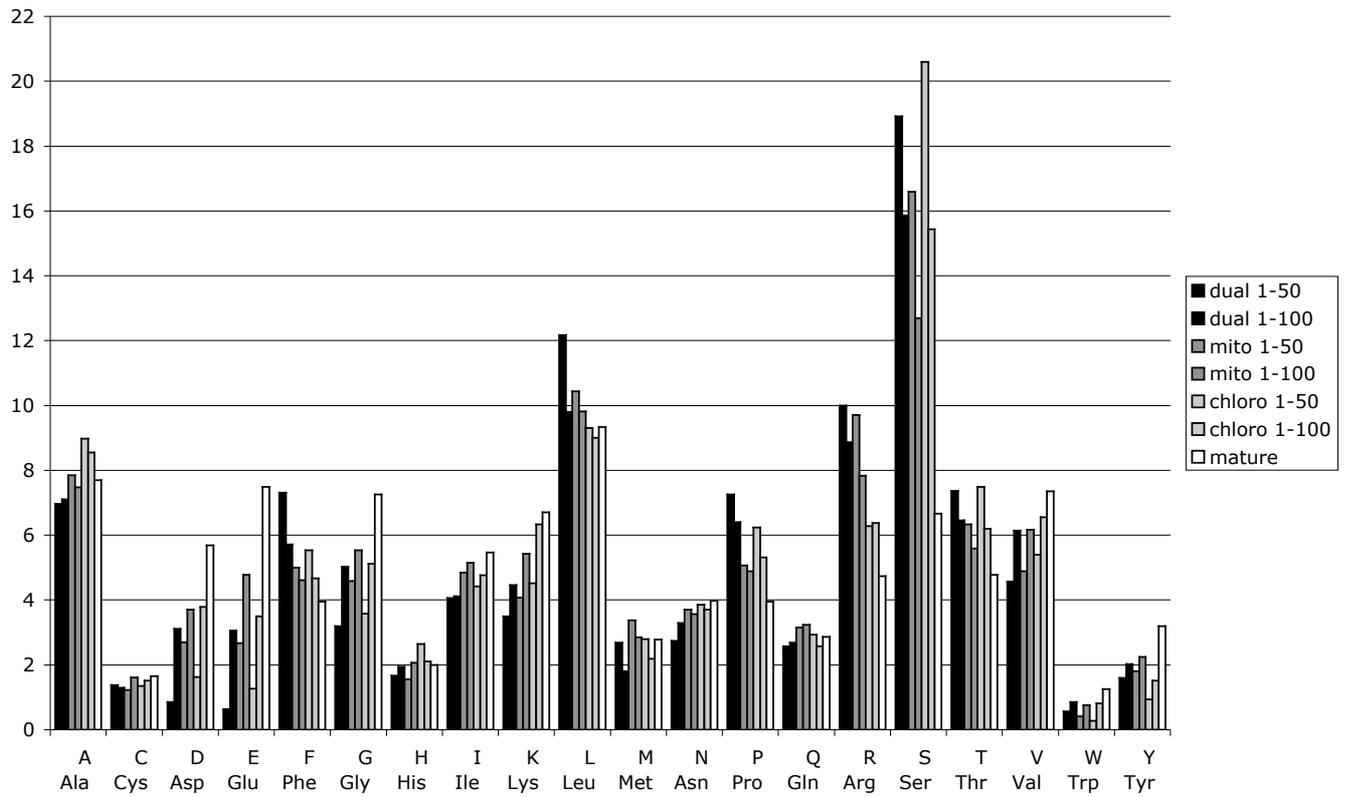
>At2g20420 succinyl-CoA synthetase, beta subunit  
>At2g44350 citrate synthase  
>At2g47510 fumarate hydratase  
>At3g09810 NAD isocitrate dehydrogenase subunit 3/4 (alpha)  
>At3g13930 Pyruvate Dehydrogenase dihydrolipoamide acetyltransferase subunit (E2 subunit)  
>At3g15020 malate dehydrogenase NAD mitochondrial  
>At3g17240 dihydrolipoamide dehydrogenase, mitochondrial (E3-PDC,OGDC,BCKDH)  
>At3g52200 Pyruvate Dehydrogenase dihydrolipoamide acetyltransferase subunit (E2 subunit)  
>At3g55410 oxoglutarate dehydrogenase, E1 subunit  
>At3g60100 citrate synthase  
>At4g26910 a2-oxoglutarate dehydrogenase dihydrolipoamide succinyltransferase subunit (E2 subunit)  
>At4g26970 aconitate hydratase  
>At4g35260 NAD isocitrate dehydrogenase subunit 1/2 (beta/gamma)  
>At4g35650 NAD isocitrate dehydrogenase subunit 1/2 (beta/gamma)  
>At4g35830 aconitate hydratase  
>At5g03290 NAD isocitrate dehydrogenase subunit 3/4 (alpha)  
>At5g08300 succinyl-CoA synthetase, alpha subunit  
>At5g14590 NADP isocitrate dehydrogenase  
>At5g23250 succinyl-CoA synthetase, alpha subunit  
>At5g50850 pyruvate dehydrogenase E1 beta subunit  
>At5g50950 fumarate hydratase  
>At5g55070 2-oxoglutarate dehydrogenase dihydrolipoamide succinyltransferase subunit (E2 subunit)  
>At5g65750 2-oxoglutarate dehydrogenase, E1 subunit  
>At1g11630 PPR Protein  
>At1g26460 PPR Protein  
>At1g55890 PPR Protein  
>At1g61870 PPR Protein  
>At2g01390 PPR Protein  
>At2g19280 PPR Protein  
>At2g34370 PPR Protein  
>At3g11460 PPR Protein  
>At3g13160 PPR Protein  
>At3g13770 PPR Protein  
>At3g13880 PPR Protein  
>At3g24000 PPR Protein  
>At3g60960 PPR Protein  
>At4g35850 PPR Protein  
>At4g36680 PPR Protein  
>At5g09950 PPR Protein  
>At5g13230 PPR Protein  
>At5g14770 PPR Protein  
>At5g15340 PPR Protein  
>At5g55740 PPR Protein  
>At5g26830 ThrRS-1  
>At1g14610 ValRS-1  
>At1g29880 GlyRS-1  
>At3g10140 RecA

### 43 *A. thaliana* chloroplastic proteins

- >At1g12900 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, Stroma
- >At1g14030 ribulose-1,5 biphosphate carboxylase oxygenase large
- >At1g32060 phosphoribulokinase (PRK) / phosphopentokinase Stroma
- >At1g42970 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase B, Stroma
- >At1g56190 phosphoglycerate kinase, putative, stroma
- >At1g67090 ribulose biphosphate carboxylase small chain 1A /
- >At1g73110 ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase, stroma
- >At1g80380 phosphoribulokinase/uridine kinase-related, stroma
- >At2g21170 triosephosphate isomerase, chloroplast,
- >At2g39730 ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase /
- >At3g26650 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase A, stroma
- >At3g54050 fructose-1,6-bisphosphatase, putative /lumen
- >At3g55800 Encodes the chloroplast enzyme sedoheptulose-1,7-
- >At4g38970 fructose-bisphosphate aldolase, putative, stroma
- >At5g38410 ribulose biphosphate carboxylase small chain 3B / stroma
- >At5g38420 ribulose biphosphate carboxylase small chain 2B
- >At5g38430 ribulose biphosphate carboxylase small chain 1B /
- >At1g74850 PPR Protein
- >At2g01860 PPR Protein
- >At2g03880 PPR Protein
- >At2g29760 PPR Protein
- >At3g04760 PPR Protein
- >At3g23020 PPR Protein
- >At3g42630 PPR Protein
- >At4g46870 PPR Protein
- >At4g16390 PPR Protein
- >At4g31850 PPR Protein
- >At5g13270 PPR Protein
- >At1g14410 Why1
- >At3g27830 Rpl12-A
- >At3g27840 Rpl12-B
- >At3g27850 Rpl12-C
- >At2g01140 fructose-bisphosphate aldolase, class I
- >At2g21330 fructose-bisphosphate aldolase, class I
- >At3g12780 phosphoglycerate kinase
- >At4g04350 LeuRS-2
- >At4g26300 ArgRS
- >At2g45290 transketolase, putative, stroma
- >At3g04790 ribose 5-phosphate isomerase-related, lumen
- >At3g60750 transketolase, stroma
- >At5g44520 ribose 5-phosphate isomerase-related, lumen
- >At5g61410 ribulose-phosphate 3-epimerase,/ pentose-5-P 3-epimerase

Supplementary Table 2: Targeting predictions for the wild type (WT) and mutated aaRS-GFP constructs

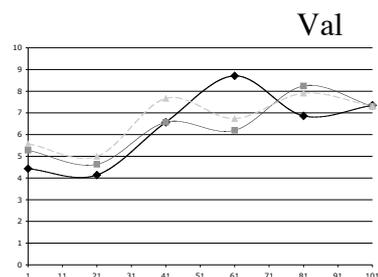
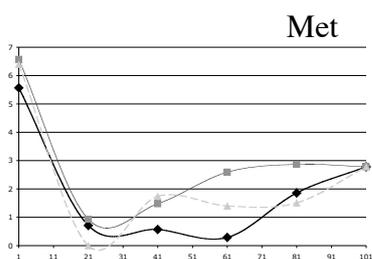
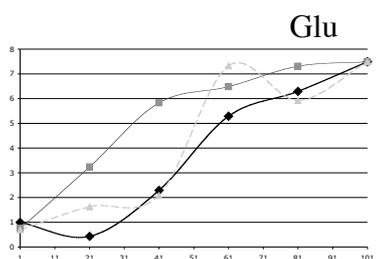
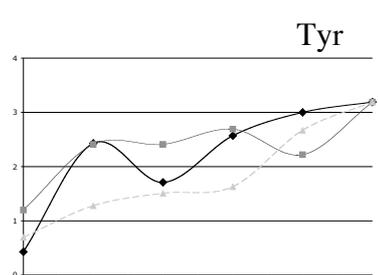
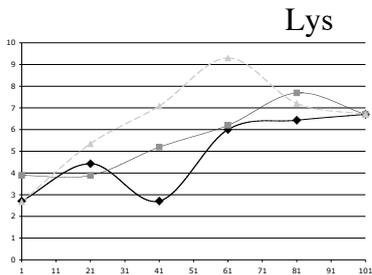
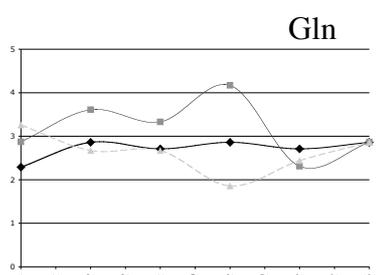
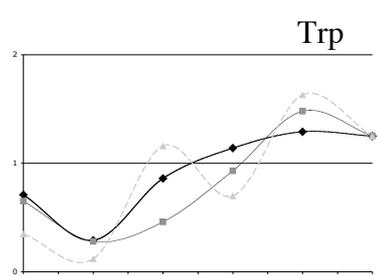
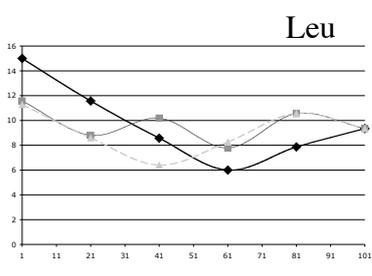
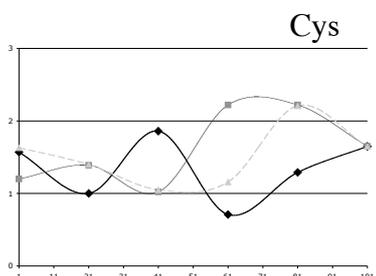
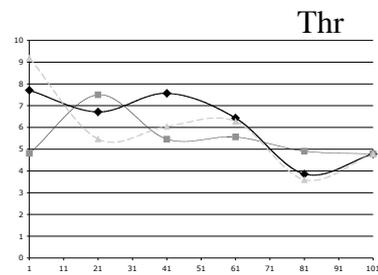
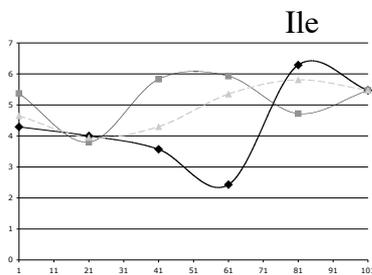
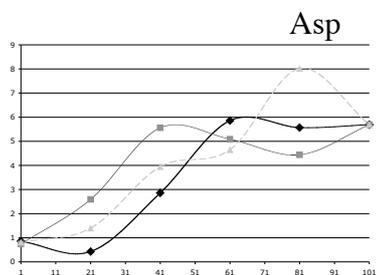
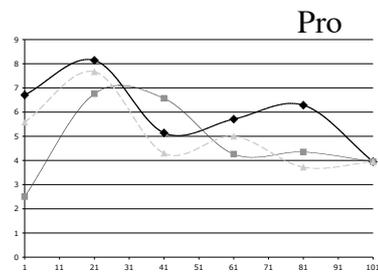
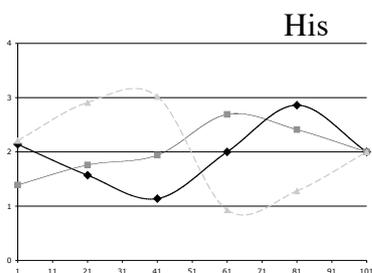
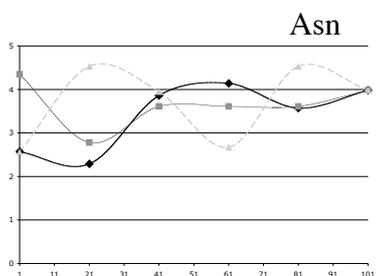
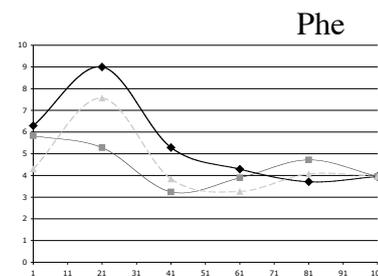
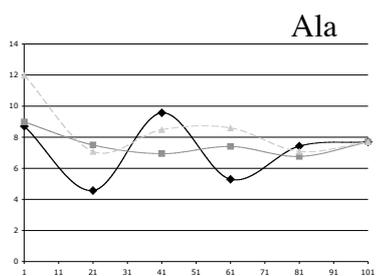
aaRS	construct	Predotar v 1.03			MitoProt		TargetP			
		Mito	Chloro	prediction	Proba.	Cleavage site	cTP	TP length	mTP	reliability class
GluRS	WT	0.37	0.07	possibly mito	0.9828	83	0.507	39	0.734	4
	A <sub>2</sub> ->G	0.29	0.11	"	0.9746	"	0.408	"	0.789	4
	A <sub>2</sub> ->S	0.24	0.09	"	0.9822	"	0.539	"	0.720	5
	R <sub>12</sub> R <sub>14</sub> ->GG	0.02	0.33	possibly plastid	0.9441	"	0.677	81	0.369	4
	R <sub>12</sub> R <sub>14</sub> ->SS	0.03	0.54	plastid	0.9717	"	0.841	"	0.119	2
	R <sub>36</sub> R <sub>37</sub> ->GG	0.26	0.06	possibly mito	0.9528	"	0.280	58	0.745	3
	R <sub>36</sub> R <sub>37</sub> ->SS	0.30	0.07	"	0.9638	"	0.506	"	0.674	5
	Del 14	0.32	0.37	possibly plastid	0.9811	69	0.603	52	0.545	5
	Del 29	0.83	0.03	mito	0.9912	54	0.419	69	0.683	4
	PW->GG	0.42	0.13	possibly mito	0.9669	83	0.444	39	0.735	4
	PW->SS	0.50	0.42	mito	0.9799	83	0.675	81	0.607	5
	MetRS	WT	0.35	0.93	plastid	0.9875	33	0.925	73	0.137
A <sub>2</sub> ->G		0.29	0.92	"	0.9774	"	0.902	"	0.176	2
A <sub>2</sub> ->S		0.25	0.87	"	0.9770	"	0.930	"	0.128	1
R <sub>4</sub> ->G		0.07	0.93	"	0.9752	"	0.951	"	0.061	1
R <sub>4</sub> ->S		0.07	0.94	"	0.9827	"	0.965	"	0.043	1
PheRS	WT	0.39	0.48	plastid	0.9458	15	0.753	53	0.108	2
	T <sub>2</sub> ->G	0.41	0.51	"	0.9553	"	0.749	"	0.132	2
	T <sub>2</sub> ->A	0.49	0.65	"	0.9470	"	0.794	"	0.100	2
GFP	WT	0.01	0.00	none	0.0626	-	0.134	-	0.055	-



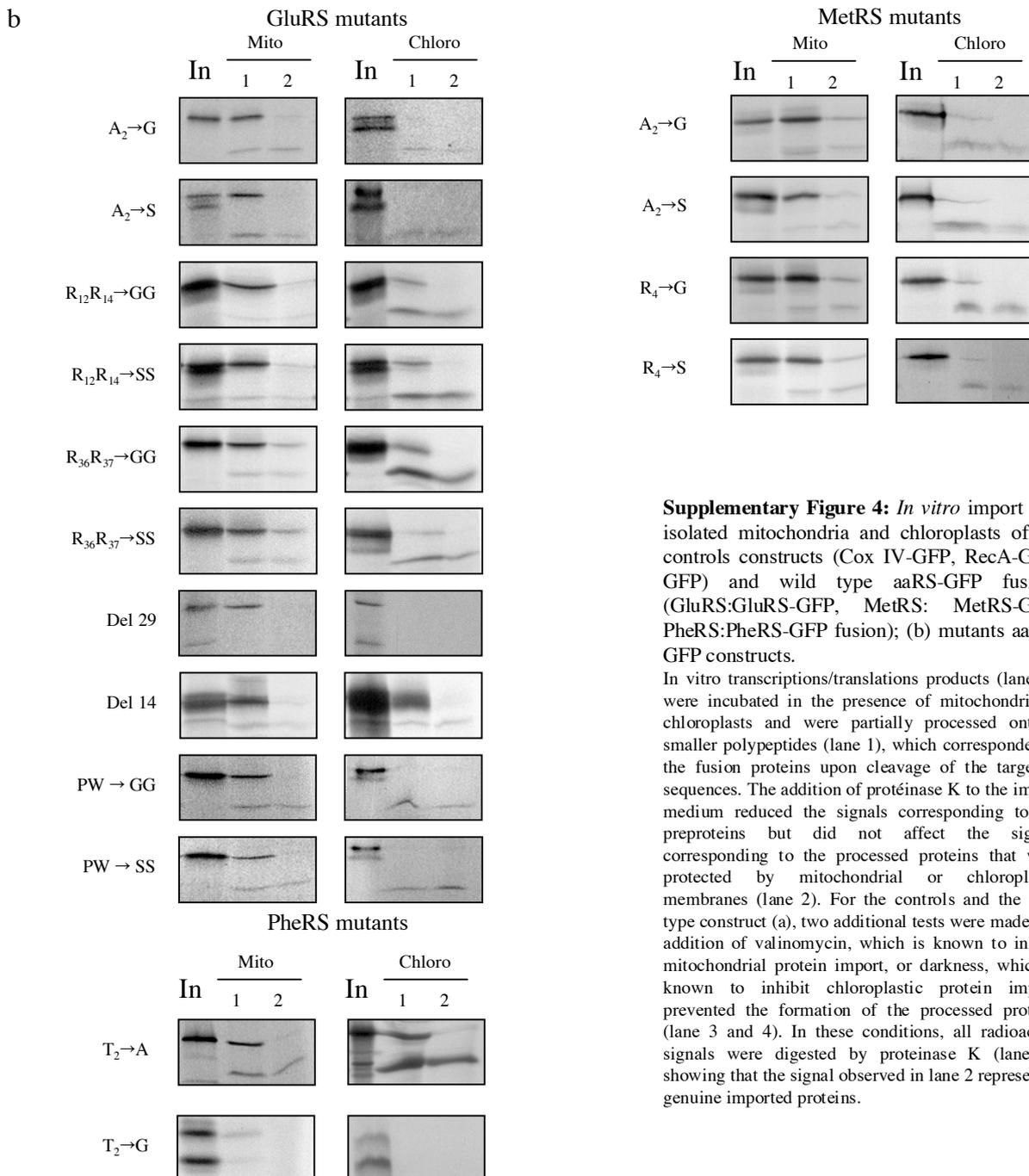
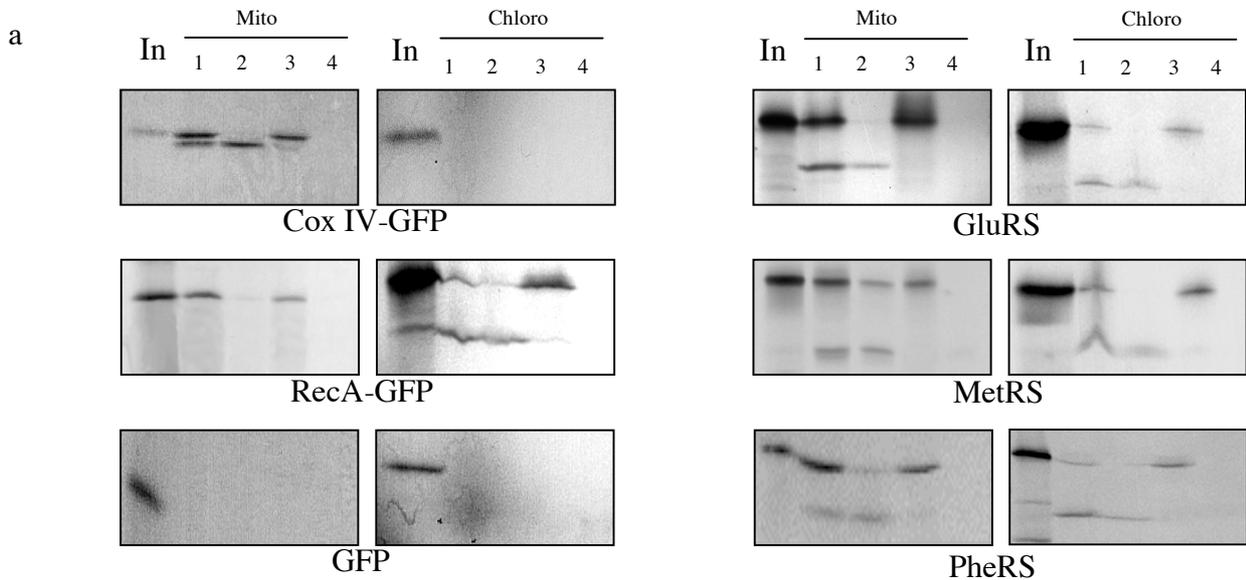
Supplementary Fig. 1: Amino acid composition (in %) of dual, mitochondrial and chloroplastic N-term sequences (first 50 and 100 aa)

Supplementary Fig. 2: Repartition of amino acids along the N-terminal sequences of dual (black diamond), mitochondrial (grey square) and chloroplastic (dotted line and grey triangle) proteins.

The sequences were analysed by stretch of 20 amino acids (abscissa) and the % of each amino acid (ordinate) was calculated for each stretch. Dual proteins, black diamond

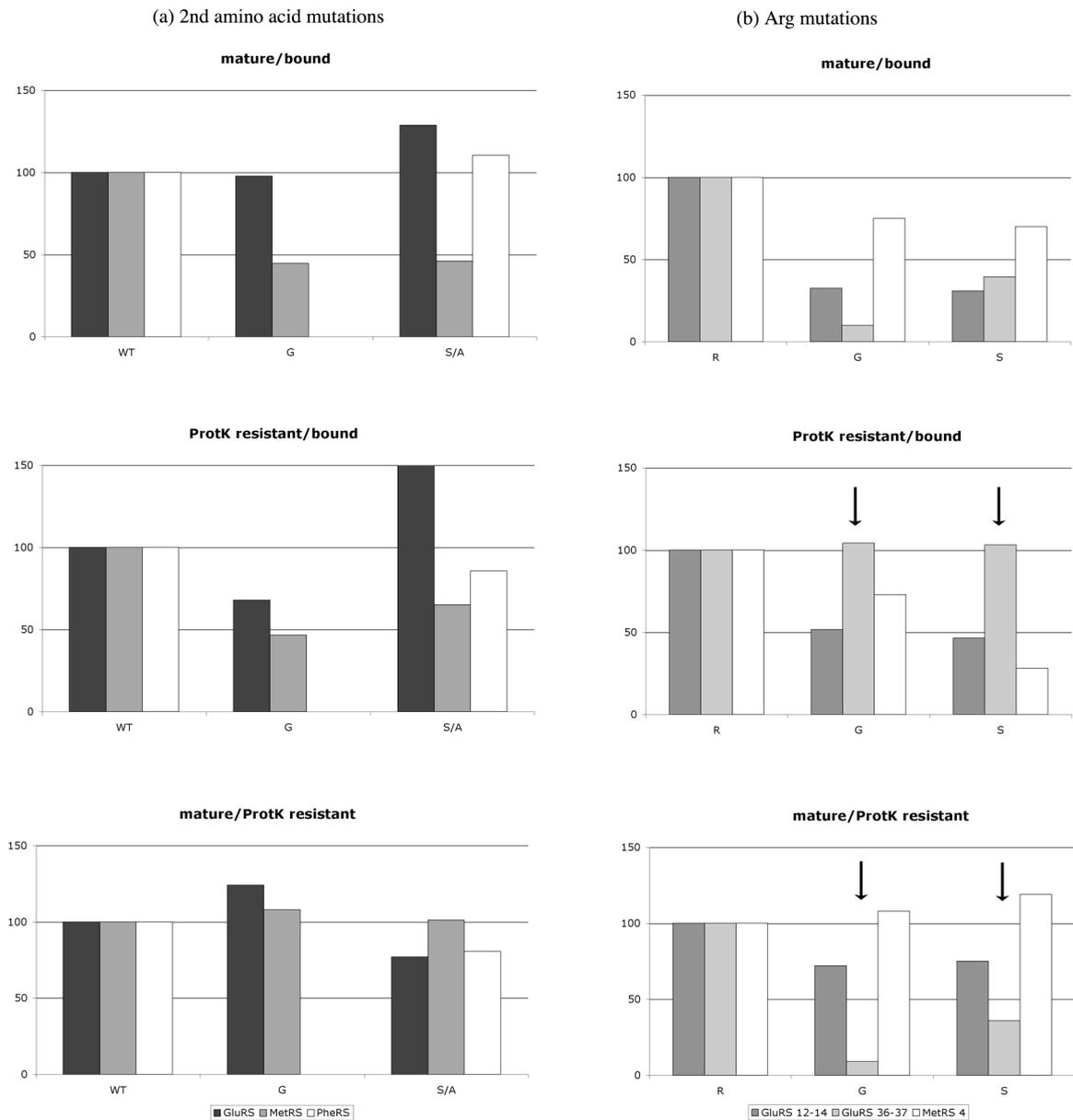






**Supplementary Figure 4:** *In vitro* import into isolated mitochondria and chloroplasts of (a) controls constructs (Cox IV-GFP, RecA-GFP, GFP) and wild type aaRS-GFP fusions (GluRS:GluRS-GFP, MetRS: MetRS-GFP, PheRS:PheRS-GFP fusion); (b) mutants aaRS-GFP constructs.

*In vitro* transcriptions/translations products (lane In) were incubated in the presence of mitochondria or chloroplasts and were partially processed onto a smaller polypeptides (lane 1), which corresponded to the fusion proteins upon cleavage of the targeting sequences. The addition of protéinase K to the import medium reduced the signals corresponding to the preproteins but did not affect the signals corresponding to the processed proteins that were protected by mitochondrial or chloroplatic membranes (lane 2). For the controls and the wild type construct (a), two additional tests were made : the addition of valinomycin, which is known to inhibit mitochondrial protein import, or darkness, which is known to inhibit chloroplatic protein import, prevented the formation of the processed proteins (lane 3 and 4). In these conditions, all radioactive signals were digested by proteinase K (lane 4), showing that the signal observed in lane 2 represented genuine imported proteins.



Supplementary Figure 5: Mitochondrial import and processing of mutants

The efficiency of import *sensu stricto*, that is translocation through the membranes is evaluated by the ratio of ProtK resistant proteins versus bound proteins. The efficiency of processing is evaluated by the ratio of mature proteins versus imported proteins, that is ProtK resistant proteins. The efficiency of processing is clearly reduced for GluRS 36-37 mutations, but the import of these mutants is identical to that of wild type (arrows).

In chloroplasts, no preprotein signal could be detected after ProtK treatment, so the mature/bound ratio corresponds to the import efficiency.

WT, wild type; G, Gly; S, Ser; A, Ala; R, Arg.



**Chapitre III**  
**Caractérisation des**  
**séquences de double**  
**adressage :**  
**Organisation des séquences d'adressage sous**  
**forme de domaines**

ProRS wt At5g52520 <sup>1</sup>MVSSSLRLP<sup>10</sup>SLTSLLPAT<sup>20</sup>TRYPATLRR<sup>30</sup>TVCLRNRLPS<sup>40</sup>GFATAPSGTAS<sup>50</sup>PETKSSE

ProRS Δ 2-20 MRYPATLRR<sup>30</sup>TVCLRNRLPS<sup>40</sup>GFATAPSGTAS<sup>50</sup>PETKSSE

TyrRS wt At3g02660 <sup>1</sup>MAYATGITFA<sup>10</sup>SRSILPIC<sup>20</sup>SRTFLSPLRVA<sup>30</sup>SLLVFPEKSSA<sup>40</sup>TFRRVQVPHL<sup>50</sup>FSTLS

TyrRS Δ 2-14 MPIC<sup>20</sup>SRTFLSPLRVA<sup>30</sup>SLLVFPEKSSA<sup>40</sup>TFRRVQVPHL<sup>50</sup>FSTLS

TyrRS Δ 2-27 MVA<sup>30</sup>SLLVFPEKSSA<sup>40</sup>TFRRVQVPHL<sup>50</sup>FSTLS

ValRS wt At5g49030 <sup>1</sup>MILKTAFSLP<sup>10</sup>TPTTLLSP<sup>20</sup>SSPHQLN<sup>30</sup>TLFFTRRRRLISP<sup>40</sup>SRLNSIFSQ<sup>50</sup>RRFSFS

ValRS Δ 2-27 MHQLN<sup>30</sup>TLFFTRRRRLISP<sup>40</sup>SRLNSIFSQ<sup>50</sup>RRFSFS

IleRS wt At5g49030 <sup>1</sup>MSSFFKSFAGNPREAAAM<sup>20</sup>VMQSSSYRV<sup>30</sup>LSGKSCSNLRR<sup>40</sup>NTPLDSFLAK<sup>50</sup>GRSS

IleRS Δ 2-22 MSSSYRV<sup>30</sup>LSGKSCSNLRR<sup>40</sup>NTPLDSFLAK<sup>50</sup>GRSS

IleRS Δ 2-35 MRRNTPLDSFLAK<sup>50</sup>GRSS

AspRS wt At4g33760 <sup>1</sup>MSLLRTLPL<sup>10</sup>RPTRF<sup>20</sup>LSATAI<sup>30</sup>ISISNATNFFVVPKRTN<sup>40</sup>PLPGTRRTFSSSP<sup>50</sup>VAAA

AspRS Δ 2-16 MSATAI<sup>30</sup>ISISNATNFFVVPKRTN<sup>40</sup>PLPGTRRTFSSSP<sup>50</sup>VAAA

ThrRS wt At2g04842 <sup>1</sup>MASSHSLLF<sup>10</sup>SSSFLSKPSS<sup>20</sup>FTSSLRRFVYL<sup>30</sup>LPTRQFWPR

ThrRS Δ 2-23 MLRRFVYL<sup>30</sup>LPTRQFWPR

LysRS wt At3g13490 <sup>1</sup>MEALKVW<sup>10</sup>SLTATPLKQLL<sup>20</sup>RLSSSSTRLA<sup>30</sup>TTIYGRRSYHL<sup>40</sup>SPALR

LyspRS Δ 2-16 MQLLRLSSSSTRLA<sup>30</sup>TTIYGRRSYHL<sup>40</sup>SPALR

**Figure 52:** Séquences N-terminales des 7 aaRS utilisées au cours de cette étude et séquences N-terminales des délétions correspondantes

Pour déterminer les caractéristiques des séquences ambiguës, nous avons tout d'abord effectué, en accord avec l'analyse *in silico*, des mutations ponctuelles sur les résidus les plus conservés de trois séquences d'adressage d'aaRS (GluRS, MetRS et PheRS). L'analyse de l'importation *in vitro* de ces séquences fusionnées à la séquence de la GFP nous a permis de mettre en évidence l'importance des Arginines pour l'adressage des protéines vers les mitochondries. Pour les constructions mutées au niveau des résidus en 2<sup>ème</sup> position, les effets des mutations sont variables et dépendent de la séquence mutée. Au cours de cette étude, nous avons également analysé les effets sur l'importation de deux délétions de 28 et 13 acides aminés sur la GluRS. Totalement abolie dans le premier cas (GluRS $\Delta$ 2-29), l'importation est fortement affectée dans les mitochondries et les chloroplastes lorsque les 13 premiers résidus sont délétés (GluRS $\Delta$ 2-14) (cf. Résultats chapitre II).

Les résultats obtenus pour les constructions mutées au niveau du 2<sup>ème</sup> résidu et pour les constructions délétées dans leur partie N-terminale suggèrent qu'en plus de certains résidus particulièrement conservés d'une séquence à l'autre, d'autres facteurs interviennent dans la spécificité de l'adressage des séquences ambiguës. C'est pourquoi nous avons décidé de poursuivre notre analyse en nous intéressant cette fois à l'**organisation de la séquence sous forme de domaines**. En collaboration avec le laboratoire de E. Glaser (Université de Stockholm) nous avons tenté de déterminer si les séquences ambiguës possédaient des domaines permettant l'importation des protéines dans les mitochondries et des domaines permettant l'importation vers les chloroplastes.

Pour cette étude, nous avons délété la partie N-terminale de sept aaRS (la Prolyl-ARNt synthétase ou ProRS (At5g52520), la Tyrosyl-ARNt synthétase ou TyrRS (At3g02660), la Valyl-ARNt synthétase ou ValRS (At5g49030), l'Isoleucyl-ARNt synthétase ou IleRS (At5g49030), l'Aspartyl-ARNt synthétase ou AspRS (At4g33760), la Thréonyl-ARNt synthétase ou ThrRS (At2g04842) et la Lysyl-ARNt synthétase ou LysRS (At3g13490)) (**Figure 52**).

Celles-ci présentent à la fois les caractéristiques des pré-séquences mitochondriales et des peptides de transit chloroplastiques. D'une longueur moyenne de 70 résidus (d'après les logiciels de prédiction MitoProt, ChloroP et Wolfpsort), elles possèdent un contenu élevé en résidus Sérine, Leucine et Isoleucine et contiennent peu de résidus Alanine. Toutes les séquences sont prédites comme chloroplastiques par ChloroP et mitochondriales par MitoProt (à l'exception de l'IleRS), deux programmes respectivement spécifiques de l'adressage des protéines vers les chloroplastes ou vers les mitochondries ; alors que d'après les autres

	ChloroP	MitoProt	TargetP	Predotar	WolfProt	Cello
ProRS wt	Chloro	Mito	Chloro	Mito	Chloro	Mito/Chloro
TyrRS wt	Chloro	Mito	Chloro	Chloro	Chloro	Chloro
ValRS wt	Chloro	Mito	Chloro	Mito	Chloro	Chloro
IleRS wt	Chloro		Chloro	Chloro	Mito	Mito/Chloro
AspRS wt	Chloro	Mito	Chloro	Mito	Mito	Mito
ThrRS wt	Chloro	Mito	Chloro	Chloro	Chloro	
LysRS wt	Chloro	Mito	Mito	Chloro	Chloro	Mito/Chloro

**Table 9:** Localisation des protéines sauvages d'après les logiciels de prédiction.

Avec Mito : localisation mitochondriale  
Chloro : localisation chloroplastique  
Mito/Chloro : localisation mitochondriale et chloroplastique  
  : pas de localisation prédite

	TargetP		Predotar		MitoProt	ChloroP	WolfProt		Cello	
	Mito	Chloro	Mito	Chloro	Mito	Chloro	Mito	Chloro	Mito	Chloro
ProRS wt	0,631	0,722	0,36	0,19	0,9646	0,574	98	84	1,906	1,38
ProRS Δ2-20	0,927	0,151	0,86	0	0,8774	0,497	89	38	1,359	1,115
TyrRS wt	0,191	0,86	0,13	0,84	0,9654	0,579	81	38	0,59	3,377
TyrRS Δ2-14	0,395	0,364	0,39	0,01	0,9297	0,578	84	38	0,59	3,245
TyrRS Δ2-27	0,228	0,731	0,29	0,54	0,82	0,573	83	38	0,572	3,179
ValRS wt	0,116	0,938	0,79	0,6	0,9938	0,594	96	76	0,694	1,025
ValRS Δ2-27	0,967	0,111	0,74	0,02	0,9955	0,554	98	38	0,645	0,852
IleRS wt	0,129	0,769	0,07	0,52	0,4112	0,575	98	38	1,18	1,175
IleRS Δ2-22	0,61	0,707	0,21	0,27	0,757	0,568	81	38	1,27	0,906
IleRS Δ2-35	0,504	0,242	0,15	0	0,2095	0,54	100	67	1,168	0,706
AspRS wt	0,316	0,363	0,5	0,01	0,9912	0,571	98	38	2,059	0,751
AspRS Δ2-16	0,031	0,917	0,01	0,9	0,9414	0,594	78	83	1,306	0,873
ThrRS wt	0,138	0,869	0,18	0,96	0,9961	0,581	78	38	1,102	1,021
ThrRS Δ2-23	0,918	0,072	0,91	0	0,929	0,498	80	38	0,665	0,195
LysRS wt	0,514	0,487	0,26	0,56	0,8137	0,55	96	96	1,367	1,307
LysRS Δ2-16	0,866	0,535	0,88	0,41	0,9625	0,578	93	38	1,32	1,299

**Table 10:** Prédiction d'adressage des différentes constructions.

logiciels de prédiction (TargetP, Predotar et Wolfprot) la localisation de ces protéines est plutôt chloroplastique (20 des 28 prédictions sont chloroplastiques (**Table 9**)).

D'après les résultats des logiciels de prédiction, nous avons créé les mutants de délétion des aaRS. En testant différentes constructions, nous avons sélectionné celles pour lesquelles l'élimination d'un segment dans la partie N-terminale avait le plus fort impact sur l'adressage. Nous avons ainsi choisi 9 constructions (**Table 10**), permettant par exemple de passer d'une prédiction d'adressage plutôt chloroplastique à une prédiction plutôt mitochondriale (ThrRS<sub>wt</sub>→ThrRS $\Delta$ 2-23 ; TyrRS<sub>wt</sub>→TyrRS $\Delta$ 2-14 avec les logiciels TargetP et Predotar), ou inversement d'une prédiction plutôt mitochondriale à une prédiction plutôt chloroplastique (AspRS wt→AspRS $\Delta$ 2-16 d'après Predotar ou WolfProt)).

Nous avons ensuite effectué des tests d'importation dans des mitochondries et des chloroplastes pour déterminer si les prédictions reflétaient la situation *in silico* : Pour chacune des aminoacyl-ARNt synthétases, la séquence correspondant à la partie N-terminale de l'aaRS sauvage ou délétée a été clonée en amont et en phase avec la séquence codante de la GFP (« Green Fluorescent Protein »). Ces constructions ont été sous-clonées dans le pBS-KS pour réaliser des tests d'importation *in vitro*, et dans le pBIN pour observer la localisation des protéines de fusion *in vivo* dans des cellules de *Nicotiana benthamiana*.

J'ai réalisé à Strasbourg les tests d'importation *in vivo*. Pour ceci nous avons utilisé un système d'expression transitoire dans les protoplastes de *N. benthamiana* agroinfiltrés. L'expression et la localisation de la GFP est visualisée par microscopie confocale. Ce système permet d'étudier l'adressage des protéines dans un système cellulaire intact, qui reflète les capacités d'adressage *in vivo* de la séquence N-terminale de l'aaRS.

Mais il n'est pas exempt de désavantages : tout d'abord, la protéine chimérique est surexprimée à des niveaux très élevés ne reflétant pas toujours le niveau d'expression physiologique. Ensuite l'observation de l'importation des protéines par microscopie fournit principalement une information d'ordre qualitatif sur la présence ou non des protéines associées aux mitochondries ou aux chloroplastes. Les variations de localisation mineures ne peuvent pas être estimées par cette méthode.

Enfin, les effets des mutations sur l'ensemble du mécanisme impliqué dans l'importation des protéines (liaison aux récepteurs situés à la surface des membranes, translocation des

---

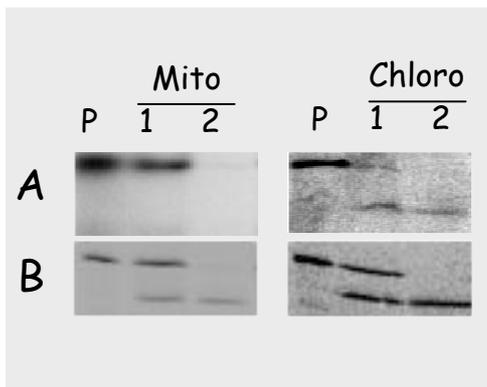
précurseurs au sein des organites, clivage de la séquence d'adressage...) ne peuvent être analysés par cette technique.

Parallèlement, Anna-Karine Berglünd, du laboratoire d'E. Glaser (Université de Stockholm) teste actuellement l'importation des protéines dans les organites en utilisant deux autres approches :

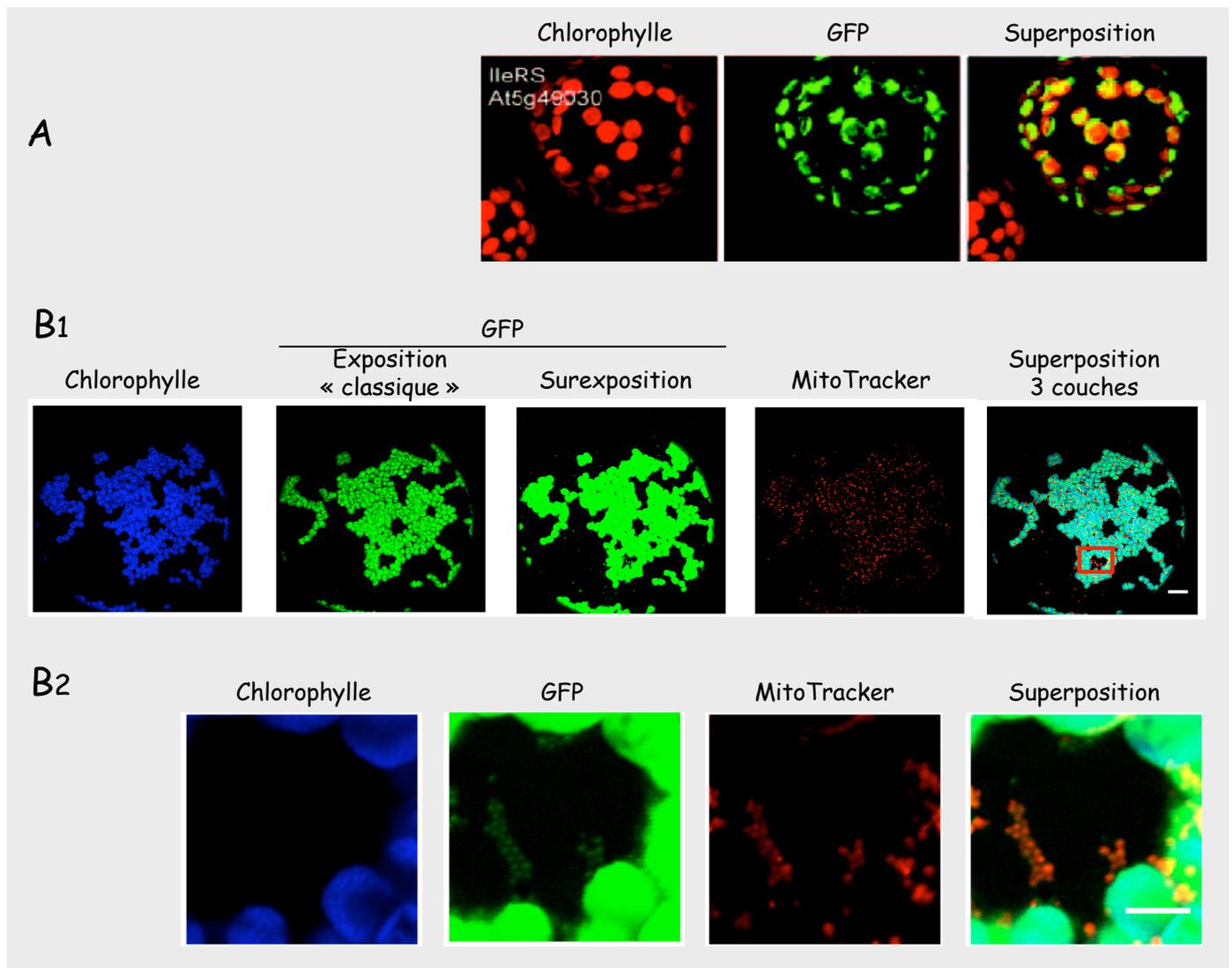
Le système d'importation *in vitro* « classique », dans des mitochondries ou des chloroplastes isolés est utilisé. Malgré l'absence de système cellulaire intact et de compétition entre les organites, cette approche présente l'avantage majeur de pouvoir analyser étape par étape l'ensemble du mécanisme d'importation des protéines.

Enfin une dernière technique est utilisée au cours de cette étude : le système de double importation, développé à Stockholm par l'équipe d'E. Glaser (Rudhe et al., 2002a). Cette technique d'importation *in vitro*, lourde d'un point de vue pratique, essaye de rétablir la compétition entre les organites : après avoir été purifiés séparément, mitochondries et chloroplastes sont mélangés puis incubés avec le précurseur protéique radioactif, avant d'être re-purifiés après l'étape d'importation (cf. Matériel et Méthodes II.5.B).





**Figure 53:** Importation *in vitro* de la ValRS (A) dans des mitochondries de pommes de terre et des chloroplastes de pois (d'après Duchêne et al. 2005); (B) dans des mitochondries et des chloroplastes d'épinard (d'après A.K. Berglünd). Les mitochondries (Mito) et les chloroplastes (Chloro) isolés sont incubés avec le précurseur protéique radioactif (P) (pistes 1), puis traités à la protéinase K (pistes 2).



**Figure 54:** Importation *in vivo* de l'IleRS d'après Duchêne et al. 2005 (A), d'après les tests d'importation réalisés au cours de cette étude (B); B<sub>2</sub> correspond à un agrandissement de la zone encadrée en rouge dans B<sub>1</sub>. L'échelle correspond à 20µm pour B<sub>1</sub> et à 5µm pour B<sub>2</sub>.

## RESULTATS

### A-ANALYSE DES CONSTRUCTIONS SAUVAGES

Une analyse systématique de l'adressage des aaRS mitochondriales et chloroplastiques d'*A. thaliana* avait déjà été réalisée (Duchene et al., 2005). Au cours de cette étude, la localisation des séquences d'adressage des enzymes fusionnées à la GFP avait été déterminée par des tests d'importation *in vitro* dans les organites isolés et par l'analyse *in vivo* de l'expression transitoire des protéines chimères dans des protoplastes de *N. benthamiana*. Les résultats de ces tests d'importation ont mis en évidence le fait que le double adressage mitochondrial et chloroplastique est la règle générale pour les aaRS : 18 aaRS présentent une séquence de double adressage sur les 24 aaRS d'organites identifiées. Ainsi, malgré le faible niveau de fluorescence observé dans les chloroplastes pour certaines constructions (AspRS, ProRS et TyrRS), les séquences d'adressage des aaRS permettent la localisation des protéines à la fois dans les mitochondries et dans les chloroplastes.

L'étude réalisée au cours de ma thèse a permis d'apporter des informations nouvelles par rapport aux travaux réalisés en 2005, où dans deux cas, les résultats obtenus *in vitro* et *in vivo* ne concordaient pas.

Le premier cas concerne la ValRS : doublement adressée *in vivo*, la localisation mitochondriale de cette protéine n'avait pas pu être mise en évidence *in vitro* dans les travaux précédents (**Figure 53A**). Au cours de cette étude, les tests réalisés par Anna-Karine Berglünd montrent l'importation *in vitro* de la ValRS (**Figure 53B**).

L'utilisation de mitochondries d'épinard par Anna-Karine Berglünd plutôt que de pommes de terre (Duchene et al., 2005) pourrait expliquer cette différence. En effet, des exemples ont déjà été rapportés où suivant le matériel végétal utilisé on observe des variations d'importation (Rudhe et al., 2002b).

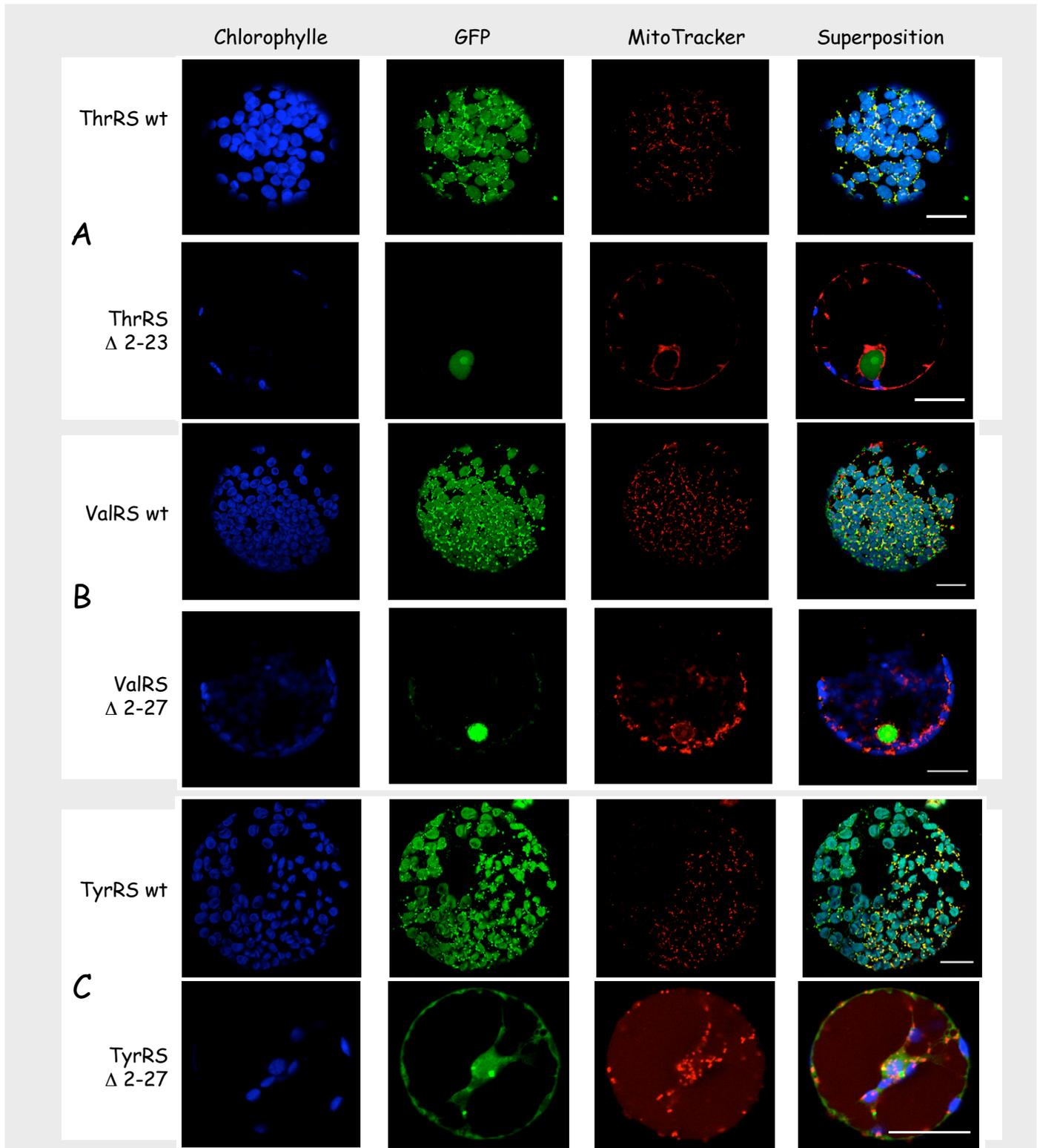
Le second cas de non concordance entre résultats *in vitro* et *in vivo* concerne l'IleRS : la localisation mitochondriale n'avait pas été mise en évidence au cours des tests d'importation *in vivo* (**Figure 54A**).

Les expériences d'importation *in vivo* ont été refaites. L'observation en microscopie confocale à un niveau d'exposition « classique » ne permet effectivement pas d'observer de fluorescence dans les mitochondries (**Figure 54B<sub>1</sub>**). Avec ce niveau d'exposition « classique »

---

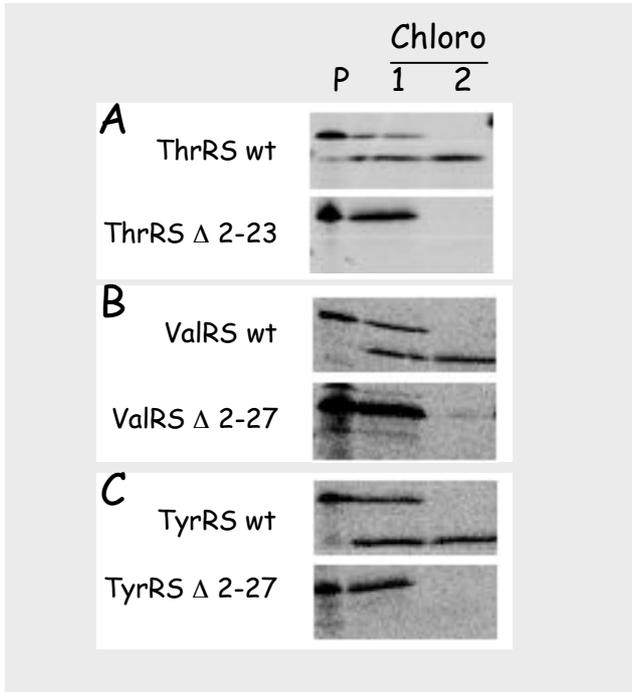
on n'observe aucun signal dans la fenêtre d'acquisition de la GFP pour les protoplastes contrôle qui ne sont pas agroinfiltrés. Par contre, lorsque l'on modifie les paramètres d'acquisition du signal et que l'on « surexpose » on détecte un faible signal qui correspond à la GFP présente dans les mitochondries (**Figures 54B<sub>1</sub> et 54B<sub>2</sub>**). Avec ce niveau de surexposition et pour des protoplastes contrôles qui ne sont pas agroinfiltrés, on observe un signal au niveau des chloroplastes (qui correspond à l'autofluorescence de la chlorophylle) mais aucun signal au niveau des mitochondries dans la fenêtre d'acquisition de la GFP (cf. **Figure 59C**). Le signal observé au niveau des mitochondries (**Figure 54B<sub>2</sub>**) est donc significatif. Ainsi, *in vivo*, la protéine correspondant à la séquence d'adressage de l'IleRS fusionnée à la GFP est très faiblement importée dans les mitochondries, ce qui contraste avec son niveau d'importation dans les chloroplastes, le plus élevé de toutes les constructions testées au cours de cette étude. La quantification des tests d'importation *in vitro* reste cependant à effectuer pour confirmer ces observations.



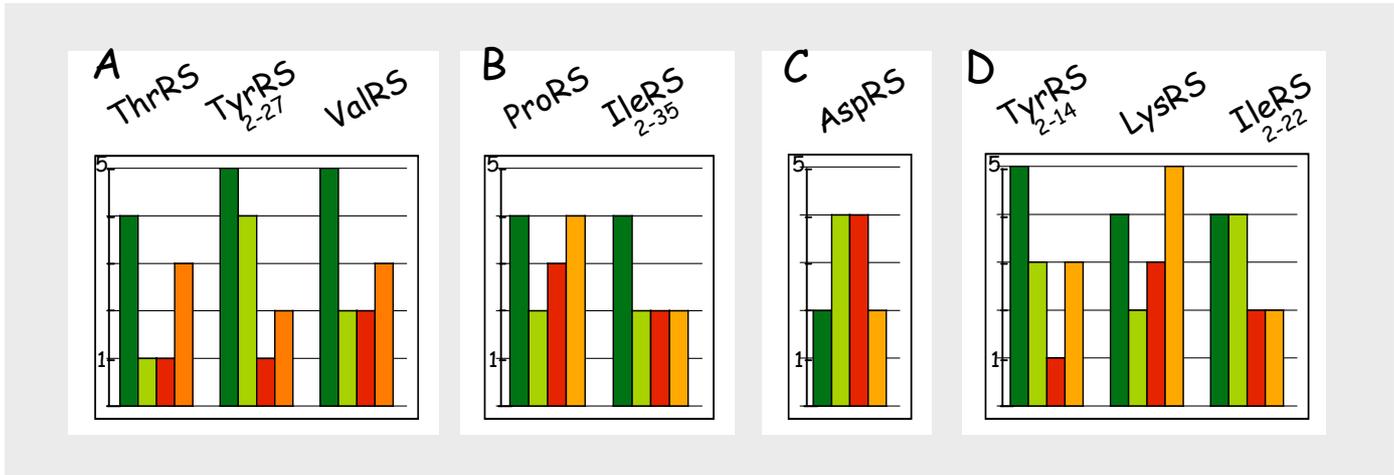


**Figure 55:** Importation *in vivo* des constructions sauvages et mutantes correspondant à la ThrRS (A) de la ValRS (B) et de la TyrRS (C). L'échelle correspond à 20 $\mu$ m.





**Figure 56:** Importation *in vitro* des constructions sauvages et mutantes ThrRS (A) ValRS (B) et TyrRS (C). Les chloroplastes (Chloro) isolés sont incubés avec le précurseur protéique radioactif (P) (piste 1), puis traités à la protéinase K (piste 2).



**Figure 57:** Diagramme représentant le nombre de logiciels prédisant la localisation des différentes constructions (en ordonnée), avec

- Prédictions chloroplastiques des constructions sauvages
- Prédictions chloroplastiques des constructions mutantes
- Prédictions mitochondriales des constructions sauvages
- Prédictions mitochondriales des constructions mutantes

Logiciels utilisés: TargetP, Predotar, Mitoprot, ChloroP, Wolfprot et Cello.

## B-EFFETS DES DELETIONS, DIFFERENTS CAS OBSERVES

### 1.Abolition de l'importation dans les mitochondries et les chloroplastes

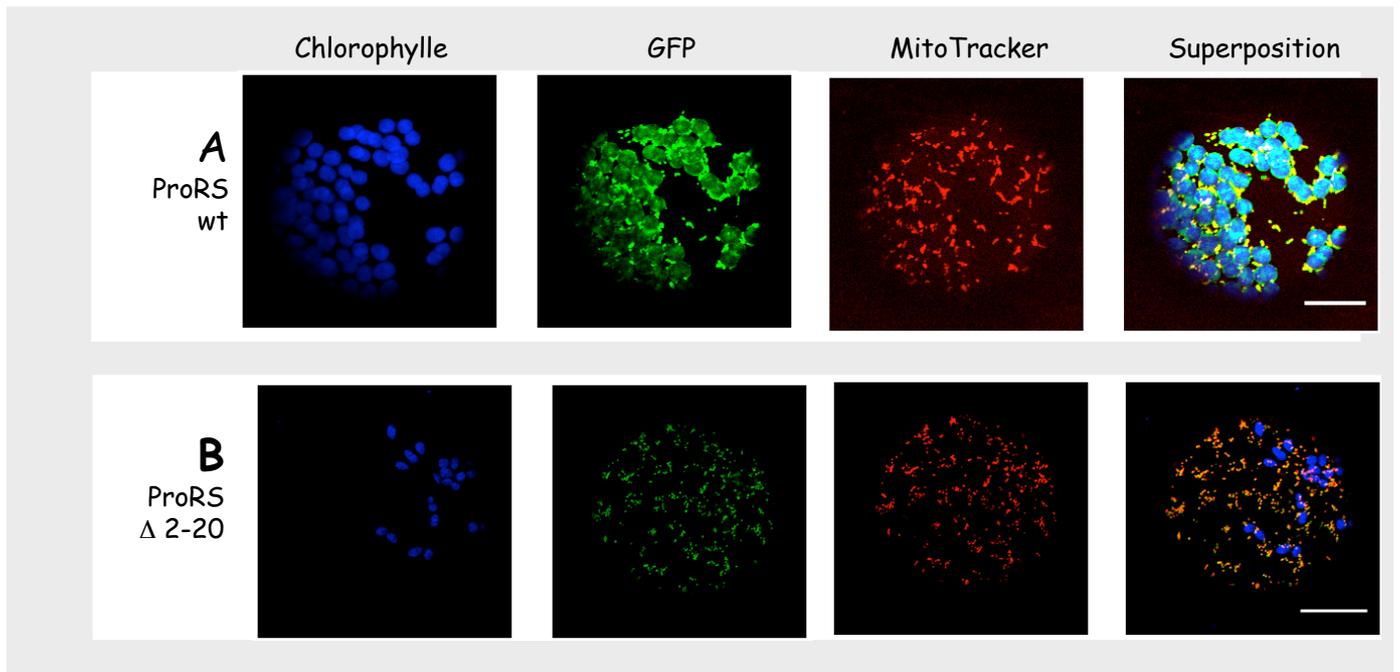
Les constructions réalisées au cours de cette étude ont permis de mettre en évidence l'importance de la portion la plus N-terminale des séquences d'adressage ambiguës pour l'adressage des protéines. En effet, pour trois des constructions (ThrRS $\Delta$ 2-23 (A), ValRS $\Delta$ 2-27 (B) et TyrRS $\Delta$ 2-27(C)), les délétions réalisées abolissent totalement l'importation *in vivo* des protéines dans les mitochondries et les chloroplastes (**Figure 55**).

Dans les chloroplastes, les tests d'importation obtenus *in vitro* confirment les résultats *in vivo* : les trois protéines tronquées dans leur partie N-terminale ne sont plus importées dans les chloroplastes isolés (**Figure 56**).

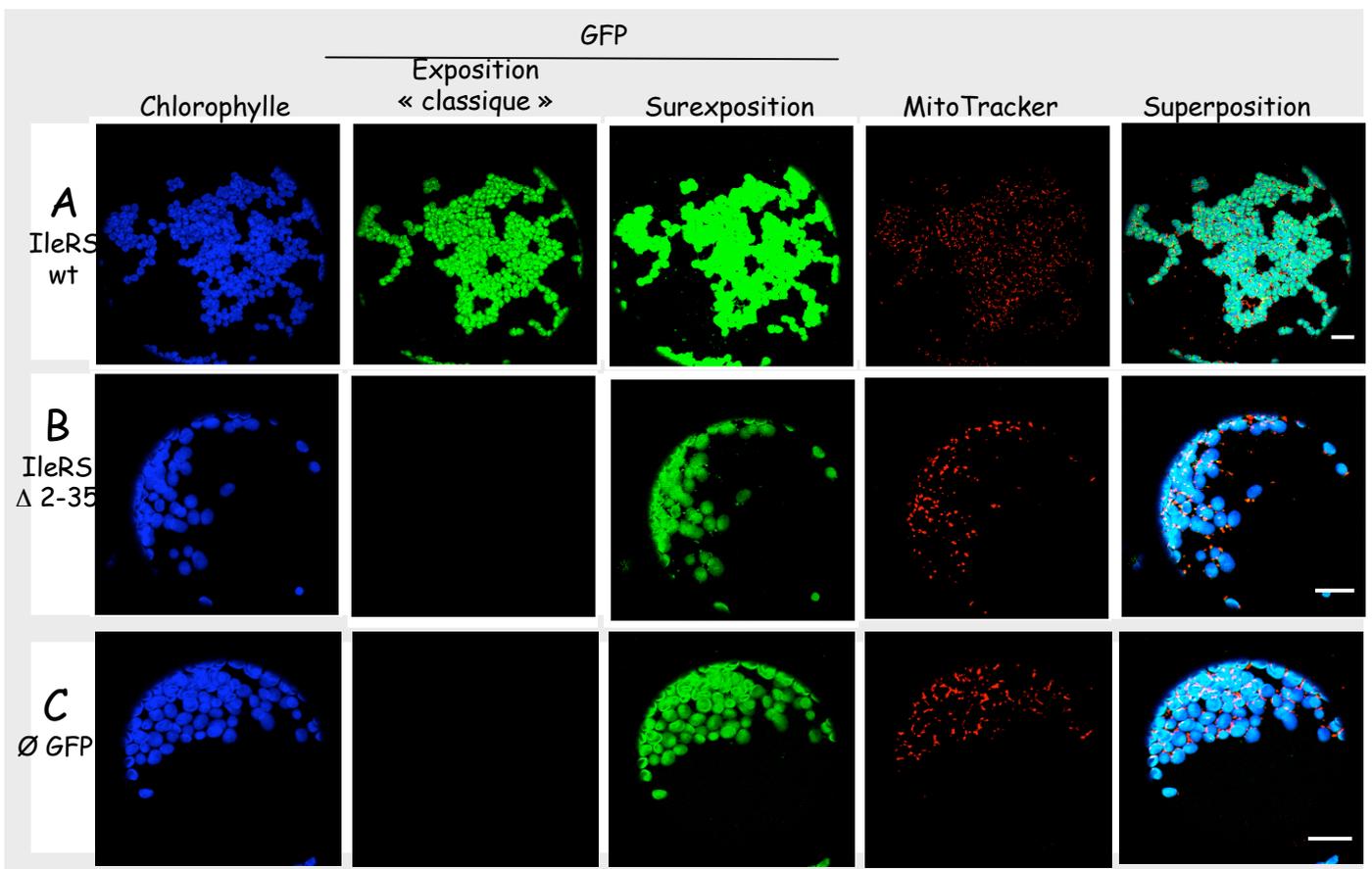
En ce qui concerne l'analyse *in silico*, les prédictions chloroplastiques vont dans le sens de ce que l'on observe expérimentalement, c'est-à-dire une diminution pour moitié du nombre de logiciels prédisant une localisation chloroplastique des protéines : la délétion de la partie N-terminale de la ThrRS et de la ValRS entraîne la perte de 3 prédictions d'adressage chloroplastique contre 1 pour la TyrRS (**Figure 57A**).

Dans les mitochondries, les tests d'importation *in vitro* restent à effectuer. On note que moins d'un tiers des logiciels prédisent les protéines sauvages comme étant adressées aux mitochondries (2 logiciels pour la ValRS, seulement 1 logiciel pour la ThrRS et la TyrRS) (**Figure 57A**). On note que dans les trois cas, les délétions dans la partie N-terminale entraînent une augmentation du nombre de logiciels prédisant un adressage mitochondrial des protéines ; 2, 3 et 4 logiciels prédisant respectivement la ThrRS, la TyrRS et la ValRS comme étant des protéines mitochondriales.

Enfin, deux des trois constructions (ThrRS $\Delta$ 2-23 (A), ValRS $\Delta$ 2-27 (B), **Figure 55**) semblent *in vivo* être localisées dans le noyau. Cependant les logiciels de prédiction utilisés (Wolfprot, Cello, Loctree, NLSonline) ne détectent aucun signal NLS dans les séquences d'adressage testées.



**Figure 58:** Importation *in vivo* de la ProRS sauvage (A) et délétee (B) .  
L'échelle correspond à 20 $\mu$ m.



**Figure 59:** Importation *in vivo* de l'IleRS sauvage (A) et délétee (B). Observation d'un protoplaste témoin non infiltré (C). L'échelle correspond à 20 $\mu$ m.

## 2. Abolition de l'importation dans les chloroplastes

Pour deux des constructions (ProRS $\Delta$ 2-20 et IleRS $\Delta$ 2-35), on observe *in vivo* une abolition de l'importation dans les chloroplastes.

La délétion des 19 premiers résidus de la ProRS (ProRS $\Delta$ 2-20) entraîne une perte totale de l'adressage chloroplastique *in vivo*. La protéine reste cependant importée dans les mitochondries (**Figure 58**).

On observe également une perte de l'adressage chloroplastique de IleRS $\Delta$ 2-35 : la construction sauvage est importée à un niveau élevé dans les chloroplastes et faiblement importée dans les mitochondries (cf. Résultats A et **Figure 59A**).

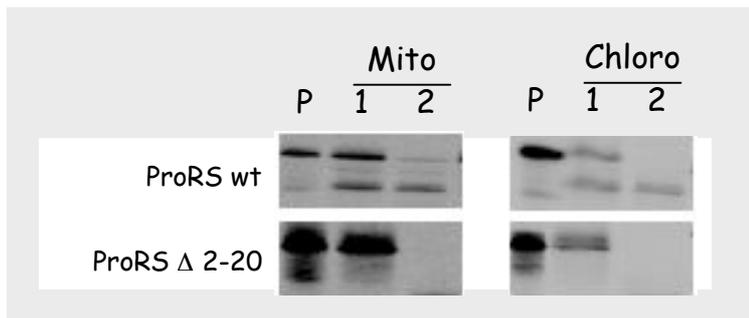
Pour la construction délétée (IleRS $\Delta$ 2-35) on n'observe aucune fluorescence dans la fenêtre d'acquisition « classique », mais en « surexposant » on observe deux types de signaux (**Figure 59B**) :

- Des signaux ponctuels qui co-localisent avec le MitoTracker montrant que le faible adressage mitochondrial est maintenu.
- Des structures plus larges qui co-localisent avec les chloroplastes.

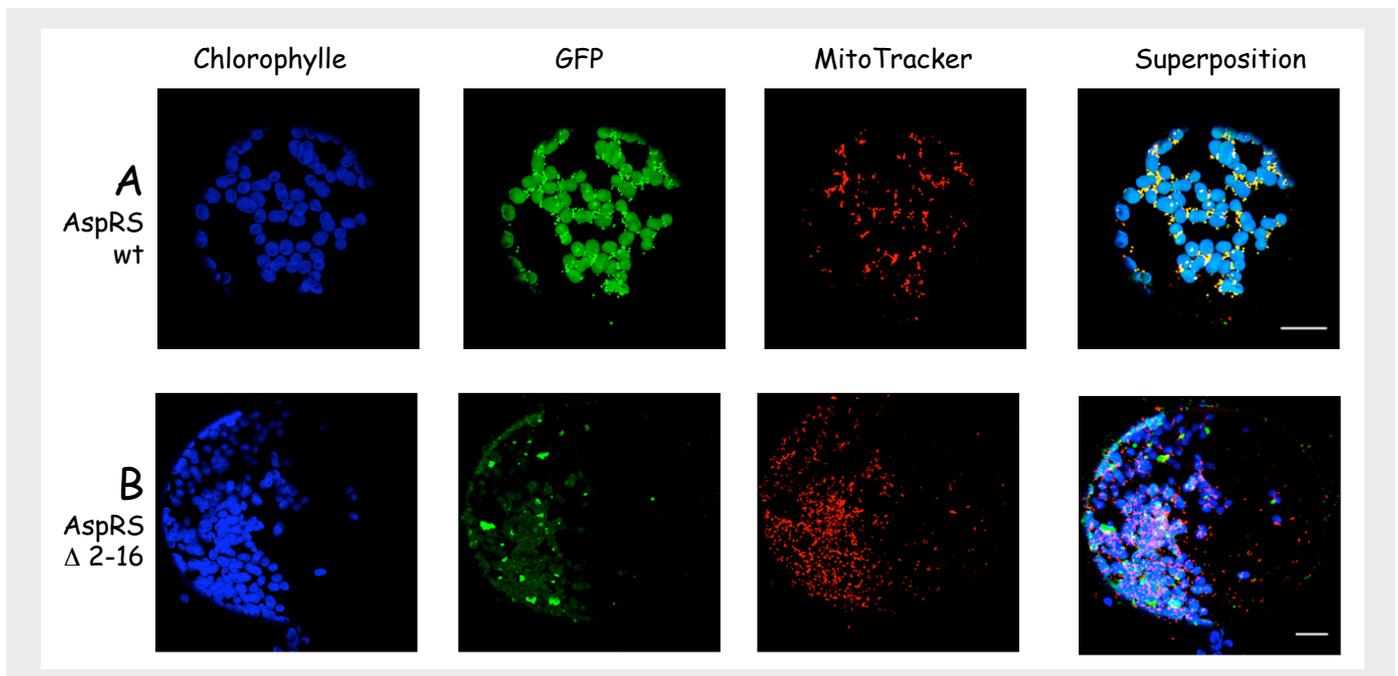
On ne peut cependant pas conclure que la fluorescence observée dans les chloroplastes correspond à la fluorescence de la GFP. En effet l'analyse dans les mêmes conditions d'un protoplaste contrôle non infiltré (**Figure 59C**) indique que la fluorescence observée dans les chloroplastes correspond uniquement à l'auto fluorescence de la chlorophylle.

Ainsi la délétion des 20 premiers résidus de la ProRS et la délétion des 35 premiers résidus de l'IleRS entraînent une perte de l'adressage chloroplastique des protéines sans pour autant modifier l'adressage mitochondrial.

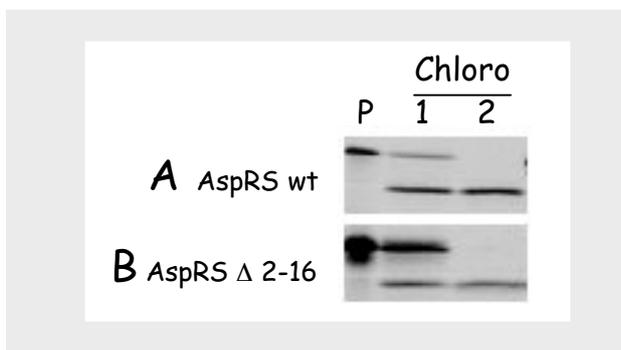
Comme pour les constructions précédentes, les protéines sauvages ProRS et IleRS sont plutôt prédites comme chloroplastiques (**Figure 57B**) et la délétion de la partie N-terminale entraîne une diminution du nombre de logiciels qui prédisent une localisation chloroplastique des protéines (4 des 5 logiciels pour les protéines sauvages, contre seulement 2 pour les mutants). On note que les délétions affectent peu les prédictions d'adressage mitochondrial : la ProRS délétée est prédite comme mitochondriale par 3 logiciels, contre 2 pour la protéine sauvage et la délétion de la partie N-terminale de l'IleRS n'entraîne pas de variations du nombre de logiciels prédisant la protéine comme mitochondriale.



**Figure 60:** Importation *in vitro* des constructions sauvages et mutantes ProRS. Les mitochondries (Mito) et les chloroplastes (Chloro) isolés sont incubés avec le précurseur protéique radioactif (P) (pistes 1), puis traités à la protéinase K (pistes 2).



**Figure 61:** Importation *in vivo* de l'AspRS sauvage (A) et délétee (B). L'échelle correspond à 20µm



**Figure 62:** Importation *in vitro* de l'AspRS sauvage (A) et délétee (B). Les chloroplastes (Chloro) isolés sont incubés avec le précurseur protéique radioactif (P) (piste 1), puis traités à la protéinase K (piste 2).

Dans les deux cas, les résultats sont donc en accord avec les résultats obtenus *in vivo* et les délétions entraînent une diminution de l'adressage chloroplastique des protéines sans pour autant affecter l'adressage mitochondrial.

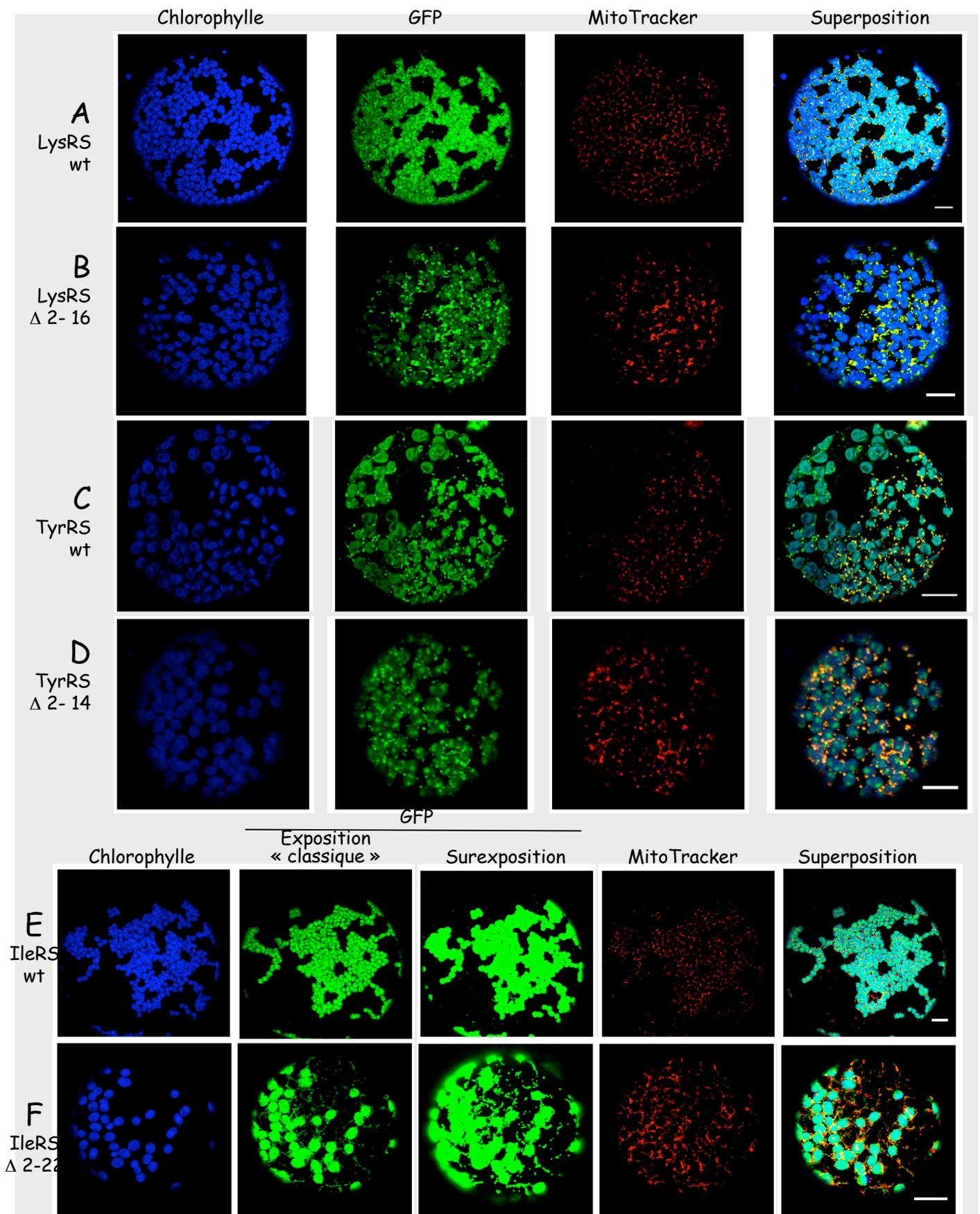
Les résultats obtenus *in vitro* pour l'importation dans les chloroplastes de la construction ProRSA $\Delta$ 2-20 sont identiques à ceux obtenus *in vivo* : la protéine n'est plus importée dans les chloroplastes (**Figure 60**). On note également l'absence d'importation *in vitro* de la ProRSA $\Delta$ 2-20 dans les mitochondries (**Figure 60**), alors que la protéine est importée *in vivo* dans les mitochondries. Ceci pourrait s'expliquer par le « retard » observé *in vivo* : pour cette construction, il faut attendre 3 jours après l'agroinfiltration des feuilles de *N. benthamiana* pour observer la présence de GFP dans les mitochondries, alors que 2 jours suffisent pour toutes les autres constructions analysées au cours de cette étude. Nous avons essayé de mieux comprendre ce retard d'adressage *in vivo*. Les résultats obtenus sont présentés dans la partie C de ce chapitre. Les tests d'importation *in vitro* dans les mitochondries et les chloroplastes de l'IleRSA $\Delta$ 2-35 sont à effectuer.

### 3. Abolition de l'importation dans les mitochondries.

Pour l'AspRS, la délétion des 15 premiers résidus entraîne *in vivo* une abolition totale de l'importation dans les mitochondries. En effet on observe deux types de signaux : des agrégats ne localisant pas avec les mitochondries et une faible fluorescence qui colocalise avec les chloroplastes. Il est difficile de déterminer si la fluorescence observée dans les chloroplastes des cellules exprimant l'AspRSA $\Delta$ 2-16 est due à de la GFP ou au « bruit de fond » correspondant à l'auto-fluorescence de la chlorophylle (**Figure 61**).

*In vitro* l'AspRSA $\Delta$ 2-16 est importée dans les chloroplastes mais à un niveau inférieur à celui observé pour la construction sauvage (**Figure 62**). Ces résultats suggèrent que la fluorescence observée *in vivo* dans les chloroplastes correspond bien à l'importation de l'AspRSA $\Delta$ 2-16.

*In silico*, l'AspRS sauvage est la seule protéine qui est plutôt prédite dans les mitochondries (4 des 5 logiciels). La délétion de la partie N-terminale entraîne une diminution du nombre de logiciels prédisant la protéine dans les mitochondries et une augmentation du



**Figure 63:** Importation *in vivo* des constructions sauvages et mutantes de la LysRS (A-B) de la TyrRS (C-D) et à l'IleRS (E-F). L'échelle correspond à 20 $\mu$ m

nombre de logiciels prédisant la protéine dans les chloroplastes (2 logiciels pour le sauvage et 4 pour le mutant) (**Figure 57C**). Ainsi, seuls les résultats obtenus pour les prédictions mitochondriales sont en accord avec l'analyse *in vivo*.

Les tests d'importation *in vitro* restent à faire dans les mitochondries.

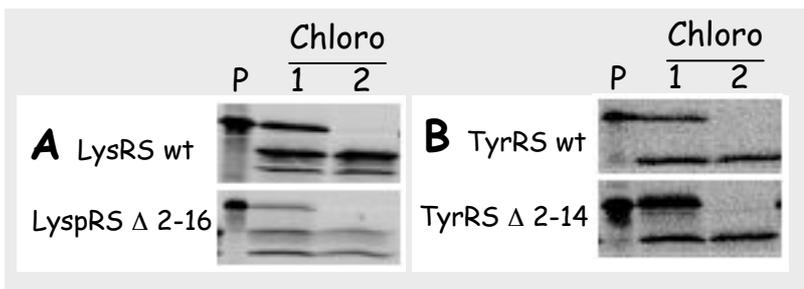
En conclusion, la délétion des 15 premiers résidus de la séquence d'adressage de l'AspRS entraîne une perte totale de l'importation des protéines dans les mitochondries et une diminution de l'importation dans les chloroplastes qui reste à quantifier d'après les résultats obtenus *in vitro*.

#### 4. Adressage mitochondrial et chloroplastique des protéines délétées

Pour les trois dernières constructions (TyrRS $\Delta$ 2-14, LysRS $\Delta$ 2-16 et IleRS $\Delta$ 2-22), on retrouve *in vivo* les protéines chimères dans les mitochondries et les chloroplastes (**Figure 63**). La fluorescence correspondant à la GFP présente dans les chloroplastes étant très variable d'une cellule à l'autre, il nous est cependant impossible d'apprécier les variations d'importation par la technique d'importation *in vivo*.

Une fois de plus, les logiciels prédisent les protéines sauvages plutôt chloroplastiques. Les délétions dans les parties N-terminales tendent, d'après les logiciels à augmenter la localisation mitochondriale et à diminuer la localisation chloroplastique des protéines. On note cependant qu'il n'y a pas entre l'IleRS sauvage et mutante de modifications de prédiction : pour 4 des 5 logiciels ce sont des protéines chloroplastiques et pour 2 des 5 logiciels les deux protéines sont mitochondriales (**Figure 57D**). Ainsi seuls les résultats de prédiction obtenus pour la dernière construction sont en accord avec les résultats obtenus *in vivo*.

*In vitro*, les LysRS et TyrRS sauvages et mutantes sont importées dans les chloroplastes (**Figure 64**). En plus des tests d'importation dans les mitochondries, des quantifications sont à effectuer pour observer d'éventuelles variations d'importation dans les organites en fonction des délétions.



**Figure 64:** Importation *in vitro* des constructions sauvages et mutantes LysRS (A) TyrRS (B). Les chloroplastes isolés sont incubés avec le précurseur radioactif (P) (piste 1) puis traités à la protéinase K (piste 2).

	<i>In vivo</i>		<i>In vitro</i>	<i>In silico</i> prédictions
	Mito	Chloro	Chloro	
ThrRS $\Delta$ 2-23				
ValRS $\Delta$ 2-27				
TyrRS $\Delta$ 2-27				
GluRS $\Delta$ 2-29				
pGR $\Delta$ 2-30				
ProRS $\Delta$ 2-20				
IleRS $\Delta$ 2-35	*			
AspRS $\Delta$ 2-16				
Zn-Mp $\Delta$ 1-28				
TyrRS $\Delta$ 2-14				
LysRS $\Delta$ 2-16				
IleRS $\Delta$ 2-22				

**Table 11:** Bilan des tests d'importation *in vivo* et *in vitro*. Avec:

Mito: mitochondries; Chloro: chloroplastes; \*: importation déjà très faible dans le wt.

- importation dans les mitochondries
- importation dans les mitochondries fortement affectée par les délétions
- importation dans les chloroplastes
- importation dans les chloroplastes fortement affectée par les délétions
- doublement adressé dans les deux organites
- pas d'importation
- les tests d'importation n'ont pas été réalisés

[GluRS $\Delta$ 2-29 d'après (Pujol et al. 2007)]; [pGR $\Delta$ 2-30 (Rudhe et al. 2002)]; [Zn-Mp $\Delta$ 1-28 d'après (Bhushan et al. 2003)]

## 5. Conclusions

**J'ai testé l'importation *in vivo* des différentes constructions, sauvages et mutées. Ces résultats peuvent être comparés à ceux qui ont été obtenus au cours des tests d'importation *in vitro* réalisés par Anna-Karine Berglünd.**

On note que dans les chloroplastes, pour toutes les constructions que nous avons analysées, les résultats obtenus lors des tests d'importation *in vivo* correspondent aux résultats obtenus lors des tests d'importation *in vitro*.

Pour ce qui est de l'importation des différentes constructions dans les mitochondries, nous ne pouvons pas conclure puisque nous sommes dans l'attente des résultats d'importation *in vitro*.

**Pour ce qui est de la comparaison entre résultats d'importation *in vivo* et prédictions *in silico*, les interprétations sont plus complexes :**

- Pour seulement trois des constructions, les résultats obtenus *in vivo* et les prédictions d'adressage coïncident. Ainsi la construction ProRSA $\Delta$ 2-20 est prédite dans les mitochondries et c'est effectivement ce que l'on observe *in vivo* ; la délétion des 14 premiers résidus de la TyrRS n'affecte pas, *in vivo* et *in silico* la localisation mitochondriale et chloroplastique de la protéine ; enfin, l'AspRSA $\Delta$ 2-14 localisée *in vivo* dans les chloroplastes est également prédite comme étant une protéine chloroplastique.

- Pour les autres constructions, les résultats obtenus *in vivo* ne concordent pas avec ce qui était attendu d'après l'analyse *in silico* : on peut citer l'exemple des constructions ThrRSA $\Delta$ 2-23, ValRSA $\Delta$ 2-27 et TyrRSA $\Delta$ 2-27 qui ont perdu *in vivo* toute localisation mitochondriale et chloroplastique, alors que d'après l'analyse *in silico*, ThrRSA $\Delta$ 2-23 et TyrRSA $\Delta$ 2-27 devraient être localisées dans les mitochondries et ValRSA $\Delta$ 2-27 dans les chloroplastes.

Il n'est donc pas possible de se fier totalement aux logiciels de prédiction pour déterminer vers quels compartiments cellulaires les protéines sont dirigées.

**L'analyse des résultats peut s'effectuer en séparant les délétions effectuées en deux types, selon qu'elles correspondent à une grande partie de la protéine (une trentaine d'acides aminés) ou à une partie moins importante de la séquence N-terminale (une vingtaine de résidus).**

**Tout d'abord, les constructions dont les délétions correspondent à une trentaine de résidus :**

Dans tous les cas, les délétions ont des effets dramatiques sur l'importation des protéines. Ainsi, on note que pour les constructions ValRS $\Delta$ 2-27 et TyrRS $\Delta$ 2-27 la délétion de la partie N-terminale entraîne *in vitro* et *in vivo* une abolition totale de l'importation dans les mitochondries et dans les chloroplastes (**Table 11**). De tels résultats avaient déjà été observés *in vitro* lors de la délétion des 28 premiers résidus de la GluRS (Chapitre II, (Pujol et al., 2007)). De même la délétion de la partie N-terminale de la Glutathion réductase de pois (pGRA $\Delta$ 2-30), si elle ne l'abolit pas totalement, affecte fortement l'importation *in vitro* dans les mitochondries et les chloroplastes (Rudhe et al., 2002b). Enfin, la délétion des 28 premiers résidus de la Zn-Mp (Bhushan et al., 2003) et des 35 premiers résidus de l'IleRS abolissent l'importation dans un des compartiments (respectivement les mitochondries et les chloroplastes) alors que l'importation dans l'autre compartiment est fortement affectée.

Ces résultats indiquent l'importance des 30 premiers résidus de la séquence d'adressage ambiguë pour le double adressage mitochondrial et chloroplastique. Pour compléter cette étude, des tests d'importation *in vitro* et *in vivo* supplémentaires sont à envisager avec par exemple l'importation d'une protéine chimère constituée des 27 premiers résidus de la séquence d'adressage de la ValRS fusionnés à la GFP. Si la protéine chimère est importée, on peut supposer que cette portion contient la totalité de l'information nécessaire pour l'adressage des protéines vers les organites alors que l'absence d'importation suggérerait que cette portion n'est qu'une partie du signal, même si c'est une partie essentielle.

**Pour les constructions avec des délétions plus modérées (d'une vingtaine de résidus), les effets sur l'importation sont très variables et tous les cas peuvent être observés :**

- La délétion des 23 premiers résidus de la séquence d'adressage de la ThrRS abolit l'importation des protéines dans les mitochondries et les chloroplastes.
- La délétion des 20 premiers résidus de la séquence d'adressage de la ProRS abolit *in vivo* l'importation des protéines dans les chloroplastes. Les protéines restent cependant adressées dans les mitochondries.
- La délétion des 16 premiers résidus de la séquence d'adressage de l'AspRS a l'effet inverse :

l'adressage vers les mitochondries est perdu *in vivo*, alors que d'après les tests d'importation *in vivo* et *in vitro* la protéine est importée dans les chloroplastes.

- Pour trois constructions TyrRS $\Delta$ 2-14, IleRS $\Delta$ 2-16 et LysRS $\Delta$ 2-22, les délétions n'ont pas d'effet et les protéines restent importées dans les deux compartiments.

Ces résultats indiquent qu'il existe dans les 20 premiers résidus, des signaux qui selon les séquences sont essentiels pour l'adressage des protéines vers les mitochondries et/ou les chloroplastes. Ainsi, les 20 premiers résidus de la ProRS contiennent des signaux essentiels pour l'adressage chloroplastique, alors que les 16 premiers résidus de l'AspRS sont impliqués dans l'adressage mitochondrial. Il existe donc dans les séquences ambiguës une organisation sous forme de domaines. Cependant, cette organisation n'est pas conservée d'une séquence à l'autre.

En conclusion, l'ensemble des résultats obtenus *in vivo* au cours de cette étude indique que la délétion des trente premiers résidus peut suffire à abolir complètement l'importation dans les deux organites (délétion des 27 premiers résidus de la ValRS ou de la TyrRS...). L'essentiel de l'information permettant l'adressage des protéines serait donc majoritairement contenu dans cette portion.

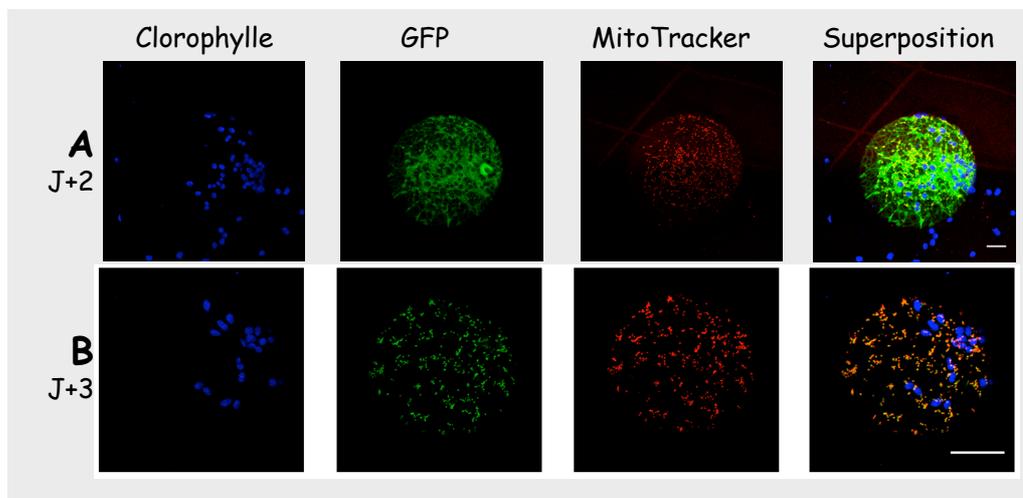
Ces travaux nous ont également permis d'observer une organisation sous forme de domaines au sein des séquences ambiguës, avec des domaines essentiels pour l'adressage des protéines vers les mitochondries (16 premiers résidus de l'AspRS) et des domaines essentiels pour l'adressage des protéines vers les chloroplastes (20 premiers résidus de la ProRS). Cependant cette organisation ne semble pas conservée d'une séquence à l'autre.

Enfin, on note à quel point ce type d'étude est essentiel puisqu'il permet d'apporter de nouvelles données qui seront utilisées pour améliorer les programmes de prédiction, actuellement peu performants pour les séquences d'adressage ambiguës.

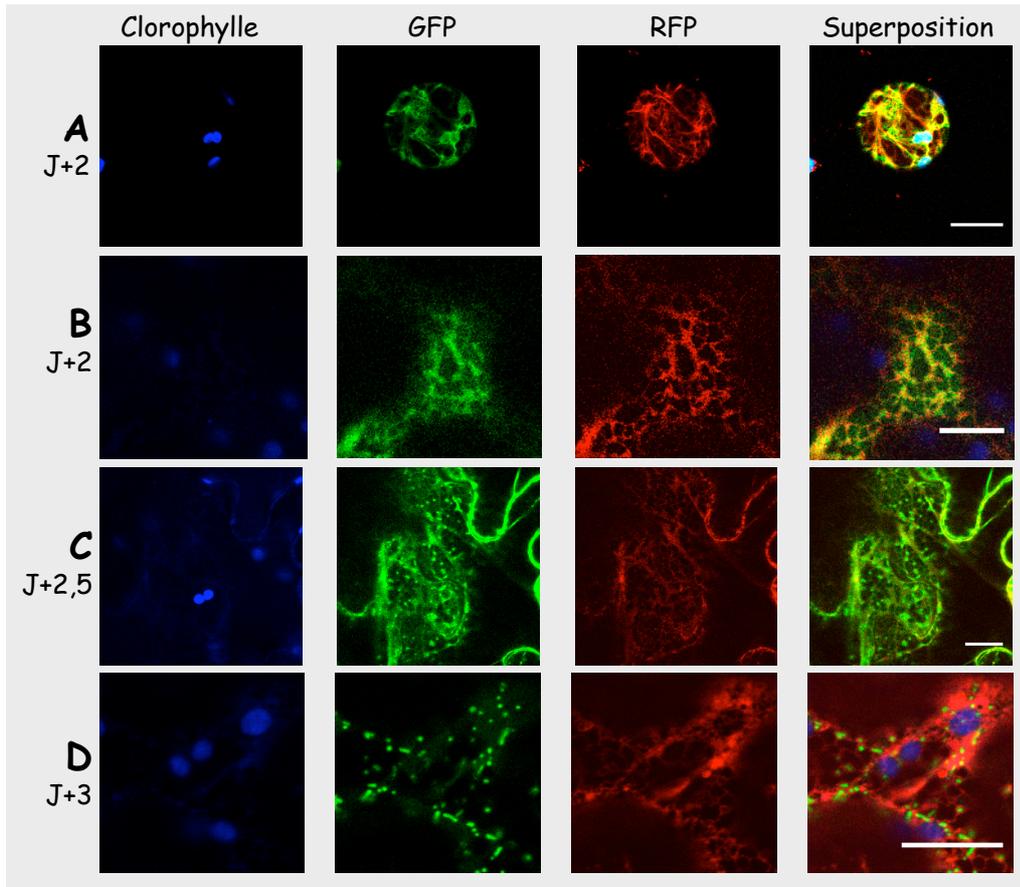


	SignalP	Predotar	TargetP	Cello	LocTree	Wolfpsort
1	0,737	0,31	0,031	0,017	No	No
2	0,389	0,01	0,04	0,032	No	No

**Table 12:** Prédiction d'adressage dans le réticulum endoplasmique de la ProRS sauvage (1) et mutée (2). Les valeurs statistiquement significatives sont indiquées en vert.



**Figure 65:** Importation *in vivo* de la ProRS $\Delta$  2-20, 2 jours (A) et 3 jours (B) après l'agroinfiltration des feuilles de tabac.



**Figure 66:** Importation *in vivo* de la ProRSA 2-20 (GFP) et d'une construction spécifique du réticulum (SP-RFP-HDEL). Les observations ont été réalisées à partir de protoplastes de tabac 2J après l'agroinfiltration (A) ; ou à partir de disques foliaires 2J (B), 2,5J (C) ; ou 3J (D) après l'agroinfiltration.



**Figure 67:** Importation *in vivo* de la ProRSA 2-20, 2 jours après l'agroinfiltration; Avec ERtracker: colorant spécifique du réticulum endoplasmique

## C-CAS PARTICULIERS : Localisation intermédiaire de la construction ProRSΔ2-20, 2 jours après l'agroinfiltration

Comme vu précédemment (cf. Résultats III.B.2), la délétion des 19 premiers résidus de la séquence d'adressage de la ProRS entraîne une localisation mitochondriale de la protéine ProRSΔ2-20-GFP (**Figure 65B**), mais ceci seulement 3 jours après l'agroinfiltration. En effet, 2 jours après l'agroinfiltration la GFP n'est pas localisée dans les mitochondries (**Figure 65A**). Celle-ci colocalise avec un réseau au sein de la cellule. Or, si le passage d'une protéine destinée aux organites au travers du système réticulaire a déjà été mis en évidence chez *Arabidopsis thaliana* pour l' $\alpha$ -anhydrase carbonique chloroplastique (Villarejo et al., 2005), à ce jour on ne trouve dans la littérature aucun exemple de protéine mitochondriale de plante qui transiterait par le système réticulaire.

Deux des 6 logiciels de prédiction utilisés détectent un peptide d'adressage dans le réticulum au sein de la séquence d'adressage de la construction sauvage, néanmoins aucun n'identifie ce type de signal au sein de la séquence délétée (**Table 12**).

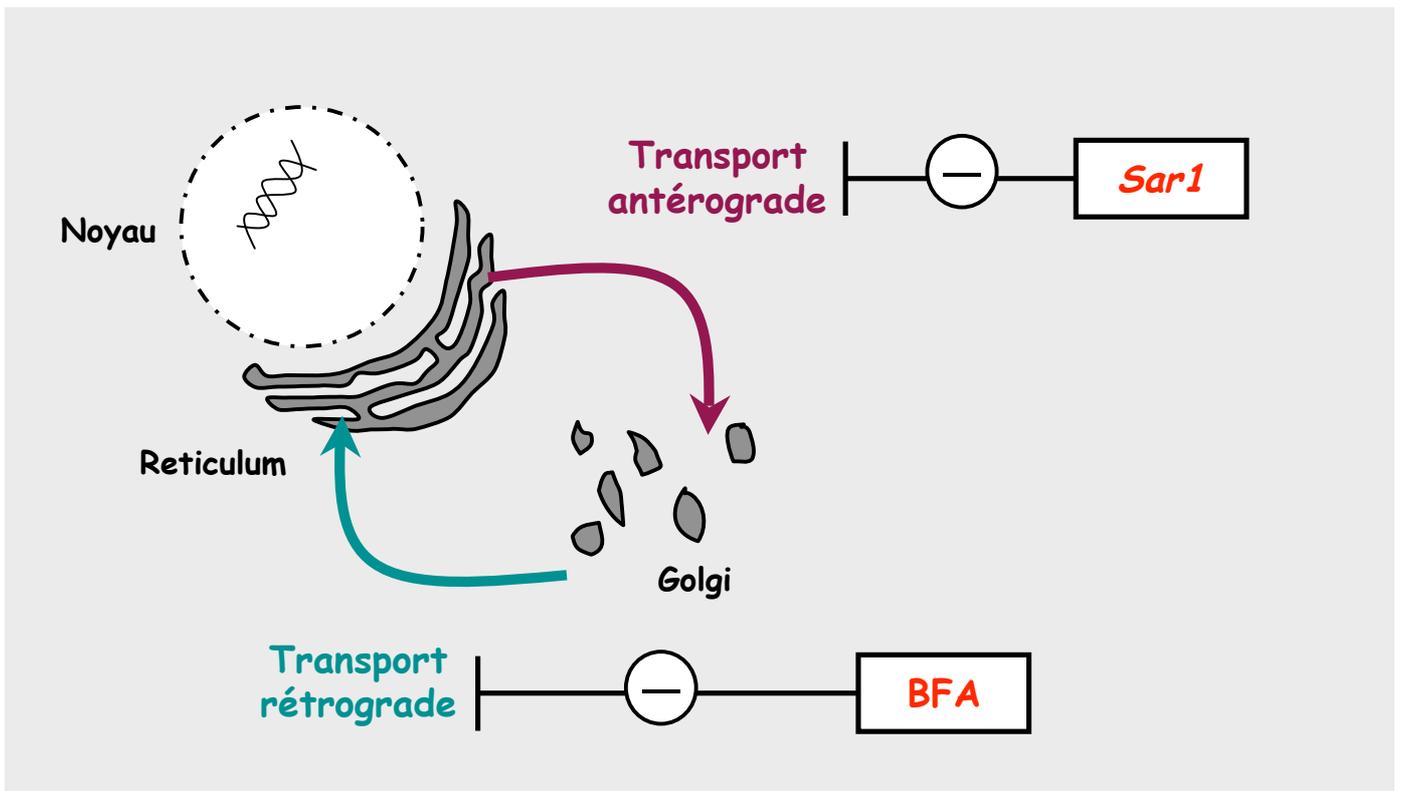
Nous avons donc tenté de déterminer expérimentalement si la localisation intermédiaire de la protéine correspondait au réticulum.

La première étape de cette étude a été la co-infiltration de la ProRSΔ2-20-GFP avec une construction spécifique du réticulum (SP-RFP-HDEL).

On observe lors de l'analyse des protoplastes (**Figure 66A**) une superposition presque totale des signaux correspondant à la GFP et à la RFP. Malheureusement, la longueur d'onde d'émission de la RFP, identique à celle du MitoTracker empêche l'observation des mitochondries. Pour permettre l'observation simultanée des mitochondries et du réticulum nous avons donc utilisé un colorant spécifique du réticulum, le ERTracker.

Les résultats, 2 jours après infiltration sont présentés **Figure 67**. Comme précédemment, les deux profils ne sont pas totalement identiques, mais une partie des signaux correspondant à la GFP et au ERTracker co-localisent.

Parallèlement, nous avons observé des cellules épithéliales de feuilles de *N. benthamiana* co-infiltrées avec la GFP (mutant ProRS) et la RFP (SP-RFP-HDEL). Deux jours après l'agroinfiltration la GFP forme un réseau qui co-localise en grande partie avec la



**Figure 68:** Représentation schématique des effets dans les cellules de tabac des traitements par la BFA ou la construction mutante Sar1.

RFP (**Figure 66B**). Trois jours après l'infiltration, les signaux correspondant à la GFP sont ponctuels, caractéristiques d'une localisation mitochondriale de la GFP (**Figure 66D**). A un stade intermédiaire 2,5 jours après infiltration la GFP se situe dans la cellule à deux niveaux : les points s'ajoutent au réseau (**Figure 66C**). On note cependant que le signal correspondant à la GFP est beaucoup moins net que celui observé avec la RFP.

Les différentes observations suggèrent une association de la ProRSA2-20-GFP avec le réticulum. Pour déterminer si la protéine était vraiment dans le réticulum à J+2, nous avons utilisé deux approches (**Figure 68**) :

- Nous avons traité les feuilles de *N. benthamiana* avec de la BFA (Brefeldine A), une drogue bloquant la voie rétrograde entre golgi et réticulum (Robinson et al., 2008).
- Nous avons co-infiltré les constructions ProRSA2-20-GFP et SP-RFP-HDEL avec le mutant *Sar1* qui bloque les protéines dans le réticulum en empêchant leur exportation (Yang et al., 2005).

Ces deux approches sont sensées bloquer dans le réticulum, les protéines qui transitent par le golgi avant d'atteindre leur destination finale. Or, aucune de ces deux techniques n'a empêché à J+3 la localisation mitochondriale de la GFP. Ces résultats négatifs ne nous permettent pas d'exclure le fait que la protéine délétée soit bien localisée dans le réticulum deux jours après l'agroinfiltration. En effet, les traitements avec la BFA et la construction mutante *Sar1* n'ont été effectués qu'une seule fois, sans les contrôles appropriés. Ainsi, avant de pouvoir conclure quant à la localisation de la protéine délétée 2 jours après l'agroinfiltration des plants de *N. benthamiana*, ces expériences doivent être répétées avec les contrôles appropriés (protéines dont l'exportation est bloquée par les traitements BFA ou *Sar1*). Un autre contrôle à effectuer serait de tester la localisation de la ProRSA2-20-GFP à laquelle on aurait ajouté un signal de rétention dans le réticulum (séquence HDEL).



*Conclusions et  
Perspectives*



Le travail effectué au cours de ma thèse m'a permis d'étudier des protéines impliquées dans la machinerie traductionnelle des mitochondries et des chloroplastes (amidotransferase et aminoacyl-ARNt synthétases) et en particulier les signaux portés dans leur partie-N terminale : les séquences ambiguës, qui permettent au produit d'un gène unique d'être à la fois localisé dans les mitochondries et les chloroplastes.

## **A-ETUDE DE LA VOIE DE BIOSYNTHESE DU GLN-ARNt<sup>Gln</sup>**

### **1.Résumé des travaux effectués sur la voie de biosynthèse du Gln-ARNt<sup>Gln</sup>**

La première partie de mon travail porte sur la voie de biosynthèse du Gln-ARNt<sup>Gln</sup> dans les organites chez l'organisme modèle *Arabidopsis thaliana*.

Nous avons pu démontrer que, contrairement à ce que l'on observe dans les mitochondries de protozoaires et de levures où une activité GlnRS a été identifiée (cf. Introduction Chapitre II.3.A.2), c'est la voie de transamidation indirecte qui est utilisée pour la synthèse du Gln-ARNt<sup>Gln</sup> dans les mitochondries et les chloroplastes végétaux. Cette voie indirecte se déroule en deux étapes : le glutamate est chargé sur l'ARNt<sup>Gln</sup> par une glutamyl-ARNt synthétase (GluRS) non discriminante de spécificité relâchée, glutamylant également l'ARNt<sup>Glu</sup> ; puis une amidotransférase ARNt dépendante (AdT) convertit le Glu-ARNt<sup>Gln</sup> en Gln-ARNt<sup>Gln</sup>.

Cette étude, réalisée en collaboration avec l'équipe de D. Kern (IBMC, Strasbourg) a permis de découvrir la première amidotransférase mitochondriale. Il s'agit également du premier exemple d'enzyme multimérique, doublement adressée dans les mitochondries et les chloroplastes, dont chaque sous-unité possède, comme la GluRS, une séquence d'adressage ambiguë.

### **2.AdT et aaRS : aspects évolutifs**

#### **. Origine de l'AdT et des aaRS :**

Durant l'évolution, la majorité des gènes initialement présents dans les organites ont été perdus ou transférés dans le noyau. Aujourd'hui, les gènes nucléaires codant pour les aaRS sont de différentes origines :

Les gènes codant pour les enzymes cytosoliques présentent, pour la plupart, de grandes similitudes avec les aaRS cytosoliques des autres eucaryotes, suggérant une origine commune de ces protéines.

On observe différentes situations pour les gènes codant pour les enzymes mitochondriales et chloroplastiques :

- Dans la majorité des cas, les gènes codant pour les enzymes mitochondriales et chloroplastiques présentent clairement, comme les gènes codant pour les trois sous-unités de l'AdT, de fortes analogies avec les séquences des protéines que l'on retrouve dans les cyanobactéries (Duchene et al., 2005). Ceci suggère que dans ce cas, le gène plastidial aurait été transféré dans le génome nucléaire, alors que l'exemplaire mitochondrial du gène aurait été perdu.

- Les analyses phylogénétiques indiquent que seuls les gènes codant pour la SerRS et la PheRS sont similaires à leurs équivalents dans les mitochondries de levures et d'animaux.

- Pour cinq gènes, il est difficile de conclure quant à l'origine mitochondriale ou chloroplastique des enzymes.

- Enfin, les séquences de l'ArgRS et de la ProRS sont plus proches de leurs homologues cytosoliques que des aaRS que l'on retrouve dans les organites. Ceci suggère qu'elles dérivent de la duplication d'un gène cytosolique qui aurait acquis une séquence d'adressage.

### **. AdT/aaRS et ARNt: co-évolution**

Dans les chloroplastes, l'importation d'ARNt cytosolique ne semble pas nécessaire au fonctionnement de l'appareil de traduction (cf. Introduction III.1.B) et tous les ARNt sont codés par le génome chloroplastique. Les ARNt chloroplastiques, proches des ARNt bactériens, sont dans la majorité des cas aminoacylés par des aaRS de type bactérien.

Dans les mitochondries de plantes, la situation est plus complexe puisqu'il existe deux types d'ARNt :

- des ARNt codés par le génome nucléaire, importés depuis le cytosol.

- des ARNt codés par le génome mitochondrial, très semblables aux ARNt bactériens.

Les ARNt codés par le génome mitochondrial sont aminoacylés par des aaRS de type bactérien.

Pour les ARNt importés, on trouve les aaRS d'origine cytosolique qui correspondent. Cependant le rôle de ces enzymes n'est pas clairement défini puisque l'aminoylation des ARNt cytosoliques est assurée par les aaRS de type bactérien.

Ainsi, à quelques exceptions près, on observe une bonne corrélation entre l'origine des ARNt et l'origine des enzymes (aaRS et AdT) qui reconnaissent ces ARNt. Ceci sous-entend une co-évolution de ces macromolécules.

## B-ETUDE DES SEQUENCES D'ADRESSAGE AMBIGUËS

On note que chez *A. thaliana*, parmi les 24 aaRS présentes dans les organites, 18 possèdent, comme les trois sous-unités de l'AdT, une séquence d'adressage ambiguë qui permet au produit unique d'un gène d'être doublement localisé dans les mitochondries et les chloroplastes. Les aaRS représentent presque la moitié des protéines identifiées chez *A. thaliana* comme possédant ce type de signal. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à ce type de séquences en tentant de mieux les caractériser.

### 1. Résumé des travaux effectués sur les séquences ambiguës

Au début de ma thèse, très peu de travaux avaient été menés sur les séquences d'adressages appelées séquences ambiguës qui permettent à une protéine, synthétisée à partir d'un gène unique, d'être à la fois destinée aux mitochondries et aux chloroplastes. Nous avons donc tenté de déterminer quels étaient les éléments essentiels dans ces séquences d'adressage pour l'importation des protéines dans les mitochondries ou les chloroplastes.

Cette étude a été réalisée en deux temps :

**Nous avons tout d'abord essayé de déterminer si l'adressage vers l'un ou l'autre des compartiments dépendait de la présence de résidus particuliers, conservés entre les différentes espèces** (cf. Résultats Chapitre II, Article II). Pour ceci nous avons tout d'abord effectué une analyse *in silico* : celle-ci suggère l'importance de l'Alanine en 2<sup>ème</sup> position pour l'adressage des protéines vers les chloroplastes et l'importance des Arginines dans les 20 premiers résidus pour l'adressage des protéines vers les mitochondries. En accord avec ces résultats, des mutations ponctuelles sur les résidus les plus conservés de trois séquences d'adressage d'aaRS (GluRS, MetRS et PheRS) ont été effectuées. L'analyse de l'importation *in vitro* de ces séquences fusionnées à la séquence de la GFP nous a permis de mettre en

évidence l'importance des Arginines pour l'adressage des protéines vers les mitochondries. Pour les constructions mutées au niveau des résidus en 2<sup>ème</sup> position, les effets des mutations sont variables et dépendent de la séquence mutée.

Au cours de cette étude, nous avons également analysé les effets sur l'importation de deux délétions de 28 et 13 acides aminés sur la GluRS. Totalement abolie dans le premier cas (GluRS $\Delta$ 2-29), l'importation est fortement affectée dans les mitochondries et les chloroplastes lorsque les 13 premiers résidus sont délétés (GluRS $\Delta$ 2-14) (cf. Résultats Chapitre II).

Les résultats obtenus pour les constructions mutées au niveau du 2<sup>ème</sup> résidu et pour les constructions délétées dans leur partie N-terminale suggèrent qu'en plus de certains résidus particulièrement conservés d'une séquence à l'autre, d'autres facteurs interviennent dans la spécificité de l'adressage des séquences ambiguës. C'est pourquoi nous avons décidé de poursuivre notre analyse en nous intéressant cette fois à l'**organisation de la séquence sous forme de domaines**, afin de déterminer si celles-ci étaient subdivisées en domaines, spécifiques de l'adressage mitochondrial ou chloroplastique (cf. Résultats Chapitre III).

Pour ceci, en collaboration avec le laboratoire d'E. Glaser (Université de Stockholm), nous avons effectué des délétions dans la partie N-terminale de sept aaRS (ValRS, LysRS, IleRS, ThrRS, ProRS, AspRS et TyrRS). Nous avons ensuite réalisé des tests d'importation dans des mitochondries et des chloroplastes.

J'ai réalisé à Strasbourg les tests d'importation *in vivo*. Pour ceci nous avons utilisé un système d'expression transitoire dans les protoplastes de tabac agroinfiltrés. La localisation des protéines correspondant à la fusion des séquences d'adressage, sauvages ou mutées, en amont de la séquence de la GFP a été visualisée par microscopie confocale.

Pour compléter cette étude, Anna-Karine Berglünd, du laboratoire d'E. Glaser teste actuellement l'importation des protéines dans les organites en utilisant deux autres approches : le système d'importation *in vitro* « classique » dans des mitochondries ou des chloroplastes isolés et le système de « double importation » développé à Stockholm par son équipe (Rudhe et al., 2002).

Les résultats de cette étude sont pour l'instant préliminaires puisqu'un certain nombre de tests d'importation *in vitro* sont à effectuer. On note cependant qu'une organisation en domaines, conservée d'une séquence ambiguë à l'autre, n'a pas pu être mise en évidence. En effet, la délétion de la partie N-terminale des protéines peut avoir des effets très variables :

pas d'effet sur l'importation (LysRSA2-16), abolition totale de l'importation dans les deux compartiments (ThrRSA2-23), abolition de l'importation dans les mitochondries (ProRSA2-20) ou abolition de l'importation dans les chloroplastes (AspRSA2-16). Ainsi, les effets des délétions sur l'importation sont variables d'une construction à l'autre et semblent spécifiques à chaque séquence.

## 2. Pour compléter cette étude...

**Afin de poursuivre cette étude sur les séquences ambiguës, il serait intéressant de disposer d'un plus grand nombre de données :** à ce jour, seule une quarantaine de protéines possédant une séquence d'adressage ambiguë a été identifiée chez *A. thaliana* (cf. Introduction II.2.D).

Ainsi, si nous n'avons pas clairement pu identifier de motifs conservés d'une séquence à l'autre, ce n'est pas forcément parce qu'il n'en existe pas mais peut être parce que nous n'avons pas travaillé avec un nombre de séquences suffisant. Si celui-ci avait été plus important nous aurions pu réaliser une étude de plus grande ampleur comme celle effectuée par l'équipe de Hwang (Lee et al., 2008) : l'analyse de 208 protéines destinées aux chloroplastes leur a permis d'identifier chez *A. thaliana* six sous-groupes de peptides transit possédant des motifs particulièrement conservés d'un groupe à l'autre.

Une première approche nous permettant de mieux comprendre l'organisation des séquences ambiguës serait ainsi d'identifier un plus grand nombre de protéines portant ce type de signal. Pour ceci, des tests d'importation pourraient être réalisés. Nous pourrions commencer par tester l'importation de toutes les protéines impliquées dans les étapes de transcription et de traduction. En effet celles-ci constituent pour l'instant, la majorité des protéines possédant une séquence ambiguë (cf. Introduction III.2.D.3). Une analyse bioinformatique pourrait ensuite être réalisée avec ces nouvelles données. Si la présence de sous-groupes était confirmée, nous pourrions alors entamer une seconde analyse en testant l'effet de délétions sur l'importation d'un des représentants de chaque sous-groupe.

**Avant de poursuivre cette étude sur les séquences ambiguës, il serait également important de disposer d'un plus grand nombre d'outils pour l'étude expérimentale :**

Si les systèmes d'importation *in vitro* et *in vivo* utilisés au cours de cette étude présentent de réels avantages (cf. Résultats Chapitre III), il s'avère qu'ils possèdent un

inconvént majeur : au cours des tests d'importation, nous observons les effets des mutations sur l'ensemble du processus.

Nous avons, lors de la première étude sur les séquences ambiguës, décomposé le mécanisme d'importation des protéines. Pour ceci nous avons quantifié l'intensité des bandes présentes sur le gel en fonction des différents traitements. Avec ce système, nous avons analysé l'importation des protéines, de la fixation des précurseurs à la surface des organites jusqu'à l'action de la peptidase et la libération de la protéine mature. Mais cette approche n'est pas suffisante puisqu'elle ne nous permet pas d'analyser les effets spécifiques des mutations sur chacune des étapes.

L'isolement de la peptidase mitochondriale (MPP, cf. Introduction III.2.C) et la surexpression de la protéine chloroplastique (SPP, cf. Introduction III.2.C) permettent à l'équipe d'E. Glaser (Rudhe et al., 2004) d'étudier l'étape de maturation du précurseur et d'identifier précisément les motifs conservés en amont du site de clivage.

Il nous faut donc développer de nouveaux outils, qui nous permettraient d'examiner étape par étape les effets des mutations.

Au cours de ma thèse nous avons utilisé une approche similaire à celle de l'équipe de E. Glaser pour étudier les effets des mutations ponctuelles sur l'étape de liaison au récepteur. Ne disposant pas d'une grande quantité de matériel, nous avons utilisé la technique de « far-western » pour tenter de mettre en évidence les variations d'interactions entre le précurseur et le récepteur de pommes de terre surexprimé Tom20. Ce récepteur constitue a priori le récepteur principal de l'appareil de translocation des protéines à la surface des mitochondries. Les différents essais que nous avons effectués ne nous ont cependant pas permis de mettre au point un protocole adapté. En effet, en plus de tester l'interaction du récepteur avec nos différentes constructions (correspondants aux séquences d'adressage ambiguës des aaRS, sauvages ou mutées, fusionnées à la séquence de la GFP), nous avons testé l'interaction entre le récepteur et la GFP sans séquence d'adressage. Or il s'est avéré que nous observions une interaction pour ce contrôle négatif. De nouveaux travaux sont donc à envisager pour mettre au point un protocole de purification nous permettant d'obtenir des quantités suffisantes de récepteurs afin par exemple de tester son interaction avec les séquences d'adressage par la technique de coimmunoprécipitation. Il serait également intéressant de tester l'interaction entre les séquences d'adressage ambiguës et les récepteurs chloroplastiques (TOC34 et TOC59) l'étape de liaison étant beaucoup plus spécifique au niveau de l'enveloppe des chloroplastes qu'au niveau de la membrane des mitochondries.

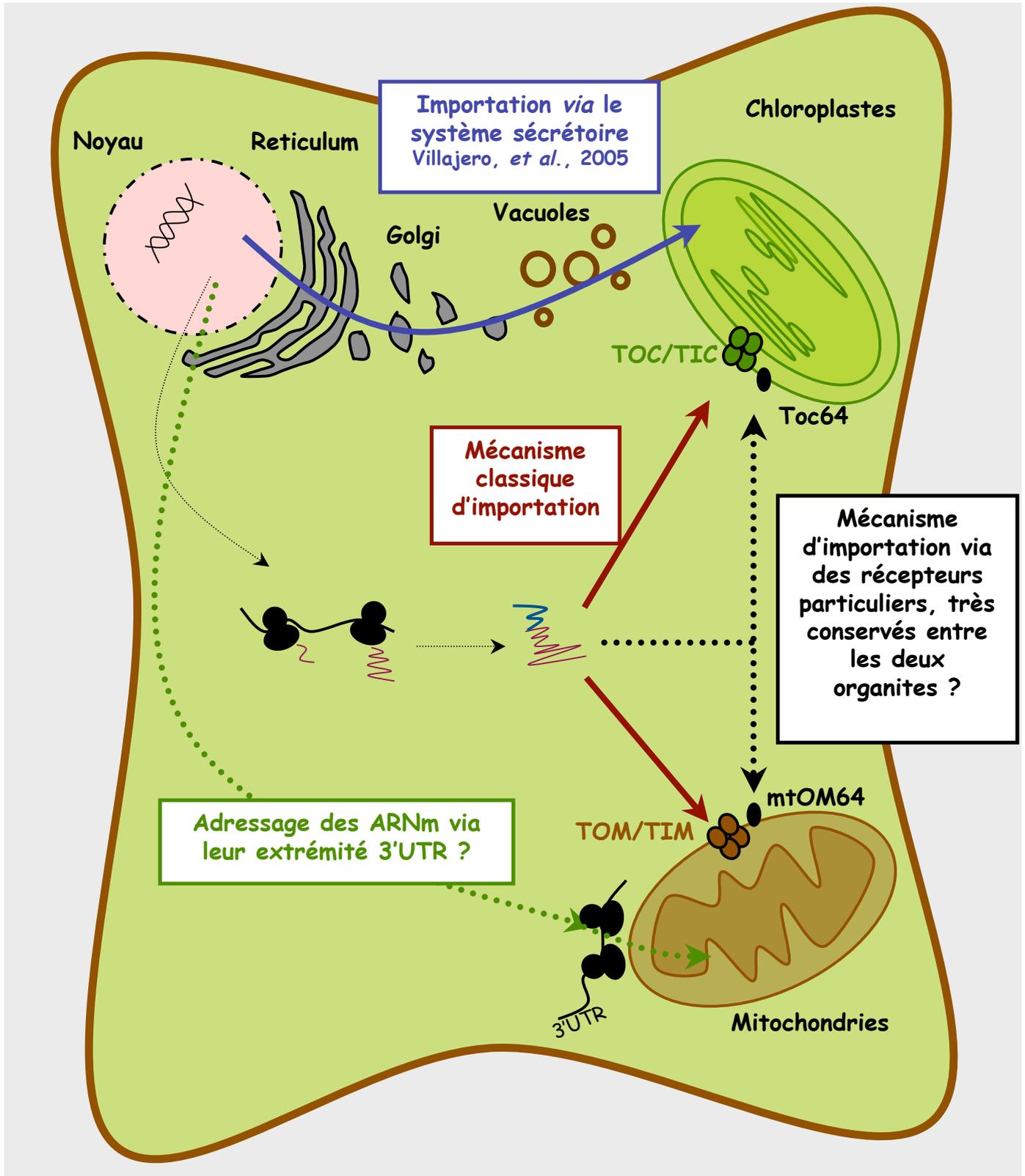
Enfin, les résultats obtenus (cf. Résultats Chapitre III) indiquent que la délétion des trente premiers résidus peut avoir un effet dramatique sur l'importation dans les deux compartiments. En effet, les constructions ValRS $\Delta$ 2-27 et TyrRS $\Delta$ 2-27 ne sont plus importées *in vivo* ni dans les mitochondries ni dans les chloroplastes. Il serait donc intéressant d'effectuer une **étude plus fine** en délétant ou en substituant cette fois-ci des portions de seulement quelques résidus au sein de la séquence d'adressage ambiguë.

### 3.Séquences d'adressages ambiguës : seuls éléments à assurer la spécificité de l'adressage mitochondrial et chloroplastique ?

Nous avons étudié l'importation des protéines possédant une séquence ambiguë en partant du principe qu'elles utilisaient la voie classique d'importation des protéines. Codées par le génome nucléaire, les protéines seraient synthétisées dans le cytosol puis importées via des systèmes de reconnaissance et de translocation spécifiques des mitochondries (TOM/TIM) ou des chloroplastes (TOC/TIC). Mais il est surprenant que ces deux systèmes, tout à fait différents, arrivent à maintenir une telle spécificité de l'adressage. Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées pour comprendre comment la cellule arrive à maintenir cette spécificité (**Figure 69**) :

La spécificité pourrait être liée à la présence dans le cytosol d'une **protéine chaperonne spécifique des séquences ambiguës**, qui reconnaîtrait et conduirait les protéines porteuses de ce signal vers les deux systèmes de translocation classique.

On pourrait ainsi tenter d'identifier les protéines cytosoliques impliquées dans l'étape d'adressage des protéines vers les membranes mitochondriales ou chloroplastiques. Ce type d'étude a récemment été réalisé par Bae et collaborateurs (Bae et al., 2008). La protéine AKR2A (« Arabidopsis ankyrin repeat protein ») a été identifiée. Elle reconnaît spécifiquement par sa partie N-terminale une classe de protéines localisées dans l'enveloppe externe des chloroplastes alors que la partie C-terminale d'AKR2A est reconnue par les chloroplastes. Ainsi, pourquoi ne pas envisager une protéine chaperonne spécifique des séquences ambiguës qui guiderait les précurseurs jusqu'aux organites, mitochondries et chloroplastes.



**Figure 69:** Représentation schématique des différentes voies utilisées par les protéines mitochondriales et chloroplastiques avant d'atteindre leur compartiment définitif.

Avec  $\longrightarrow$  voies confirmées expérimentalement  
 $\cdots\cdots\cdots\longrightarrow$  voies à confirmer

**Les signaux qui régissent l'adressage vers les organites pourraient, comme chez les levures (Marc et al., 2002) se situer au niveau de l'ARNm.** Des récepteurs capables de fixer les ribosomes ont déjà été identifiés à la surface des mitochondries végétales (Whelan and Schleiff, 2004). On peut envisager que la spécificité d'importation de certaines protéines serait assurée par un mécanisme d'importation co-traductionnelle. Ainsi, pourquoi ne pas examiner les ARNm des polysomes isolés avec des fractions mitochondriales, chloroplastiques ou cytosoliques : une analyse par RT-PCR permettrait peut-être de mettre en évidence l'existence d'une répartition asymétrique des ARNm d'origine nucléaire entre les polysomes libres et les polysomes associés aux organites. Si une telle asymétrie était mise en évidence, les déterminants de la spécificité d'adressage devraient être recherchés dans la séquence des ARNm.

**Ensuite, il est surprenant d'observer que des composants homologues aux sous-unités du système d'importation chloroplastique soient présents à la surface des mitochondries** (mtOM64 (Chew et al., 2004)). L'implication de ces protéines dans le mécanisme d'importation des protéines mitochondriales n'a pas encore été mise en évidence, mais une des hypothèses émises lors de la découverte de ces protéines est qu'associées au système de translocation classique, elles pourraient intervenir comme récepteurs pour les protéines possédant une séquence ambiguë (Chew et al., 2004).

Enfin, une dernière hypothèse que les expériences d'importation *in vivo* sur la prolyl-ARNt synthétase délétée de ces vingt premiers résidus nous laissent envisager (cf. Résultats III.C), est **qu'une partie des protéines n'utilisent pas la voie classique d'importation mais utilisent la voie sécrétoire.** En 2005, des travaux ont mis en évidence que l'anhydrase carbonique chloroplastique utilisait cette voie (Villarejo et al., 2005) : la protéine est synthétisée avec dans sa partie N-terminale une séquence qui la dirige vers le réticulum avant de rejoindre les chloroplastes par un mécanisme pour l'instant inconnu. Mais ce phénomène ne semble pas très répandu puisqu'une analyse bioinformatique sur 916 protéines chloroplastiques codées par le génome nucléaire n'a pas permis d'identifier, de façon statistiquement significative, des signaux d'adressage vers le réticulum parmi ces protéines (Zybailov et al., 2008).

## C- LA DOUBLE LOCALISATION DES PROTEINES

Ce travail de thèse m'a permis d'étudier la double localisation mitochondriale et chloroplastique des protéines possédant dans leur portion N-terminale une séquence d'adressage ambiguë. Mais les séquences d'adressage ambiguës ne sont qu'un des mécanismes qui permet à une protéine d'être localisée dans deux compartiments.

### 1. Double localisation des protéines : plusieurs mécanismes et plusieurs compartiments

Les séquences ambiguës permettent au produit unique d'un gène de se retrouver à la fois dans les mitochondries et les chloroplastes. Mais il existe **d'autres mécanismes** qui permettent à une protéine d'être **localisée dans deux compartiments**. On peut citer quelques exemples :

Le premier exemple concerne les protéines qui possèdent deux signaux d'adressage, comme par exemple l'alanine :glyoxylate amino-transférase (Birdsey et al., 2004) dont la partie N-terminale permet un adressage vers les mitochondries et la partie C-terminale un adressage vers le réticulum.

Dans certains cas c'est un mécanisme d'initiation alternative de la transcription qui permet à une protéine de se retrouver dans deux compartiments. C'est ce que l'on observe pour les aaRS cytosoliques : l'isoforme correspondant au plus long transcrite est localisé dans les mitochondries alors que l'isoforme codé par le transcrite le plus court se trouve localisé dans le cytosol (Duchene et al., 2005).

Une initiation alternative de la traduction est également responsable de la double localisation mitochondriale et cytosolique de la glutaredoxin 2 dans la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Porras et al., 2006).

Enfin le dernier mécanisme permettant la double localisation d'une protéine est l'épissage alternatif d'un transcrite. Par ce procédé le transcrite AKAP1 produit une protéine qui sera localisée dans les chloroplastes ou le réticulum (Ma and Taylor, 2008).

### 2. Double localisation des protéines : un phénomène sous-estimé

La double localisation des protéines est un phénomène essentiel dont l'ampleur est sous-estimée : une étude réalisée chez les levures indique qu'environ un quart des protéines destinées aux mitochondries serait doublement localisées et se retrouverait également dans le cytosol, le noyau, le réticulum ou les peroxysomes (Dinur-Mills et al., 2008). On peut ainsi imaginer que de nombreuses protéines que l'on connaît comme étant localisées dans un compartiment donné seraient en réalité présentes dans deux compartiments au sein de la cellule. On peut citer l'exemple des travaux effectués sur la localisation de la NADPH deshydrogénase de type II (Carrie et al., 2008). Chez *A. thaliana*, sept gènes codant pour cette enzyme ont été identifiés. La localisation mitochondriale des protéines correspondantes avait déjà été déterminée, mais des analyses *in silico* prédisaient une localisation dans le peroxysome de trois protéines. Les auteurs ont donc effectué des tests d'importation *in vivo* et des expériences d'immunolocalisation. Il s'est avéré que quatre protéines étaient doublement adressées : trois protéines sont destinées aux mitochondries et aux peroxysomes et une protéine aux mitochondries et aux chloroplastes. Cet exemple illustre le fait que la double localisation des protéines est un phénomène sous-estimé et des études supplémentaires doivent être effectuées pour déterminer la localisation réelle des protéines dans les différents compartiments cellulaires.

Cette sous-estimation du nombre de protéines doublement localisées serait en grande partie due au phénomène que l'équipe de O. Pines a qualifié de **distribution éclipsée** (Regev-Rudzki et al., 2008) : la répartition des protéines au sein des deux compartiments n'étant pas forcément homogène, la présence en grande quantité d'une protéine dans un compartiment donné empêche la détection dans le compartiment voisin d'une petite quantité de protéines. On peut citer l'exemple rencontré au cours de l'étude sur les séquences ambiguës des aaRS : la très forte localisation chloroplastique de l'IleRS empêchait *in vivo* sa détection dans les mitochondries (Duchene et al., 2005).

Ainsi les difficultés expérimentales rencontrées illustrent à quel point il est indispensable de pouvoir **disposer d'outils informatiques fiables**. Il devient donc essentiel de disposer de programmes de prédictions performants, pour déterminer vers quel compartiment cellulaire ces polypeptides seront dirigés. La détermination des résidus ou de motifs particuliers, caractéristiques des séquences d'adressage sont autant d'informations indispensables qui peuvent compléter les données déjà disponibles pour les logiciels de prédictions.

### 3. Double localisation des protéines : un phénomène essentiel

On ne peut ignorer à quel point l'adressage des protéines est un phénomène essentiel, les conséquences d'un mauvais adressage étant dramatiques. Ainsi de nombreux exemples de pathologies sont associés à des défauts de localisation. On peut en citer quelques-uns :

La perte de localisation nucléaire de la protéine RUNX3 a été rapportée dans des cas de cancer de l'estomac (Ito et al., 2005). Le mauvais adressage mitochondrial de la protéine TAZ1 est associé chez l'homme au syndrome de Barth (Claypool et al., 2006). On peut également citer l'exemple du mauvais adressage de la protéine FOXL2 qui se traduit par de graves malformations oculaires ou syndrome de BPES (Beysen et al., 2008).

Les modifications d'adressage peuvent également avoir des conséquences autres que des pathologies : on peut citer l'exemple d'une étude réalisée sur une espèce sauvage et une espèce cultivée de fraise (Aharoni et al., 2004). L'insertion d'un codon stop dans la séquence d'adressage de l'enzyme FaNES (« *Fragaria ananassa* Nerodil Synthase ») abolit la localisation mitochondriale et chloroplastique de la protéine qui se retrouve localisée dans le cytosol. La perte de l'adressage a entraîné une modification des composés aromatiques produits et donc des propriétés gustatives différentes d'une espèce à l'autre.

Ainsi la compréhension et l'exploitation du mécanisme d'importation des protéines ouvre la voie à de nombreuses applications biomédicales et biotechnologiques.





# *Bibliographie*



- 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.
- Adhya, S. (2007). Leishmania mitochondrial tRNA importers. *Int J Biochem Cell Biol*.
- Akochy, P. M., Bernard, D., Roy, P. H., and Lapointe, J. (2004). Direct glutamyl-tRNA biosynthesis and indirect asparaginyl-tRNA biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* 186, 767-776.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Watson, J. D. (1994). *Molecular Biology of the Cell*, Garland Publishing).
- Allen, J. F. (2003). Why chloroplasts and mitochondria contain genomes. *Comp Funct Genomics* 4, 31-36.
- Anderson, S., Bankier, A. T., Barrell, B. G., de Bruijn, M. H., Coulson, A. R., Drouin, J., Eperon, I. C., Nierlich, D. P., Roe, B. A., Sanger, F., *et al.* (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290, 457-465.
- Asakura, Y., Kikuchi, S., and Nakai, M. (2008). Non-identical contributions of two membrane-bound cpSRP components, cpFtsY and Alb3, to thylakoid biogenesis. *Plant J*.
- Azevedo, J., Courtois, F., Hakimi, M. A., Demarsy, E., Lagrange, T., Alcaraz, J. P., Jaiswal, P., Marechal-Drouard, L., and Lerbs-Mache, S. (2008). Intraplastidial trafficking of a phage-type RNA polymerase is mediated by a thylakoid RING-H2 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 9123-9128.
- B**ae, W., Lee, Y. J., Kim, D. H., Lee, J., Kim, S., Sohn, E. J., and Hwang, I. (2008). AKR2A-mediated import of chloroplast outer membrane proteins is essential for chloroplast biogenesis. *Nat Cell Biol* 10, 220-227.
- Baick, J. W., Yoon, J. H., Namgoong, S., Soll, D., Kim, S. I., Eom, S. H., and Hong, K. W. (2004). Growth inhibition of *Escherichia coli* during heterologous expression of *Bacillus subtilis* glutamyl-tRNA synthetase that catalyzes the formation of mischarged glutamyl-tRNA<sup>Gln</sup>. *J Microbiol* 42, 111-116.
- Bailly, M., Blaise, M., Lorber, B., Becker, H. D., and Kern, D. (2007). The transamidosome: a dynamic ribonucleoprotein particle dedicated to prokaryotic tRNA-dependent asparagine biosynthesis. *Mol Cell* 28, 228-239.
- Baker, M. J., Frazier, A. E., Gulbis, J. M., and Ryan, M. T. (2007). Mitochondrial protein-import machinery: correlating structure with function. *Trends Cell Biol* 17, 456-464.

- Barat, C., Datta, P. P., Raj, V. S., Sharma, M. R., Kaji, H., Kaji, A., and Agrawal, R. K. (2007). Progression of the ribosome recycling factor through the ribosome dissociates the two ribosomal subunits. *Mol Cell* 27, 250-261.
- Becker, H. D., Roy, H., Moulinier, L., Mazauric, M. H., Keith, G., and Kern, D. (2000). *Thermus thermophilus* contains an eubacterial and an archaeobacterial aspartyl-tRNA synthetase. *Biochemistry* 39, 3216-3230.
- Becker, T., Vogtle, F. N., Stojanovski, D., and Meisinger, C. (2008). Sorting and assembly of mitochondrial outer membrane proteins. *Biochim Biophys Acta* 1777, 557-563.
- Beysen, D., Moumne, L., Veitia, R., Peters, H., Leroy, B. P., De Paepe, A., and De Baere, E. (2008). Missense mutations in the forkhead domain of FOXL2 lead to subcellular mislocalization, protein aggregation and impaired transactivation. *Hum Mol Genet* 17, 2030-2038.
- Bhushan, S., Lefebvre, B., Stahl, A., Wright, S. J., Bruce, B. D., Boutry, M., and Glaser, E. (2003). Dual targeting and function of a protease in mitochondria and chloroplasts. *EMBO Rep* 4, 1073-1078.
- Birdsey, G. M., Lewin, J., Cunningham, A. A., Bruford, M. W., and Danpure, C. J. (2004). Differential enzyme targeting as an evolutionary adaptation to herbivory in carnivora. *Mol Biol Evol* 21, 632-646.
- Birnboim, H. C., and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-1523.
- Bock, R., and Timmis, J. N. (2008). Reconstructing evolution: gene transfer from plastids to the nucleus. *Bioessays* 30, 556-566.
- Bolender, N., Sickmann, A., Wagner, R., Meisinger, C., and Pfanner, N. (2008). Multiple pathways for sorting mitochondrial precursor proteins. *EMBO Rep* 9, 42-49.
- Bonnefond, L., Fender, A., Rudinger-Thirion, J., Giege, R., Florentz, C., and Sissler, M. (2005). Toward the full set of human mitochondrial aminoacyl-tRNA synthetases: characterization of AspRS and TyrRS. *Biochemistry* 44, 4805-4816.
- Boore, J. L. (1999). Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Res* 27, 1767-1780.
- Bouzaidi-Tiali, N., Aeby, E., Charriere, F., Pusnik, M., and Schneider, A. (2007). Elongation factor 1a mediates the specificity of mitochondrial tRNA import in *T. brucei*. *Embo J* 26, 4302-4312.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.

- Braun, N. A., and Theg, S. M. (2008). The chloroplast Tat pathway transports substrates in the dark. *J Biol Chem* 283, 8822-8828.
- Brindefalk, B., Viklund, J., Larsson, D., Thollesson, M., and Andersson, S. G. (2007). Origin and evolution of the mitochondrial aminoacyl-tRNA synthetases. *Mol Biol Evol* 24, 743-756.
- Bruce, B. D., Perry, S., Froelich, J., and Keegstra, K. (1994). *Plant Molecular Biology Manual*, 2nd edn, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands).
- Calvin, K., and Li, H. (2008). RNA-splicing endonuclease structure and function. *Cell Mol Life Sci* 65, 1176-1185.
- Carrie, C., Murcha, M. W., Kuehn, K., Duncan, O., Barthet, M., Smith, P. M., Eubel, H., Meyer, E., Day, D. A., Millar, A. H., and Whelan, J. (2008). Type II NAD(P)H dehydrogenases are targeted to mitochondria and chloroplasts or peroxisomes in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* 582, 3073-3079.
- Chatton, B., Walter, P., Ebel, J. P., Lacroute, F., and Fasiolo, F. (1988). The yeast *VAS1* gene both mitochondrial and cytoplasmic Valyl-tRNA synthetases. *J of Biol Chem* 263, 52-57.
- Chen, M. W., Jahn, D., Schon, A., O'Neill, G. P., and Soll, D. (1990). Purification and characterization of *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast glutamyl-tRNA synthetase, a natural misacylating enzyme. *J Biol Chem* 265, 4054-4057.
- Chew, O., Lister, R., Qbadou, S., Heazlewood, J. L., Soll, J., Schleiff, E., Millar, A. H., and Whelan, J. (2004). A plant outer mitochondrial membrane protein with high amino acid sequence identity to a chloroplast protein import receptor. *FEBS Lett* 557, 109-114.
- Chew, O., Rudhe, C., Glaser, E., and Whelan, J. (2003). Characterization of the targeting signal of dual-targeted pea glutathione reductase. *Plant Mol Biol* 53, 341-356.
- Claros, M. G., Perea, J., Shu, Y., Samatey, F. A., Popot, J. L., and Jacq, C. (1995). Limitations to in vivo import of hydrophobic proteins into yeast mitochondria. The case of a cytoplasmically synthesized apocytochrome b. *Eur J Biochem* 228, 762-771.
- Claros, M. G., and Vincens, P. (1996). Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *Eur J Biochem* 241, 779-786.
- Claypool, S. M., McCaffery, J. M., and Koehler, C. M. (2006). Mitochondrial mislocalization and altered assembly of a cluster of Barth syndrome mutant tafazzins. *J Cell Biol* 174, 379-390.
- Conway, D. J., Fanello, C., Lloyd, J. M., Al-Joubori, B. M. A., Baloch, A. H., Somanath, S. D., Roper, C., Oduola, A. M. J., Mulder, B., Pova, M. M., Singh, B. and Thomas, A. W (2000). Origin

of *Plasmodium falciparum* malaria is traced by mitochondrial DNA. *Mol Biochem Parasitol* *111*, 163-171.

Creissen, G., Reynolds, H., Xue, Y., and Mullineaux, P. (1995). Simultaneous targeting of pea glutathione reductase and of a bacterial fusion protein to chloroplasts and mitochondria in transgenic tobacco. *Plant J* *8*, 167-175.

Curnow, A. W., Hong, K., Yuan, R., Kim, S., Martins, O., Winkler, W., Henkin, T. M., and Soll, D. (1997). Glu-tRNA<sup>Gln</sup> amidotransferase: a novel heterotrimeric enzyme required for correct decoding of glutamine codons during translation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 11819-11826.

Daley, D. O., Adams, K. L., Clifton, R., Qualmann, S., Millar, A. H., Palmer, J. D., Pratje, E., and Whelan, J. (2002). Gene transfer from mitochondrion to nucleus: novel mechanisms for gene activation from Cox2. *Plant J* *30*, 11-21.

de Grey, A. D. (2005). Forces maintaining organellar genomes: is any as strong as genetic code disparity or hydrophobicity? *Bioessays* *27*, 436-446.

Delage, L., Duchêne, A. M., Zaepfel, M., and Maréchal-Drouard, L. (2003). The anticodon and the D-domain sequences are essential determinants for plant cytosolic tRNA(Val) import into mitochondria. *Plant J* *34*, 623-633.

Demarsy, E., Courtois, F., Azevedo, J., Buhot, L., and Lerbs-Mache, S. (2006). Building up of the plastid transcriptional machinery during germination and early plant development. *Plant Physiol* *142*, 993-1003.

Deniziak, M., Sauter, C., Becker, H. D., Paulus, C. A., Giege, R., and Kern, D. (2007). *Deinococcus* glutaminyl-tRNA synthetase is a chimera between proteins from an ancient and the modern pathways of aminoacyl-tRNA formation. *Nucleic Acids Res* *35*, 1421-1431.

Dinur-Mills, M., Tal, M., and Pines, O. (2008). Dual targeted mitochondrial proteins are characterized by lower MTS parameters and total net charge. *PLoS ONE* *3*, e2161.

Dolezal, P., Likic, V., Tachezy, J., and Lithgow, T. (2006). Evolution of the molecular machines for protein import into mitochondria. *Science* *313*, 314-318.

Duchene, A. M., Giritch, A., Hoffmann, B., Cognat, V., Lancelin, D., Peeters, N. M., Zaepfel, M., Marechal-Drouard, L., and Small, I. D. (2005). Dual targeting is the rule for organellar aminoacyl-tRNA synthetases in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 16484-16489.

- Duchêne, A. M., and Maréchal-Drouard, L. (2001). The chloroplast-derived *trnW* and *trnM-e* genes are not expressed in *Arabidopsis* mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* 285, 1213-1216.
- Duy, D., Soll, J., and Philippar, K. (2007). Solute channels of the outer membrane: from bacteria to chloroplasts. *Biol Chem* 388, 879-889.
- Dyall, S. D., Brown, M. T., and Johnson, P. J. (2004). Ancient invasions: from endosymbionts to organelles. *Science* 304, 253-257.
- E**manuelsson, O., Brunak, S., von Heijne, G., and Nielsen, H. (2007). Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. *Nat Protoc* 2, 953-971.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S., and Von Heijne, G. (2000). Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal aminoacid sequence. *J Mol Biol* 300, 1005-1016.
- Entelis, N., Brandina, I., Kamenski, P., Krasheninnikov, I. A., Martin, R. P., and Tarassov, I. (2006). A glycolytic enzyme, enolase, is recruited as a cofactor of tRNA targeting toward mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* 20, 1609-1620.
- Entelis, N. S., Kolesnikova, O. A., Dogan, S., Martin, R. P., and Tarassov, I. A. (2001a). 5 S rRNA and tRNA import into human mitochondria. Comparison of in vitro requirements. *J Biol Chem* 276, 45642-45653.
- Entelis, N. S., Kolesnikova, O. A., Martin, R. P., and Tarassov, I. A. (2001b). RNA delivery into mitochondria. *Adv Drug Deliv Rev* 49, 199-215.
- F**ey, J., Weil, J. H., Tomita, K., Cosset, A., Dietrich, A., Small, I., and Marechal-Drouard, L. (2002). Role of editing in plant mitochondrial transfer RNAs. *Gene* 286, 21-24.
- Fradin, A., Gruhl, H., and Feldmann, H. (1975). Mapping of yeast tRNAs by two-dimensional electrophoresis on polyacrylamide gels. *FEBS Lett* 50, 185-189.
- G**akh, O., Cavadini, P., and Isaya, G. (2002). Mitochondrial processing peptidases. *Biochim Biophys Acta* 1592, 63-77.
- Giege, R., Sissler, M., and Florentz, C. (1998). Universal rules and idiosyncratic features in tRNA identity. *Nucleic Acids Res* 26, 5017-5035.
- Glaser, E., Nilsson, S., and Bhushan, S. (2006). Two novel mitochondrial and chloroplastic targeting-peptide-degrading peptidasomes in *A. thaliana*, AtPreP1 and AtPreP2. *Biol Chem* 387, 1441-1447.

Gray, M. W., Burger, G., and Lang, B. F. (1999). Mitochondrial evolution. *Science* 283, 1476-1481.

Gutensohn, M., Fan, E., Frielingsdorf, S., Hanner, P., Hou, B., Hust, B., and Klosgen, R. B. (2006). Toc, Tic, Tat et al.: structure and function of protein transport machineries in chloroplasts. *J Plant Physiol* 163, 333-347.

**H**ausmann, C. D., and Ibba, M. (2008). Structural and functional mapping of the archaeal multi-aminoacyl-tRNA synthetase complex. *FEBS Lett* 582, 2178-2182.

Hirao, T., Watanabe, A., Kurita, M., Kondo, T., and Takata, K. (2008). Complete nucleotide sequence of the *Cryptomeria japonica* D. Don. chloroplast genome and comparative chloroplast genomics: diversified genomic structure of coniferous species. *BMC Plant Biol* 8, 70.

Hoagland, M. B., Stephenson, M. L., Scott, J. F., Hecht, L. I., and Zamecnik, P. C. (1958). A soluble ribonucleic acid intermediate in protein synthesis. *J Biol Chem* 231, 241-257.

Hopper, A. K., and Phizicky, E. M. (2003). tRNA transfers to the limelight. *Genes Dev* 17, 162-180.

Hopper, A. K., and Shaheen, H. H. (2008). A decade of surprises for tRNA nuclear-cytoplasmic dynamics. *Trends Cell Biol* 18, 98-104.

Huang, H. Y., Tang, H. L., Chao, H. Y., Yeh, L. S., and Wang, C. C. (2006). An unusual pattern of protein expression and localization of yeast alanyl-tRNA synthetase isoforms. *Mol Microbiol* 60, 189-198.

Hughes, T. R., Marton, M. J., Jones, A. R., Roberts, C. J., Stoughton, R., Armour, C. D., Bennett, H. A., Coffey, E., Dai, H., He, Y. D., *et al.* (2000). Functional discovery via a compendium of expression profiles. *Cell* 102, 109-126.

**I**bba, M., Celic, I., Curnow, A., Kim, H., Pelaschier, J., Tumbula, D., Vothknecht, U.,

Woese, C., and Soll, D. (1997). Aminoacyl-tRNA synthesis in Archaea. *Nucleic Acids Symp Ser*, 305-306.

Inaba, T., and Schnell, D. J. (2008). Protein trafficking to plastids: one theme, many variations. *Biochem J* 413, 15-28.

Ito, K., Liu, Q., Salto-Tellez, M., Yano, T., Tada, K., Ida, H., Huang, C., Shah, N., Inoue, M., Rajnakova, A., *et al.* (2005). RUNX3, a novel tumor suppressor, is frequently inactivated in gastric cancer by protein mislocalization. *Cancer Res* 65, 7743-7750.

- J**arvis, P. (2008). Targeting of nucleus-encoded proteins to chloroplasts in plants. *New Phytol.*
- K**apoor, M., Zhou, Q., Otero, F., Myers, C. A., Bates, A., Belani, R., Liu, J., Luo, J. K., Tzima, E., Zhang, D. E., *et al.* (2008). Evidence for annexin II-S100A10 complex and plasmin in mobilization of cytokine activity of human TrpRS. *J Biol Chem* 283, 2070-2077.
- Karanasios, E., Boleti, H., and Simos, G. (2008). Incorporation of the Arc1p tRNA-binding domain to the catalytic core of MetRS can functionally replace the yeast Arc1p-MetRS complex. *J Mol Biol* 381, 763-771.
- Karp, G. (2007). *Cell and Molecular Biology*.
- Koulintchenko, M., Temperley, R. J., Mason, P. A., Dietrich, A., and Lightowers, R. N. (2006). Natural competence of mammalian mitochondria allows the molecular investigation of mitochondrial gene expression. *Hum Mol Genet* 15, 143-154.
- Kouranov, A., Wang, H., and Schnell, D. J. (1999). Tic22 is targeted to the intermembrane space of chloroplasts by a novel pathway. *J Biol Chem* 274, 25181-25186.
- Kruszka, K., Barneche, F., Guyot, R., Ailhas, J., Meneau, I., Schiffer, S., Marchfelder, A., and Echeverria, M. (2003). Plant dicistronic tRNA-snoRNA genes: a new mode of expression of the small nucleolar RNAs processed by RNase Z. *Embo J* 22, 621-632.
- L**aemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lapointe, J., Duplain, L., and Proulx, M. (1986). A single glutamyl-tRNA synthetase aminoacylates tRNAGlu and tRNAGln in *Bacillus subtilis* and efficiently misacylates *Escherichia coli* tRNAGln1 in vitro. *J Bacteriol* 165, 88-93.
- Lee, D. W., Kim, J. K., Lee, S., Choi, S., Kim, S., and Hwang, I. (2008). Arabidopsis nuclear-encoded plastid transit peptides contain multiple sequence subgroups with distinctive chloroplast-targeting sequence motifs. *Plant Cell* 20, 1603-1622.
- Lee, J., and Hendrickson, T. L. (2004). Divergent anticodon recognition in contrasting glutamyl-tRNA synthetases. *J Mol Biol* 344, 1167-1174.
- Lee, S. W., Cho, B. H., Park, S. G., and Kim, S. (2004). Aminoacyl-tRNA synthetase complexes: beyond translation. *J Cell Sci* 117, 3725-3734.
- Leister, D. (2005). Genomics-based dissection of the cross-talk of chloroplasts with the nucleus and mitochondria in Arabidopsis. *Gene* 354, 110-116.

- Levitan, A., Trebitsh, T., Kiss, V., Pereg, Y., Dangoor, I., and Danon, A. (2005). Dual targeting of the protein disulfide isomerase RB60 to the chloroplast and the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 6225-6230.
- Likic, V. A., Perry, A., Hulett, J., Derby, M., Traven, A., Waller, R. F., Keeling, P. J., Koehler, C. M., Curran, S. P., Gooley, P. R., and Lithgow, T. (2005). Patterns that define the four domains conserved in known and novel isoforms of the protein import receptor Tom20. *J Mol Biol* 347, 81-93.
- Lopez-Juez, E., and Pyke, K. A. (2005). Plastids unleashed: their development and their integration in plant development. *Int J Dev Biol* 49, 557-577.
- Lund, E., and Dahlberg, J. E. (1998). Proofreading and aminoacylation of tRNAs before export from the nucleus. *Science* 282, 2082-2085.
- Ma, Y., and Taylor, S. S. (2008). A molecular switch for targeting between endoplasmic reticulum (ER) and mitochondria: conversion of a mitochondria-targeting element into an ER-targeting signal in DAKAP1. *J Biol Chem* 283, 11743-11751.
- Marc, P., Margeot, A., Devaux, F., Blugeon, C., Corral-Debrinski, M., and Jacq, C. (2002). Genome-wide analysis of mRNAs targeted to yeast mitochondria. *EMBO Rep* 3, 159-164.
- Maréchal-Drouard, L., Small, I., Weil, J. H., and Dietrich, A. (1995). Transfer RNA import into plant mitochondria. *Methods Enzymol* 260, 310-327.
- Marienfeld, J., Unseld, M., and Brennicke, A. (1999). The mitochondrial genome of *Arabidopsis* is composed of both native and immigrant information. *Trends Plant Sci* 4, 495-502.
- Marin-Navarro, J., Manuell, A. L., Wu, J., and S, P. M. (2007). Chloroplast translation regulation. *Photosynth Res* 94, 359-374.
- Martin, G., and Keller, W. (2007). RNA-specific ribonucleotidyl transferases. *Rna* 13, 1834-1849.
- Martin, N. C., and Hopper, A. K. (1994). How single genes provide tRNA processing enzymes to mitochondria, nuclei and the cytosol. *Biochimie* 76, 1161-1167.
- Martin, N. C., Rabinowitz, M., and Fukuhara, H. (1977a). Yeast mitochondrial DNA specifies tRNA for 19 amino acids. Deletion mapping of the tRNA genes. *Biochemistry* 16, 4672-4677.
- Martin, R. P., Schneller, J. M., Stahl, A. J., and Dirheimer, G. (1977b). Study of yeast mitochondrial tRNAs by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis: characterization of isoaccepting species and search for imported cytoplasmic tRNAs. *Nucleic Acids Res* 4, 3497-3510.

- Martin, W., and Schnarrenberger, C. (1997). The evolution of the Calvin cycle from prokaryotic to eukaryotic chromosomes: a case study of functional redundancy in ancient pathways through endosymbiosis. *Curr Genet* 32, 1-18.
- Maxam, A. M., and Gilbert, W. (1977). A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 560-564.
- May, T., and Soll, J. (2000). 14-3-3 proteins form a guidance complex with chloroplast precursor proteins in plants. *Plant Cell* 12, 53-64.
- Michl, D., Robinson, C., Shackleton, J. B., Herrmann, R. G., and Klosgen, R. B. (1994). Targeting of proteins to the thylakoids by bipartite presequences: CFoII is imported by a novel, third pathway. *Embo J* 13, 1310-1317.
- Min, B., Pelaschier, J. T., Graham, D. E., Tumbula-Hansen, D., and Soll, D. (2002). Transfer RNA-dependent amino acid biosynthesis: an essential route to asparagine formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 2678-2683.
- Morden, C. W., Wolfe, K. H., dePamphilis, C. W., and Palmer, J. D. (1991). Plastid translation and transcription genes in a non-photosynthetic plant: intact, missing and pseudo genes. *Embo J* 10, 3281-3288.
- Mulero, J. J., Rosenthal, J. K., and Fox, T. D. (1994). PET112, a *Saccharomyces cerevisiae* nuclear gene required to maintain rho+ mitochondrial DNA. *Curr Genet* 25, 299-304.
- Nabholz, C., Hauser, R., and Schneider, A. (1997). *Leishmania tarentolae* contains distinct cytosolic and mitochondrial glutaminyl-tRNA synthetase activities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 7903-7908.
- Nagao, A., and Suzuki, T. (2007). Aminoacyl-tRNA surveillance by EF-Tu in mammalian mitochondria. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)*, 41-42.
- Nair, R., and Rost, B. (2005). Mimicking cellular sorting improves prediction of subcellular localization. *J Mol Biol* 348, 85-100.
- Nakamura, A., Yao, M., Chimnaronk, S., Sakai, N., and Tanaka, I. (2006). Ammonia channel couples glutaminase with transamidase reactions in GatCAB. *Science* 312, 1954-1958.
- Namgoong, S., Sheppard, K., Sherrer, R. L., and Soll, D. (2007). Co-evolution of the archaeal tRNA-dependent amidotransferase GatCAB with tRNA(Asn). *FEBS Lett* 581, 309-314.
- Natsoulis, G., Hilger, F., and Fink, G. (1986). The *HTS1* gene encodes both the cytoplasmic and mitochondrial histidine-tRNA synthetases of *S. cerevisiae*. *Cell* 46.
- Neuburger, M., and Douce, R. (1977). [Oxidation of malate, NADH and glycine in C3 and C4 plant mitochondria]. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* 285, 881-884.

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.

Nicolai, M., Duprat, A., Sormani, R., Rodriguez, C., Roncato, M. A., Rolland, N., and Robaglia, C. (2007). Higher plant chloroplasts import the mRNA coding for the eucaryotic translation initiation factor 4E. *FEBS Lett* 581, 3921-3926.

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.

Nussaume, L. (2008). Chloroplast SRP takes another road. *Nat Chem Biol* 4, 529-531.

**O**Donoghue, P., and Luthey-Schulten, Z. (2003). On the evolution of structure in aminoacyl-tRNA synthetases. *Microbiol Mol Biol Rev* 67, 550-573.

Oreb, M., Tews, I., and Schleiff, E. (2008). Policing Tic 'n' Toc, the doorway to chloroplasts. *Trends Cell Biol* 18, 19-27.

Oshikane, H., Sheppard, K., Fukai, S., Nakamura, Y., Ishitani, R., Numata, T., Sherrer, R. L., Feng, L., Schmitt, E., Panvert, M., *et al.* (2006). Structural basis of RNA-dependent recruitment of glutamine to the genetic code. *Science* 312, 1950-1954.

**P**aukstelis, P. J., Chen, J. H., Chase, E., Lambowitz, A. M., and Golden, B. L. (2008).

Structure of a tyrosyl-tRNA synthetase splicing factor bound to a group I intron RNA. *Nature* 451, 94-97.

Peacock, A. C., and Dingman, C. W. (1967). Resolution of multiple ribonucleic acid species by polyacrylamide gel electrophoresis. *Biochemistry* 6, 1818-1827.

Peeters, N., and Small, I. (2001). Dual targeting to mitochondria and chloroplasts. *Biochim Biophys Acta* 1541, 54-63.

Perry, A. J., Rimmer, K. A., Mertens, H. D., Waller, R. F., Mulhern, T. D., Lithgow, T., and Gooley, P. R. (2008). Structure, topology and function of the translocase of the outer membrane of mitochondria. *Plant Physiol Biochem* 46, 265-274.

Pierleoni, A., Martelli, P. L., Fariselli, P., and Casadio, R. (2006). BaCelLo: a balanced subcellular localization predictor. *Bioinformatics* 22, e408-416.

Porras, P., Padilla, C. A., Krayl, M., Voos, W., and Barcena, J. A. (2006). One single in-frame AUG codon is responsible for a diversity of subcellular localizations of glutaredoxin 2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* *281*, 16551-16562.

Pujol, C., Marechal-Drouard, L., and Duchene, A. M. (2007). How can organellar protein N-terminal sequences be dual targeting signals? In silico analysis and mutagenesis approach. *J Mol Biol* *369*, 356-367.

**Q**uandt, D., and Stech, M. (2005). Molecular evolution of the trnL(UAA) intron in bryophytes. *Mol Phylogenet Evol* *36*, 429-443.

**R**andau, L., Schroder, I., and Soll, D. (2008). Life without RNase P. *Nature* *453*, 120-123.

Regev-Rudzki, N., Yogev, O., and Pines, O. (2008). The mitochondrial targeting sequence tilts the balance between mitochondrial and cytosolic dual localization. *J Cell Sci* *121*, 2423-2431.

Rich, A., and RajBhandary, U. L. (1976). Transfer RNA: molecular structure, sequence, and properties. *Annu Rev Biochem* *45*, 805-860.

Richter, S., and Lamppa, G. K. (2003). Structural properties of the chloroplast stromal processing peptidase required for its function in transit peptide removal. *J Biol Chem* *278*, 39497-39502.

Rinehart, J., Horn, E. K., Wei, D., Soll, D., and Schneider, A. (2004). Non-canonical eukaryotic glutamyl- and glutamyl-tRNA synthetases form mitochondrial aminoacyl-tRNA in *Trypanosoma brucei*. *J Biol Chem* *279*, 1161-1166.

Rinehart, J., Krett, B., Rubio, M. A., Alfonzo, J. D., and Soll, D. (2005). *Saccharomyces cerevisiae* imports the cytosolic pathway for Gln-tRNA synthesis into the mitochondrion. *Genes Dev* *19*, 583-592.

Robinson, C. B. e. B., L. K. (1988). Isolation and analysis of chloroplasts. In *Plant molecular Biology*, C. H. Shaw, ed., pp. 67-78.

Robinson, D. G., Langhans, M., Saint-Jore-Dupas, C., and Hawes, C. (2008). BFA effects are tissue and not just plant specific. *Trends Plant Sci* *13*, 405-408.

Rodio, M. E., Delgado, S., De Stradis, A., Gomez, M. D., Flores, R., and Di Serio, F. (2007). A viroid RNA with a specific structural motif inhibits chloroplast development. *Plant Cell* *19*, 3610-3626.

Rozenski, J., Crain, P. F., and McCloskey, J. A. (1999). The RNA Modification Database: 1999 update. *Nucleic Acids Res* *27*, 196-197.

- Rubio, M. A., Rinehart, J. J., Krett, B., Duvezin-Caubet, S., Reichert, A. S., Soll, D., and Alfonzo, J. D. (2008). Mammalian mitochondria have the innate ability to import tRNAs by a mechanism distinct from protein import. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 9186-9191.
- Rudhe, C., Chew, O., Whelan, J., and Glaser, E. (2002a). A novel in vitro system for simultaneous import of precursor proteins into mitochondria and chloroplasts. *Plant J* *30*, 213-220.
- Rudhe, C., Clifton, R., Chew, O., Zemam, K., Richter, S., Lamppa, G., Whelan, J., and Glaser, E. (2004). Processing of the dual targeted precursor protein of glutathione reductase in mitochondria and chloroplasts. *J Mol Biol* *343*, 639-647.
- Rudhe, C., Clifton, R., Whelan, J., and Glaser, E. (2002b). N-terminal domain of the dual-targeted pea glutathione reductase signal peptide controls organellar targeting efficiency. *J Mol Biol* *324*, 577-585.
- Saadatmand, J., Guo, F., Cen, S., Niu, M., and Kleiman, L. (2008). Interactions of reverse transcriptase sequences in Pol with Gag and LysRS in the HIV-1 tRNA(Lys3) packaging/annealing complex. *Virology*.
- Salazar, J. C., Ahel, I., Orellana, O., Tumbula-Hansen, D., Krieger, R., Daniels, L., and Soll, D. (2003). Coevolution of an aminoacyl-tRNA synthetase with its tRNA substrates. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 13863-13868.
- Salinas, T., Duchene, A. M., Delage, L., Nilsson, S., Glaser, E., Zaepfel, M., and Marechal-Drouard, L. (2006). The voltage-dependent anion channel, a major component of the tRNA import machinery in plant mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 18362-18367.
- Salinas, T., Duchene, A. M., and Marechal-Drouard, L. (2008). Recent advances in tRNA mitochondrial import. *Trends Biochem Sci*.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* *74*, 5463-5467.
- Sato, S., Nakamura, Y., Kaneko, T., Asamizu, E., and Tabata, S. (1999). Complete structure of the chloroplast genome of *Arabidopsis thaliana*. *DNA Res* *6*, 283-290.
- Sauerwald, A., Zhu, W., Major, T. A., Roy, H., Palioura, S., Jahn, D., Whitman, W. B., Yates, J. R., 3rd, Ibba, M., and Soll, D. (2005). RNA-dependent cysteine biosynthesis in archaea. *Science* *307*, 1969-1972.
- Scheper, G. C., van der Klok, T., van Andel, R. J., van Berkel, C. G., Sissler, M., Smet, J., Muravina, T. I., Serkov, S. V., Uziel, G., Bugiani, M., *et al.* (2007). Mitochondrial aspartyl-

- tRNA synthetase deficiency causes leukoencephalopathy with brain stem and spinal cord involvement and lactate elevation. *Nat Genet* 39, 534-539.
- Schimmel, P., and Ribas De Pouplana, L. (2000). Footprints of aminoacyl-tRNA synthetases are everywhere. *Trends Biochem Sci* 25, 207-209.
- Schmitt, E., Panvert, M., Blanquet, S., and Mechulam, Y. (2005). Structural basis for tRNA-dependent amidotransferase function. *Structure* 13, 1421-1433.
- Schneider, G., Sjolting, S., Wallin, E., Wrede, P., Glaser, E., and von Heijne, G. (1998). Feature-extraction from endopeptidase cleavage sites in mitochondrial targeting peptides. *Proteins* 30, 49-60.
- Schon, A., Kannangara, C. G., Gough, S., and Soll, D. (1988). Protein biosynthesis in organelles requires misaminoacylation of tRNA. *Nature* 331, 187-190.
- Schulze, J. O., Masoumi, A., Nickel, D., Jahn, M., Jahn, D., Schubert, W. D., and Heinz, D. W. (2006). Crystal structure of a non-discriminating glutamyl-tRNA synthetase. *J Mol Biol* 361, 888-897.
- Sheppard, K., Sherrer, R. L., and Soll, D. (2008a). Methanothermobacter thermotrophicus tRNA Gln confines the amidotransferase GatCAB to asparaginyl-tRNA Asn formation. *J Mol Biol* 377, 845-853.
- Sheppard, K., Yuan, J., Hohn, M. J., Jester, B., Devine, K. M., and Soll, D. (2008b). From one amino acid to another: tRNA-dependent amino acid biosynthesis. *Nucleic Acids Res* 36, 1813-1825.
- Sjolting, S., and Glaser, E. (1998). Mitochondrial targeting peptides in plants. *Trends Plant Sci* 3, 136-140.
- Skouloubris, S., Ribas de Pouplana, L., De Reuse, H., and Hendrickson, T. L. (2003). A noncognate aminoacyl-tRNA synthetase that may resolve a missing link in protein evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 11297-11302.
- Small, I., Peeters, N., Legeai, F., and Lurin, C. (2004). Predotar: A tool for rapidly screening proteomes for N-terminal targeting sequences. *Proteomics* 4, 1581-1590.
- Small, I., Wintz, H., Akashi, K., and Mireau, H. (1998). Two birds with one stone: genes that encode products targeted to two or more compartments. *Plant Mol Biol* 38, 265-277.
- Smirnov, A., Tarassov, I., Mager-Heckel, A. M., Letzelter, M., Martin, R. P., Krashennnikov, I. A., and Entelis, N. (2008). Two distinct structural elements of 5S rRNA are needed for its import into human mitochondria. *Rna* 14, 749-759.
- Stefanovic, S., and Olmstead, R. G. (2005). Down the slippery slope: plastid genome evolution in Convolvulaceae. *J Mol Evol* 61, 292-305.

- Steinmetz, A. W., JH (1985). Methods in Enzymology. In, pp. 212-231.
- Stojanovski, D., Muller, J. M., Milenkovic, D., Guiard, B., Pfanner, N., and Chacinska, A. (2008). The MIA system for protein import into the mitochondrial intermembrane space. *Biochim Biophys Acta* 1783, 610-617.
- T**aylor, S. W., Fahy, E., and Ghosh, S. S. (2003). Global organellar proteomics. *Trends Biotechnol* 21, 82-88.
- Tumbula, D. L., Becker, H. D., Chang, W. Z., and Soll, D. (2000). Domain-specific recruitment of amide amino acids for protein synthesis. *Nature* 407, 106-110.
- Turner, R. J., Lovato, M., and Schimmel, P. (2000). One of two genes encoding glycyl-tRNA synthetase in *Saccharomyces cerevisiae* provides mitochondrial and cytoplasmic functions. *J Biol Chem* 275, 27681-27688.
- U**nseld, M., Marienfeld, J. R., Brandt, P., and Brennicke, A. (1997). The mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana* contains 57 genes in 366,924 nucleotides. *Nature Genetics* 15, 57-61.
- V**illarejo, A., Buren, S., Larsson, S., Dejardin, A., Monne, M., Rudhe, C., Karlsson, J., Jansson, S., Lerouge, P., Rolland, N., *et al.* (2005). Evidence for a protein transported through the secretory pathway en route to the higher plant chloroplast. *Nat Cell Biol* 7, 1224-1231.
- Vojta, L., Soll, J., and Bolter, B. (2007). Protein transport in chloroplasts - targeting to the intermembrane space. *Febs J* 274, 5043-5054.
- W**helan, J., and Schleiff, E. (2004). Protein targeting and import. In *Plant mitochondria: from genome to function*, H. M. a. J. W. e. D.A. Day, ed. (Kluwer Academic Publishers), pp. 31-54.
- Wiedemann, N., Frazier, A. E., and Pfanner, N. (2004). The protein import machinery of mitochondria. *J Biol Chem* 279, 14473-14476.
- Wimmer, B., Lottspeich, F., van der Klei, I., Veenhuis, M., and Gietl, C. (1997). The glyoxysomal and plastid molecular chaperones (70-kDa heat shock protein) of watermelon cotyledons are encoded by a single gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 13624-13629.
- Wolf, Y. I., Aravind, L., Grishin, N. V., and Koonin, E. V. (1999). Evolution of aminoacyl-tRNA synthetases--analysis of unique domain architectures and phylogenetic trees reveals a complex history of horizontal gene transfer events. *Genome Res* 9, 689-710.

- X**u, X. M., Carlson, B. A., Mix, H., Zhang, Y., Saira, K., Glass, R. S., Berry, M. J., Gladyshev, V. N., and Hatfield, D. L. (2007). Biosynthesis of selenocysteine on its tRNA in eukaryotes. *PLoS Biol* 5, e4.
- Y**ang, Y. D., Elamawi, R., Bubeck, J., Pepperkok, R., Ritzenthaler, C., and Robinson, D. G. (2005). Dynamics of COPII vesicles and the Golgi apparatus in cultured *Nicotiana tabacum* BY-2 cells provides evidence for transient association of Golgi stacks with endoplasmic reticulum exit sites. *Plant Cell* 17, 1513-1531.
- Yi, L., and Dalbey, R. E. (2005). Oxa1/Alb3/YidC system for insertion of membrane proteins in mitochondria, chloroplasts and bacteria (review). *Mol Membr Biol* 22, 101-111.
- Yoshihisa, T., Yunoki-Esaki, K., Ohshima, C., Tanaka, N., and Endo, T. (2003). Possibility of cytoplasmic pre-tRNA splicing: the yeast tRNA splicing endonuclease mainly localizes on the mitochondria. *Mol Biol Cell* 14, 3266-3279.
- Yu, C. S., Chen, Y. C., Lu, C. H., and Hwang, J. K. (2006). Prediction of protein subcellular localization. *Proteins* 64, 643-651.
- Yuan, J., Sheppard, K., and Soll, D. (2008). Amino acid modifications on tRNA. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 40, 539-553.
- Z**hang, 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.
- Zhao, J., Onduka, T., Kinoshita, J. Y., Honsho, M., Kinoshita, T., Shimazaki, K., and Ito, A. (2003). Dual subcellular distribution of cytochrome b5 in plant, cauliflower, cells. *J Biochem* 133, 115-121.
- Zybailov, B., Rutschow, H., Friso, G., Rudella, A., Emanuelsson, O., Sun, Q., and van Wijk, K. J. (2008). Sorting signals, N-terminal modifications and abundance of the chloroplast proteome. *PLoS ONE* 3, e1994.



# *Annexes*



**Characterization of *Arabidopsis thaliana* genes encoding functional homologues of the yeast metal chaperone Cox19p, involved in cytochrome c oxidase biogenesis**

Carolina V. ATTALLAH, Elina WELCHEN, Claire PUJOL, Geraldine BONNARD and Daniel H. GONZALEZ

**Plant molecular biology, 2007, Vol. 65, Pages 343–355**

**Pages 144-156 :**

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

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

<http://dx.doi.org/10.1007/s11103-007-9224-1>

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/>



*Fin*

