

Université de Strasbourg
Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

THESE

En vue de l'obtention du grade de

Docteur de l'Université de Strasbourg

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

**Etude des protéines VDAC
dans le cadre de l'importation des ARNt
dans les mitochondries végétales**

Présentée par
Samira EL FAROUK-AMEQRANE

Soutenue publiquement le 28 octobre 2009
devant la commission d'examen

Pr. Claire REMACLE
Dr. Marie SISSLER
Dr. Hakim MIREAU
Dr. Laurence MARECHAL-DROUARD

Rapporteur externe
Rapporteur interne
Rapporteur externe
Directeur de thèse

Institut de Biologie Moléculaire des Plantes
UPR-CNRS 2357

A ma famille...

« Les sciences sont des serrures dont la clé est l'étude. »

Proverbe arabe

« Ce qui s'apprend sans peine ne vaut rien et ne demeure pas. »

René Barjave

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier le professeur Claire Remacle ainsi que les docteurs Marie Sissler et Hakim Mireau pour avoir accepté de juger ce travail.

Mes remerciements vont ensuite à Laurence qui m'a accueillie dans son équipe et qui a su me laisser la liberté nécessaire à l'accomplissement de mes travaux, tout en y gardant un œil critique et avisé.

Mes pensées vont aussi à Monique, Anne, Marie-France et Anne-Marie pour tous les conseils, les discussions, la sympathie et l'ambiance conviviale.

Enfin, une pensée émue pour tous les étudiants avec qui j'ai partagé une salle, un café ou un repas pendant ces trois années : Sabina, Morgane, Julia, Jawhra, Baligh, Kamel, Claire, Jérémie, Noha, Romain, Thalia, Sarah, Nawel, Marie, Chems-Eddine, Françoisx2, Gilles, Bernard, Antonio, Céline, Diane, Dasha et toute la troupe du très convivial département (Ginette, André, José, Patrice, Géraldine, Frédérique, Heike, Gag, Jean) qui ont tous contribué, chacun à sa façon à cette thèse et tout particulièrement le Grand Chef JMG !

Mes remerciements vont également à l'équipe d'enseignants de Biochimie qui a rendu ces années de thèse extrêmement agréables. Merci à Joern pour le soutien, les discussions et les conseils. À Fabrice, Geneviève, Angélique, Malou, Mathieu, Marc, Gaëlle, Caroline, Paul merci pour tous les moments passés en cours, en exam, en pause ou au resto.

Je n'oublie pas Philippe, Malek et Claude avec lesquels j'ai eu le plaisir de collaborer pour mener à bien une partie de ce travail.

Je voudrais aussi remercier tous les membres de l'institut qui m'ont aidée et soutenue tout le long de ces trois années : Pierrette, Danièle, Marie-Jeanne, Martine, Lydie, Mr Haegel, Mr Risser, Mr Aymé, Michèle...

Enfin, je remercie infiniment ma famille et mes amis pour son irremplaçable et inconditionnel soutien et plus particulièrement mon père Driss, ma mère Sfia, ma sœur Hanane, son mari Hakim et leur petit bout de chou Abdel-Wakil, mes frères Ibrahim et Saïd sans oublier Nisrine, Sandrine, khalti Zennou et mon mari Tarik à qui je leur dois tout et plus que ça, merci pour l'amour que vous m'avez témoigné ces dernières années. Ils ont été présents pour écarter les doutes, soigner les blessures et partager les joies. Cette thèse est la leur aussi.

Table des matières

INTRODUCTION

I La mitochondrie.....	1
1 Structure.....	1
1.1 La membrane externe.....	1
1.2 La membrane interne.....	2
1.3 L'espace matriciel.....	2
2 Fonctions des mitochondries.....	3
3 Origine des mitochondries.....	3
4 Le génome mitochondrial.....	4
4.1 Taille.....	4
4.2 Organisation.....	4
4.3 Expression du génome mitochondrial de plantes.....	5
4.3.1 Transcription, maturation et dégradation.....	5
4.3.2 Traduction.....	6
4.3.3 Particularité du code génétique mitochondrial.....	7
5 Le protéome mitochondrial.....	7
5.1 Les protéines membranaires.....	8
5.1.1 Les protéines de la membrane externe mitochondriale.....	8
5.1.2 Les protéines de la membrane interne mitochondriale.....	9
5.1.3 Les protéines associées aux membranes mitochondriales.....	11
5.2 Les protéines solubles.....	11
6 Importation de macromolécules depuis le cytosol.....	13
6.1 Importation de protéines.....	13
6.1.1 Protéines avec une séquence d'adressage.....	13
6.1.2 Protéines sans séquence d'adressage.....	14
6.1.3 Différences avec les plantes.....	15
6.2 Importation d'acides nucléiques.....	16
6.2.1 Importation d'ARNt.....	16
6.2.2 Importation d'autres acides nucléiques.....	17
7 Dysfonctionnements mitochondriaux.....	17
II Importation d'ARNt cytosoliques dans les mitochondries.....	19
1 Les ARNt.....	19
1.1 Structure.....	19
1.2 Transcription des gènes nucléaires d'ARNt.....	20
1.3 Maturation des ARNt.....	20
1.4 Aminoacylation des ARNt.....	21
1.5 Eléments d'identité des ARNt.....	22
1.6 Export des ARNt du noyau.....	23
2 L'importation des ARNt dans les mitochondries.....	23
2.1 Les organismes concernés.....	23
2.1.1 Les protozoaires.....	24
2.1.2 Les champignons.....	24
2.1.3 Les animaux.....	25
2.1.4 Le règne végétal.....	25
2.2 Les déterminants de l'importation.....	26
2.2.1 La levure <i>S. cerevisiae</i>	26
2.2.2 Chez les protozoaires.....	27
2.2.3 Chez les plantes.....	28
2.3 Les mécanismes d'importation des ARNt au sein des mitochondries.....	29
2.3.1 Chez la levure <i>S. cerevisiae</i>	30
2.3.2 Chez les protozoaires.....	31
2.3.3 Chez les plantes.....	32
2.3.4 Chez l'Homme.....	32
3 Dysfonctionnements mitochondriaux liés à l'importation des ARNt et stratégies de correction.....	33
III Les protéines VDAC.....	34
1 Les gènes.....	34

2 La famille des protéines VDAC.....	34
3 Structure des protéines VDAC.....	35
3.1 Modélisation de la structure des protéines VDAC.....	35
3.2 Structure 3D des protéines VDAC.....	36
4 Signatures des protéines VDAC.....	37
5 Etat oligomérique des protéines VDAC.....	37
6 Etat conformationnel des protéines VDAC.....	38
7 Fonctions des protéines VDAC.....	38
7.1 Respiration et croissance cellulaire.....	39
7.2 L'apoptose.....	39
7.3 Autres fonctions.....	40
8 Modulation de l'activité des protéines VDAC.....	41
9 Plusieurs isoformes, plusieurs fonctions ?.....	42
10 Localisation cellulaire des protéines VDAC.....	42
10.1 Localisation mitochondriale.....	42
10.2 Localisation au niveau de la membrane plasmique.....	43
10.3 Autres localisations.....	43
TRAVAUX DE THESES.....	45
MATERIEL ET METHODES	
I MATERIEL.....	47
1 Matériel végétal.....	47
2 Souches bactériennes d' <i>Escherichia coli</i>	47
3 Plasmides.....	47
4 Constructions.....	49
5 Anticorps polyclonaux.....	49
6 Oligonucléotides.....	50
7 Outils informatiques.....	50
7.1 Analyse de séquences.....	50
7.2 Quantification.....	50
7.3 Logiciels relatifs à la PCR quantitative.....	50
7.3.1 Détermination des couples d'oligodésoxyribonucléotides pour PCR quantitative.....	50
7.3.2 Détermination de l'efficacité des couples d'oligodésoxyribonucléotides pour PCR quantitative.....	50
7.4 Bases de données.....	51
II METHODES.....	53
1 Techniques spécifiques à l'ADN.....	53
1.1 Amplification par PCR (« Polymerase Chain Reaction »).....	53
1.2 PCR quantitative (qPCR).....	53
1.2.1 Principe de la PCR quantitative et détermination du cycle seuil.....	53
1.2.2 Conception des oligonucléotides.....	54
1.2.3 Réactions de qPCR.....	54
1.2.4 Détermination des efficacités d'amplification.....	55
1.2.5 Méthode de calcul.....	55
1.3 Mutagenèse par PCR.....	55
1.3.1 Pour réaliser une mutation ponctuelle à l'extrémité 5'.....	56
1.3.2 Pour déléter une partie de l'extrémité 3'.....	56
1.3.3 Pour construire des séquences chimériques.....	56
1.4 Electrophorèse sur gel d'agarose.....	57

1.5 Purification des fragments d'ADN issus de gels d'agarose.....	57
1.6 Techniques de clonage.....	57
1.6.1 Clonage de fragments coupés par des enzymes de restriction.....	57
1.6.1.1 Digestion par des enzymes de restriction.....	57
1.6.1.2 Ligation.....	58
1.6.1.3 Transformation et sélection.....	58
1.6.2 Clonage direct d'un produit PCR.....	58
1.6.2.1 Principe.....	59
1.6.2.2 Méthode.....	59
1.7 Préparation des bactéries compétentes.....	60
1.8 Criblage de colonies par PCR.....	60
1.9 Préparation de l'ADN plasmidique.....	60
1.9.1 Minipréparation d'ADN plasmidique.....	61
1.9.2 Midipréparation d'ADN plasmidique.....	61
1.10 Séquençage de l'ADN.....	62
1.11 Marquage d'oligonucléotide à l'extrémité 5'.....	62
1.12 Marquage d'un fragment d'ADN double brin.....	63
2 Techniques spécifiques à l'ARN.....	63
2.1 Extraction d'ARN.....	63
2.2.1 ARN totaux de pomme de terre.....	63
2.2.2 ARN mitochondriaux de pomme de terre.....	64
2.2 Electrophorèse dénaturante sur gel de polyacrylamide.....	64
2.3 Elution des ARN sur gel de polyacrylamide.....	65
2.4 « Northern blot ».....	65
2.4.1 Transfert des ARN.....	65
2.4.2 Hybridation de la sonde.....	66
2.5 Transcription <i>in vitro</i>.....	66
2.5.2 Transcription non radioactive.....	66
2.5.2 Transcription radioactive.....	67
2.5.3 Transcription inverse suivie d'une PCR (RT-PCR).....	67
2.6 Quantification de l'ADN et de l'ARN.....	68
3 Techniques relatives aux protéines.....	68
3.1 Surexpression de protéines dans E.coli.....	68
3.2 Techniques de purification de protéines.....	69
3.2.1 Petites préparations (3mL).....	69
3.2.2 Grandes préparations (500 mL).....	70
3.3 Techniques de concentration des protéines : cellule de concentration.....	71
3.4 Quantification des protéines.....	71
3.5 Electrophorèse sur gel de polyacrylamide.....	72
3.5.1 Electrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE).....	72
3.5.2 Electrophorèse bidimensionnelle.....	73
3.6 Identification des protéines par spectrométrie de masse.....	73
3.7 Détection des protéines après fractionnement électrophorétique.....	75
3.7.1 Coloration au bleu de Coomassie.....	75
3.7.2 Coloration à l'argent.....	75
3.8 Immunorévélation de type «western blot ».....	76
3.8.1 Transfert des protéines sur membrane.....	76
3.8.2 Coloration des protéines après électrotransfert sur membrane.....	77
3.8.3 Fixation des anticorps.....	77
3.8.4 Révélation de la fixation des anticorps.....	77
3.9 Technique de « farwestern ».....	78
3.10 Technique de diffusion élastique de la lumière « DLS ».....	78
3.11 Techniques permettant d'identifier l'interaction protéine/ARN.....	79
3.11.1 Technique de « northwestern ».....	79
3.11.2 Technique du gel retard.....	79
3.11.2.1 Préparation de l'échantillon.....	80
3.11.2.2 Préparation du gel.....	80
3.12 Techniques de cristallisation des protéines.....	80
3.12.1 Technique de diffusion de vapeur.....	81
3.12.2 Technique de diffusion contre capillaire.....	81

4	Techniques relatives aux mitochondries de pomme de terre.....	81
4.1	Purification de mitochondries de pomme de terre.....	81
4.2	Fractionnement fait sur les mitochondries de pomme de terre.....	83
4.2.1	Préparation de mitoplastes et de membranes externes.....	83
4.2.2	Préparation de matrice, de membranes totales et de membranes internes.....	84

RESULTATS ET DISCUSSION

Chapitre I : Etude de l'interaction des protéines VDAC de pomme de terre avec les acides nucléiques

1	Préambule.....	85
2	Validation par gel retard de l'interaction différentielle des protéines VDAC34 et VDAC36 avec les ARNt	86
2.1	Stratégie d'étude.....	86
2.2	Substrat utilisé.....	87
2.3	Analyse des résultats et discussion.....	87
3	Analyse de l'interaction entre les protéines VDAC et les ARNt par northwestern.....	89
3.1	Stratégie d'étude.....	89
3.2	Choix des mutations.....	90
3.2.1	Structure secondaire des protéines VDAC.....	90
3.2.2	Les constructions mutantes.....	91
3.4	Analyse par northwestern de l'interaction des différents mutants de VDAC avec les ARNt.....	95
3.4.1	Quantification de l'interaction.....	95
3.4.2	Analyse des résultats et discussion.....	96
4	Etude de l'implication du site de liaison à l'ATP des protéines VDAC dans l'interaction avec les ARNt.....	101
4.1	Stratégie d'étude.....	101
4.2	Analyse des résultats et discussion.....	101
5	Interaction avec les acides nucléiques.....	102
5.1	Choix des acides nucléiques	102
5.2	Analyse des résultats et discussion.....	103
6	Conclusion.....	104

Chapitre II : Essais de cristallisation des protéines VDAC34 et VDAC36 de pomme de terre

1	Préambule	106
2	Obtention des protéines VDAC34 et VDAC36 pures et natives.....	109
2.1	Purification en condition native.....	109
2.2	Concentration de protéines.....	110
2.3	Contrôle de pureté des échantillons.....	110
2.4	Analyse de la monodispersité des protéines VDAC purifiées.....	111
2.5	Essais des détergents pour la cristallisation des protéines VDAC de pomme de terre.....	112
3	Tests d'activité des protéines VDAC.....	113
3.1	Etude de l'interaction des protéines VDAC avec les ARNt par la technique du gel retard.....	113
3.2	Analyse de l'interaction des protéines VDAC avec les ARNt par diffusion dynamique de la lumière.....	113
4	Essais de cristallisation des protéines VDAC de pomme de terre.....	114
4.1	Technique de la diffusion de vapeur.....	115
4.2	Technique de diffusion contre capillaire.....	115
5	Conclusion.....	117

Chapitre III : Recherche des partenaires de VDAC potentiellement impliqués dans le transport des ARNt dans les mitochondries de pomme de terre

1	Préambule.....	118
2	Méthodologie.....	119
3	Analyse des résultats et discussion.....	120
3.1	Analyse des paramètres fournis par la spectrométrie de masse.....	120

3.2 Analyse des protéines identifiées par spectrométrie de masse et discussion.....	122
3.2.1 Analyse globale.....	122
3.2.2 Les protéines potentiellement impliquées dans le mécanisme d'importation des ARNt au sein des mitochondries végétales.....	122
3.2.2.1 Les précurseurs des protéines mitochondriales.....	122
3.2.2.2 La protéine homologue à TOM40-1 d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	123
3.2.2.3 La protéine homologue à une sous-unité de l'ATP synthase de <i>Glycine max</i>	124
4 Modèle proposé.....	126
5 Conclusion.....	127
Chapitre IV : Etude de la sélectivité dans le transport des ARNt dans les mitochondries végétales	
1 Préambule.....	129
2 Mise au point des conditions pour la quantification des ARNt par PCR quantitative.....	131
2.1 Préparation des extraits mitochondriaux.....	131
2.2 Choix des ARNt analysés.....	131
2.3 Choix des amorces.....	132
2.4 Efficacité de la PCR.....	134
2.5 Correction des données en fonction du niveau d'expression des gènes.....	134
3 Analyse des résultats et discussion	135
4 Conclusion.....	138
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	140
NOUVEAU CHAPITRE DE LA THESE.....	147
ANNEXES.....	157
BIBLIOGRAPHIE.....	170

Abréviations

A

A	Adénine
aa	Acide aminé
aaRS	Aminoacyl-ARNt synthétase
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ADP	Adénosine-5'-diphosphate
APS	Persulfate d'ammonium
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARNt	ARN de transfert
ATP	Adénosine 5'-triphosphate

B

BET	Bromure d'éthidium
BSA	Sérumalbumine bovine

C

Ci	Curie
cpm	Coups par minutes
CTP	Cytidine 5'-triphosphate

D

°C	Degré Celsius
ddNTP	Didésoxyribonucléoside triphosphate
Da	Dalton
DO	Densité optique
Dnase	Désoxyribonucléase
dNTP	Désoxyribonucléoside triphosphate
DTT	Dithiothréitol

E

EDTA	Acide éthylène diamine tétra-acétique
EGTA	Ethylène glycol tétra-acétate

F

FAD	Flavine adénine dinucléotide
-----	------------------------------

G

g	Gramme
g	Multiple de la gravitation naturelle de la terre
GTP	Guanosine 5'-triphosphate

H

HEPES	Acide (N-[2-hydroxyéthyl] pipérazine-N'[2-éthane sulfonique])
-------	---

I

IPTG Isopropyl- β -D-thiogalactoside

K

Kan Kanamycine

kb Kilobase

kDa KiloDalton

L

LB Luria broth

M

mF MicroFarad

M Molaire

mA Milliampère

mt Mitochondrial/mitochondriaux

N

nt Nucléotide

NTP Nucléoside triphosphate

P

PCR Polymerase Chain Reaction

PAGE Electrophorèse sur gel de polyacrylamide

PM Poids moléculaire

PMSF Phénylméthylsulfonylfluoride

p/v Poids par volume

PVP Polyvinylpyrrolidone

Q

qsp Quantité suffisante pour

R

RIC RNA import complex

RNase Ribonucléase

RNasine Inhibiteur de ribonucléase

S

S Unité de Svedberg

SDS Dodécyl sulfate de sodium

SSC Standard sodium citrate

T

TAE Tris-acétate-EDTA

TE Tris-EDTA

TBE Tris-borate-EDTA

TEMED N,N,N',N'-tétraméthyléthylène diamine
TIM Translocase of inner Membrane
TOM Translocase of outer Membrane
Tris Tris(hydroxyméthyl)aminométhane

U
U Unité enzymatique
UTP Uridine 5'-triphosphate
UV Ultraviolet

V
v/v Volume par volume
VDAC Voltage Dependant Anion Channel

W
W Watt

X
X-GAL 5-bromo-4-chloro-3-indole- β -D-galactopyrranoside

Introduction

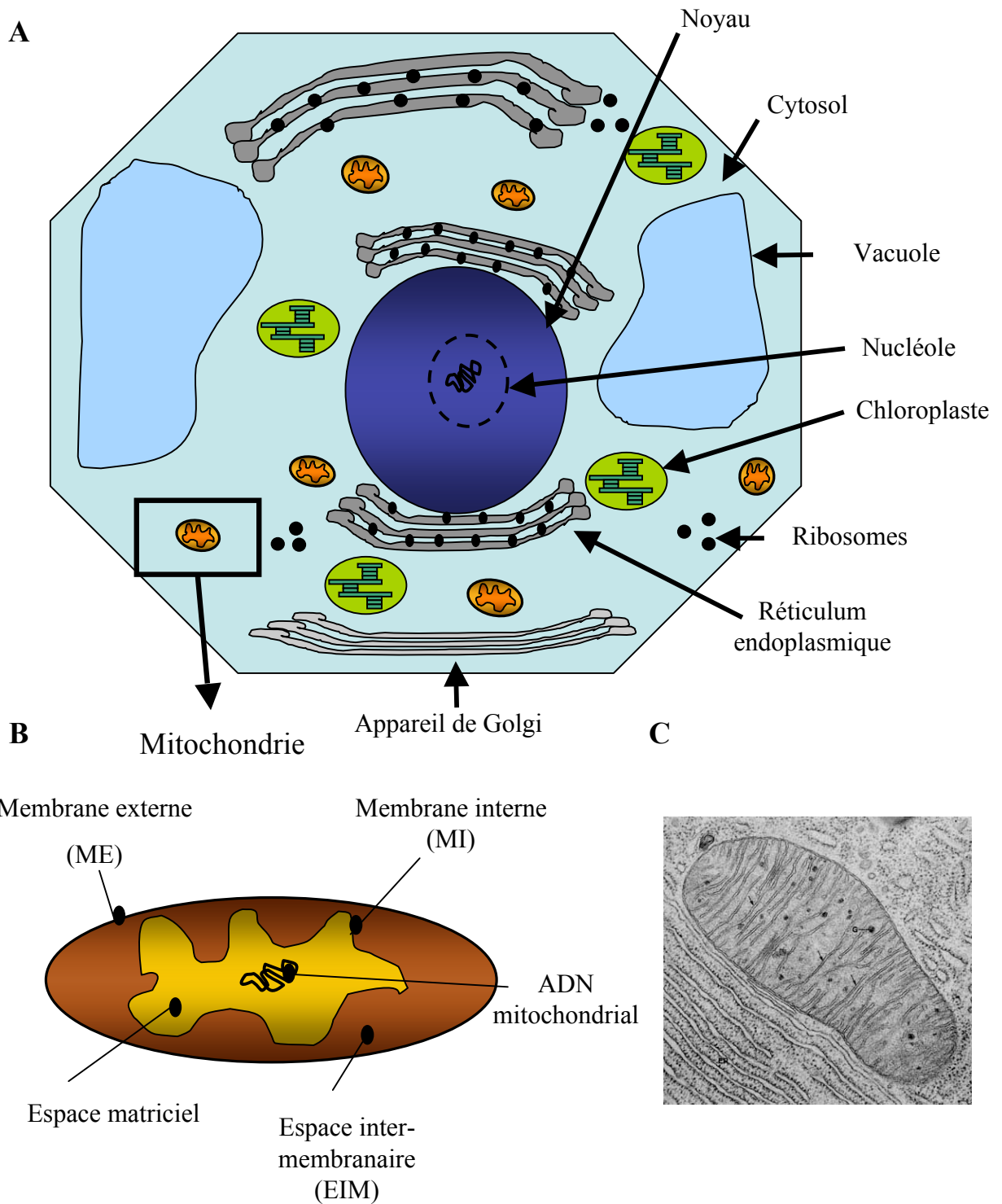


Figure 1

Les Mitochondries

A Représentation schématique d'une cellule végétale

B Organisation structurale de la mitochondrie

C Vue en microscopie électronique d'une mitochondrie

I La mitochondrie

Le mot mitochondrie dérive du grec mitos, « filament », et chondros, « graine » en raison de l'aspect de cet organite au microscope. Par exemple chez l'Homme, dans les cellules élaboratrices d'hormones stéroïdiennes les mitochondries sont filamenteuses, alors que dans les cellules du foie, elles sont granulaires. Les mitochondries sont des organites ovoïdes de l'ordre du micromètre présents dans toutes les cellules eucaryotes à l'exception de certains protistes primitifs comme les diplomonades et les rétrotonades (Roger & Silberman, 2002; Silberman et al., 2002; Burger & Lang, 2003). Ces organites présentent une grande diversité dans l'abondance, l'activité enzymatique, la composition en protéines et en lipides en fonction du type de tissu, du stade de développement et des réponses au milieu environnant.

1 Structure

La structure des mitochondries est similaire malgré leur diversité (**Figure 1**). Ces organites sont délimités par une enveloppe constituée de deux membranes, membrane externe et membrane interne. Ces membranes sont très différentes dans leur composition et leurs fonctions et délimitent deux compartiments mitochondriaux : espace matriciel et espace inter-membranaire.

1.1 La membrane externe

La membrane externe mitochondriale est fortement perméable car constituée principalement de porines également connues sous le nom de VDAC (« Voltage Dependant Anion Channel »). Chez les plantes, ces porines représentent 50% des protéines de la membrane externe (HP Braun, Université d'Hannover, communication personnelle). Ces protéines traversent cette double couche lipidique pour former des canaux permettant la diffusion de solutés de taille inférieure ou égale à 10 kDa. La membrane externe renferme également les protéines du complexe TOM (« Translocase of the Outer Membrane »)

d'importation des protéines et un certain nombre d'enzymes impliquées dans la synthèse mitochondriale des lipides (Alberts, 1994).

1.1 La membrane interne

La membrane interne est beaucoup moins perméable que la membrane externe. Elle se replie pour former de nombreuses crêtes, ce qui lui permet d'augmenter significativement sa surface. La membrane interne a deux caractéristiques qui lui sont spécifiques. Tout d'abord sa composition lipidique est particulière par rapport aux autres membranes de la cellule : elle contient des phosphatidylcholines et des cardiolipines. De plus, son ratio protéines/lipides de 3,2 est le plus élevé de toutes les membranes biologiques étudiées (contre 1,1 pour la membrane mitochondriale externe ou 0,85 pour la membrane plasmique de cellules murines) (Karp, 2007). Cette membrane renferme les protéines des réactions d'oxydation de la chaîne respiratoire et de la synthèse d'ATP. De plus, elle contient des transporteurs pour des éléments tels que le succinate, les acides aminés, les acides gras, l'ATP, l'eau ou les protéines (Picault et al., 2004). Par exemple, c'est à ce niveau que sont localisés les aquaporines pour la diffusion passive de l'eau (Lee & Thevenod, 2006), le transporteur ADP/ATP ou ANT (« Adenine Nucleotide Translocator ») (Klingenberg, 1989) et les protéines du complexe TIM (« Translocase of the Inner Membrane ») d'importation des protéines qui avec le complexe TOM de la membrane externe constituent les points de contact entre les deux membranes.

1.3 L'espace matriciel

L'espace matriciel est constitué d'un gel de moins de 50% d'eau renfermant plusieurs copies du génome mitochondrial accompagnées des éléments nécessaires à sa transcription et à sa traduction. De plus, on y trouve des enzymes du métabolisme énergétique (par exemple les enzymes du cycle de l'acide citrique et les enzymes de l'hélice de Lymen), des substrats, des cofacteurs nucléotidiques et des ions inorganiques (Voet, 2002).

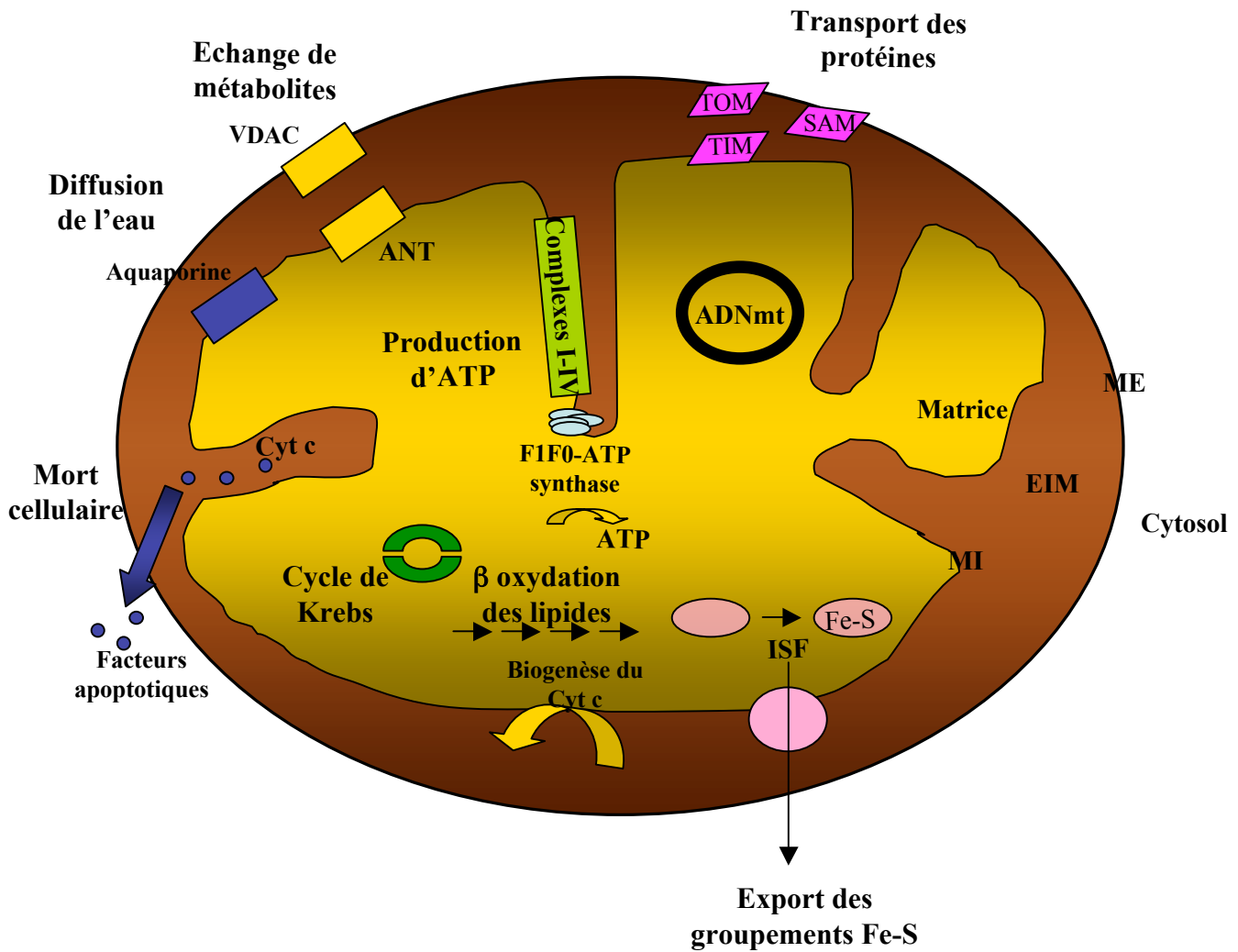


Figure 2

Quelques fonctions des mitochondries

Représentation schématique de la mitochondrie avec les protéines impliquées dans différents processus
 Cyt c=cytochrome c, ISF=ironsulfur fragment, TIM=translocase of the inner membrane, TOM=translocase of the outer membrane, SAM=sorting and assembly machinery, VDAC=canal anionique voltage-dépendant, ANT= adenine nucleotide translocator, ME=membrane externe, MI=membrane interne, EIM=espace inter-membranaire, mt=mitochondrial

D'après Dimmer, KS et Rapaport, D 2008

2 Fonctions des mitochondries

Les mitochondries sont des organites essentiels à la cellule. Elles participent à la fois aux processus de la vie et de la mort cellulaire (**Figure 2**). Son rôle primordial est de convertir l'énergie des molécules organiques en énergie utilisable par la cellule, l'ATP. De plus, les fonctions mitochondriales incluent différentes voies de synthèse (acides gras, acides aminés, vitamines et hème), des voies de catabolisme (acides gras et acides aminés) ainsi que des systèmes de concentration de substances (protéines, lipides, colorants et calcium) (Voet, 1990; Alberts, 1995; Scheffler, 1999). Enfin, une autre fonction importante de cet organite est son implication dans la mort cellulaire programmée. Chez les animaux, ce processus se traduit par le relargage du cytochrome *c*, un transporteur d'électrons de la chaîne respiratoire, depuis l'espace inter-membranaire vers le cytosol à travers le « Permeability Transition Pore » ou PTP dont les principaux composants sont les protéines VDAC et ANT. Le cytochrome *c* libéré va participer à l'assemblage d'un complexe protéique (l'apoptosome) responsable de l'activation d'enzymes protéolytiques, les caspases, qui vont activer un certain nombre de processus impliqués dans la mort de la cellule (Zamzami & Kroemer, 2001). Chez les plantes l'implication du cytochrome *c* (Balk et al., 1999; Yu et al., 2002; Thomas & Franklin-Tong, 2004), du PTP (Lin et al., 2006) et de protéines caspases-like (Hatsugai et al., 2004) dans la mort cellulaire programmée ont été décrits comme montrant des analogies avec l'apoptose chez les animaux.

3 Origine des mitochondries

Le nombre croissant de génomes mitochondriaux entièrement séquencés ainsi que de multiples analyses génomiques indiquent que les mitochondries dériveraient d'une α -protéobactérie. Cette α -protéobactérie serait proche de *Rickettsia prowazekii* et aurait été endocytée par une cellule proto-eucaryotique ancestrale il y a 1,5 milliards d'années (Gray et al., 2001). C'est la théorie endosymbiotique.

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

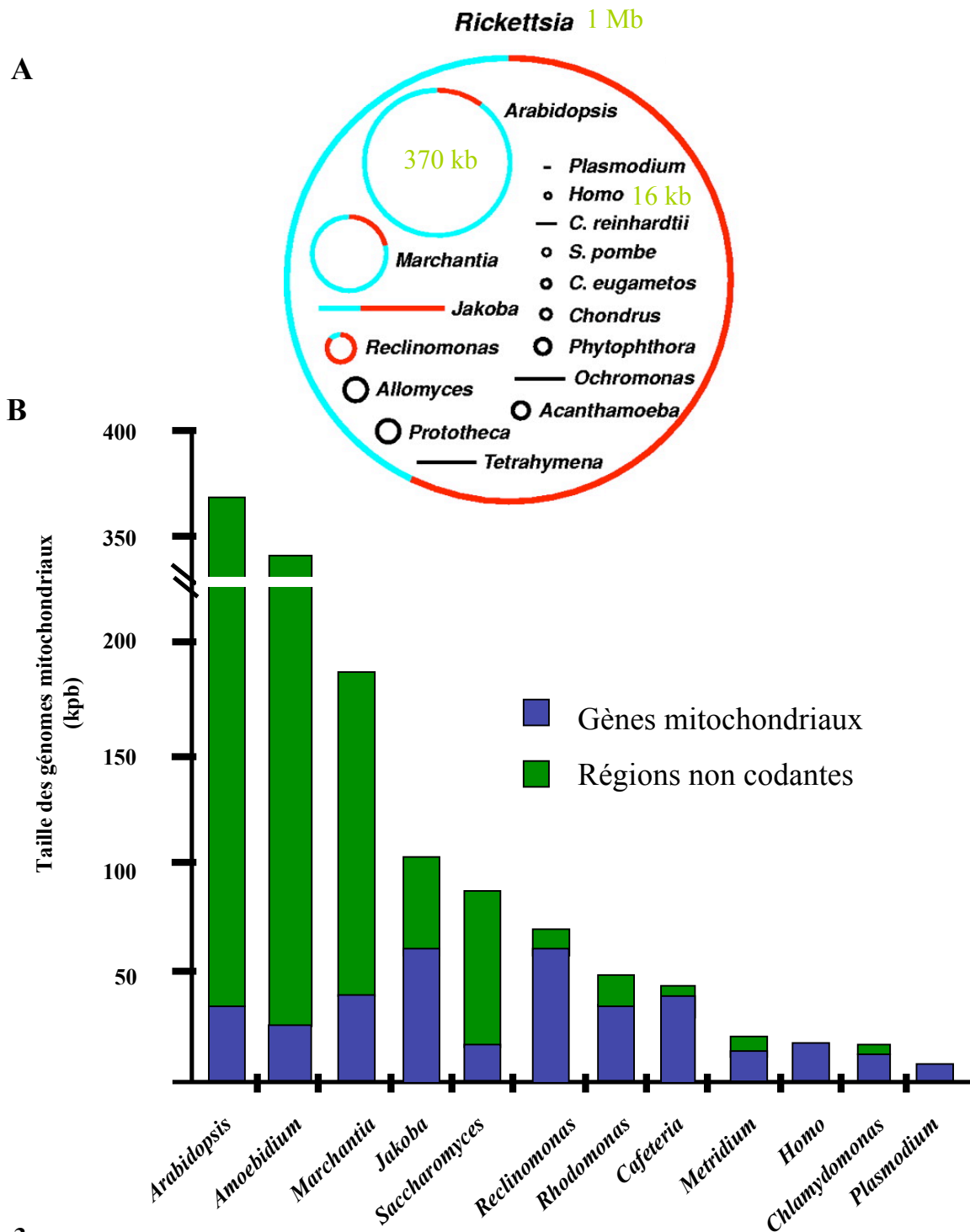


Figure 3

A Taille et organisation des génomes mitochondriaux comparés à celui de *Rickettsia*

Pour les génomes de plus de 60 kpb, les régions codantes sont en rouge et les régions non codantes ou inconnues en bleu. La forme du génome est indiquée par des lignes s'il est linéaire et par des cercles s'il s'agit d'un génome circulaire.

C.=*Chlamydomonas*, *S.*=*Schizosaccharomyces*

D'après Gray, 1999

B La taille des génomes mitochondriaux n'est pas corrélée aux nombres de gènes

D'après Burger, G et al., 2003

4 Le génome mitochondrial

Au cours de l'évolution, depuis l'endosymbiote jusqu'à la mitochondrie actuelle, le génome mitochondrial a évolué de façon indépendante dans les différents règnes eucaryotiques pour acquérir des caractéristiques spécifiques dans la structure et l'expression de leur génome. Ainsi, la comparaison de l'ADN mitochondrial d'organismes évolutivement éloignés montre une très grande variabilité en termes de taille, d'organisation et de séquence.

4.1 Taille

Les génomes mitochondriaux ont une taille variable (**Figure 3A**). Elle varie généralement entre 15 et 60 kpb pour les animaux, et peut atteindre jusqu'à 570 kpb pour les plantes. Citons, par exemple les cas les plus extrêmes : 5,9 kpb pour *Plasmodium falcipodium* (Conway et al., 2000) et 490 kpb pour le riz (Notsu et al., 2002). Toutefois les variations de taille observées entre les différentes espèces ne sont pas corrélées avec le nombre de gènes (**Figure 3B**). 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 taille et à la fréquence des régions intergéniques.

Chez les plantes, la plus grande taille des génomes mitochondriaux est liée d'une part à l'existence d'événements de recombinaison entre des séquences répétées et des éléments mobiles présents dans les régions intergéniques (Mackenzie & McIntosh, 1999) et d'autre part à l'intégration, au cours de l'évolution, de séquence d'ADN exogènes (nucléaire et chloroplastique). Chez *A. thaliana*, ces séquences exogènes représentent respectivement 1,2 et 4% du génome mitochondrial (Marienfeld et al., 1999).

4.2 Organisation

Les génomes mitochondriaux peuvent exister sous forme linéaires, comme pour *Chlamydomonas reinhardtii* mais sont en général sous forme circulaires (**Figure 3A**). Chez les plantes, ils sont souvent représentés sous la forme d'un cercle maître qui côtoie des

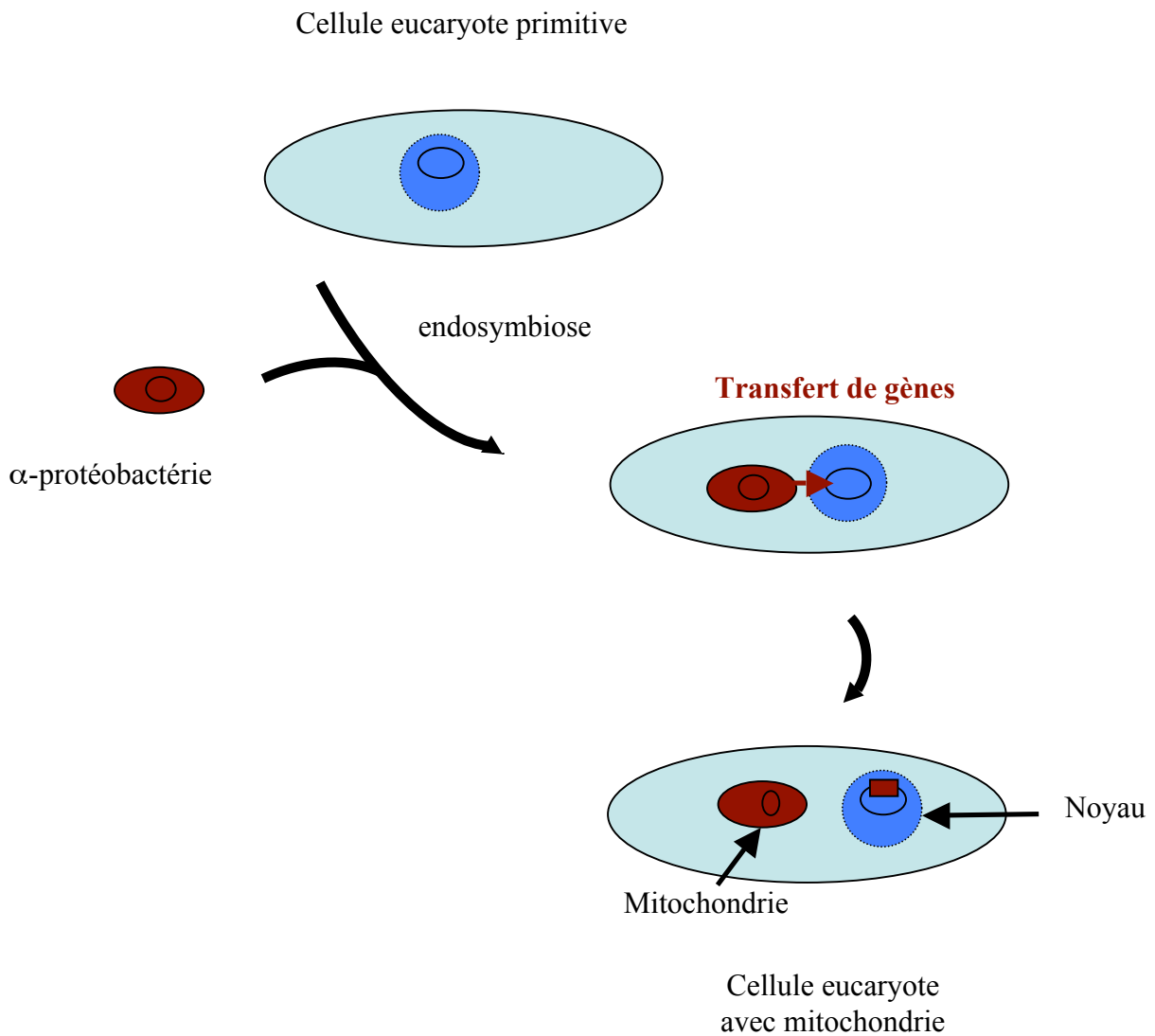


Figure 4

Représentation schématique de l'endosymbiose et du transfert de gènes

L'endosymbiose d'une α -protéobactérie par une cellule eucaryotique primitive a abouti à l'apparition des mitochondries. Elle s'est accompagnée d'un transfert de gènes de la mitochondrie vers le noyau représenté par une flèche brune.

structures subgénomiques circulaires, linéaires, en rosette ou sigma (Backert & Borner, 2000). Cette dynamique provient des événements de recombinaison homologue entre des séquences répétées plus ou moins longues présentes tout le long du génome (Bonen, 1993; Mackenzie & McIntosh, 1999).

Au cours de l'évolution, la conversion de l' α -protéobactérie en mitochondrie s'est accompagnée de la perte d'une grande partie de leurs séquences codantes provenant du génome ancestral. Ainsi, certains gènes ont totalement disparu, d'autres ont été transférés vers le noyau (Adams et al., 2002) ou bien ils ont été remplacés par d'autres gènes (Adams & Palmer, 2003) (**Figure 4**). Aujourd'hui les génomes mitochondriaux ne codent que pour un nombre restreint de macromolécules : des protéines de la chaîne respiratoire, des éléments de la machinerie traductionnelle (ARNr et ARNt), et chez les plantes supérieures et les protistes des protéines ribosomales et des protéines de la biogenèse des cytochromes c (**Tableau 1**) (Marienfeld et al., 1999). Ainsi 95-98 % des protéines nécessaires à la biogenèse mitochondriale sont codées par le noyau, synthétisées dans le cytosol puis importées dans les mitochondries *via* une machinerie d'importation (cf paragraphe I.6.1).

4. 3 Expression du génome mitochondrial de plantes

La diversité d'organisation des génomes mitochondriaux entre espèces rend l'étude de l'expression de l'ADN mitochondrial (ADNmt) spécifique de chaque génome. Aussi par souci de clarté, je vais détailler uniquement l'expression du génome mitochondrial de plante supérieure photosynthétique.

4.3.1 *Transcription, maturation et dégradation*

Chez les plantes, la transcription est initiée au niveau d'au moins une vingtaine de promoteurs sur les deux brins de l'ADNmt (Kuhn et al., 2005). Des ARN polymérases de type phagiques transcrivent la plus grande partie de l'ADNmt (Hedtke et al., 2002), même les séquences non codantes.

Produit/gène	Nombre de gènes			
	<i>A.t</i>	<i>C.r</i>	<i>H.s</i>	<i>S.c</i>
Complexes respiratoires				
Complexe I (NADH déshydrogénase)/ <i>nad</i>	9	5	7	0
Complexe II (Succinate déshydrogénase)/ <i>sdh</i>	1	0	0	0
Complexe III (Cytochrome c réductase)/ <i>cob</i>	1	1	1	1
Complexe IV (Cytochrome c oxydase)/ <i>cox</i>	3	1	3	3
Complexe V (ATP synthase)/ <i>atp</i>	5	0	2	3
Biogenèse cytochrome c				
Biogenèse des cytochromes c/ <i>ccm</i>	4	0	0	0
Traduction				
Protéines ribosomales/ <i>rps-rpl</i>	7	0	0	1
ARNr/ <i>rrn</i>	3	2	2	2
ARNt/ <i>trn</i>	21	3	22	24
Autres				
Gènes introniques (maturase)	1	1	0	0
Composante ARN de la RNase P	0	0	0	1
Total	57	13	37	35

Tableau 1

Comparaison de l'information génétique présente dans les génomes mitochondriaux

D'après Unseld *et al.*, 1997

Avec *A.t.*: *Arabidopsis thaliana*, *C.r.*: *Chlamydomonas reinhardtii*; *H.s.*: *Homo sapiens*, *S.c.*: *Saccharomyces cerevisiae*

Cette étape de transcription est suivie par des mécanismes de modifications post-transcriptionnelles nombreux et complexes chez les mitochondries de plantes. On peut distinguer la maturation des extrémités 5' et 3' des ARN (Morl & Marchfelder, 2001; Perrin et al., 2004), l'épissage des ARN messagers qui permet l'excision d'introns de groupe II (Giege & Brennicke, 2001; Li-Pook-Than & Bonen, 2006), l'édition qui consiste en des modifications de C en U (ou parfois de U en C) des ARNm et de quelques ARNt (Gualberto et al., 1989; Giege & Brennicke, 1999; Fey et al., 2001).

Le contrôle de l'abondance de chaque ARN est essentiel pour le fonctionnement correct de la cellule. Chez les mitochondries de plantes, la régulation de l'expression des gènes s'opère par des événements post-transcriptionnels. En effet, les taux de transcrits ne dépendent pas directement de la transcription mais résultent de l'équilibre entre l'activité transcriptionnelle et le contrôle de la stabilité des ARN qui s'appuie sur la polyadénylation et la dégradation des ARN (Holec et al., 2006). Ainsi, l'image que l'on peut avoir de la transcription mitochondriale végétale est celle d'un processus pour le moins permissif, c'est pourquoi on parle de transcription relâchée.

4.3.2 Traduction

La traduction dans les mitochondries de plantes reste l'étape la moins étudiée de l'expression génétique. La mitochondrie possède sa propre machinerie traductionnelle. Elle comprend : des ribosomes de 70S, une vingtaine d'aminoacyl-ARNt synthétases et des facteurs de traduction EFTu et EFTs importés depuis le cytosol (Duchene et al., 2005; Millar et al., 2005). Il n'existe pas de séquence de type Shine-Dalgarno dans les transcrits mitochondriaux et le site d'attachement du ribosome ainsi que le contrôle de la traduction sont à l'heure actuelle encore inconnus. Néanmoins, il est intéressant de noter que certains ARNm sont traduits sans codon d'initiation AUG (Unsel et al., 1997) et que la traduction peut se terminer sans codon stop, c'est par exemple le cas pour les ARNm codant les protéines nad6 et ccmC chez *Arabidopsis thaliana* et chez le chou-fleur (Raczynska et al., 2006).

Code universel	Organismes	Plantes	<i>S. cerevisiae</i>	Vertébrés
	Codons			
Arg	AGA	Arg	Arg	Stop
Arg	AGG	Arg	Arg	Stop
Ile	ATA	Ile	Met	Met
Stop	TGA	Stop	Trp	Trp
Leu	CTT	Leu	Thr	Leu
Leu	CTC	Leu	Thr	Leu
Leu	CTA	Leu	Thr	Leu
Leu	CTG	Leu	Thr	Leu
Arg	CGA	Arg	X	Arg
Arg	CGC	Arg	X	Arg
Stop	TAA	Stop	Stop	Stop
Stop	TAG	Stop	Stop	Stop

Tableau 2

Correspondance entre codons et acides aminés chez les mitochondries de plantes, de *S. cerevisiae* et de vertébrés et pour le code universel (en rouge)

Avec X=pas d'acide aminé correspondant

4.3.3 Particularité du code génétique mitochondrial

A l'exception des mitochondries végétales qui utilisent le code génétique universel, le code génétique utilisé par les mitochondries des animaux, des champignons ou des protozoaires n'est pas identique au code génétique universel (**Tableau 2**). De plus, d'un organisme à l'autre, le code génétique mitochondrial peut varier. Ainsi, le codon TGA qui correspond dans le cytosol, dans les mitochondries de plantes et chez la levure *S. cerevisiae* à un codon stop, code pour l'acide aminé tryptophane dans la matrice mitochondriale de mammifères. De même, le codon AGA qui correspond à l'arginine dans les mitochondries de plantes et de la levure *S. cerevisiae* correspond à un codon stop dans les mitochondries de mammifères (Söll, 1995).

5 Le protéome mitochondrial

Au vu du rôle essentiel de la mitochondrie, le protéome mitochondrial a été au cœur de nombreuses recherches depuis plusieurs années. Pour estimer le protéome mitochondrial, deux approches ont principalement été utilisées.

Tout d'abord, les protéines peuvent être prédites comme étant localisées dans la mitochondrie grâce à des logiciels de prédiction. Il en existe un certain nombre disponibles sur Internet. Prenons l'exemple de « Predotar » (<http://urgi.versailles.inra.fr/predotar>) (Small et al., 2004). Ce logiciel utilise des réseaux neuronaux qui se basent sur les séquences d'adressage situées à l'extrémité N-terminale des protéines cytosoliques connues pour être adressées vers la mitochondrie. Bien qu'il ait été couramment utilisé pour les prédictions de localisation des protéines, ce logiciel souffre de certaines limitations. En effet, il ne prédit pas les protéines cytosoliques adressées vers la mitochondrie si leur signal d'adressage est interne ou si la séquence d'adressage N-terminale possède moins de 60 acides aminés. Le même résultat est obtenu si les protéines ne possèdent pas de méthionine initiatrice tout comme celles qui utilisent des voies d'importation non classiques telles que les protéines destinées aux membranes ou à l'espace inter-membranaire. La seconde stratégie est l'analyse protéomique qui consiste à fractionner les protéines mitochondriales par électrophorèse sur des gels bidimensionnels par exemple. Après extraction des protéines du gel, elles sont

Répartition du protéome

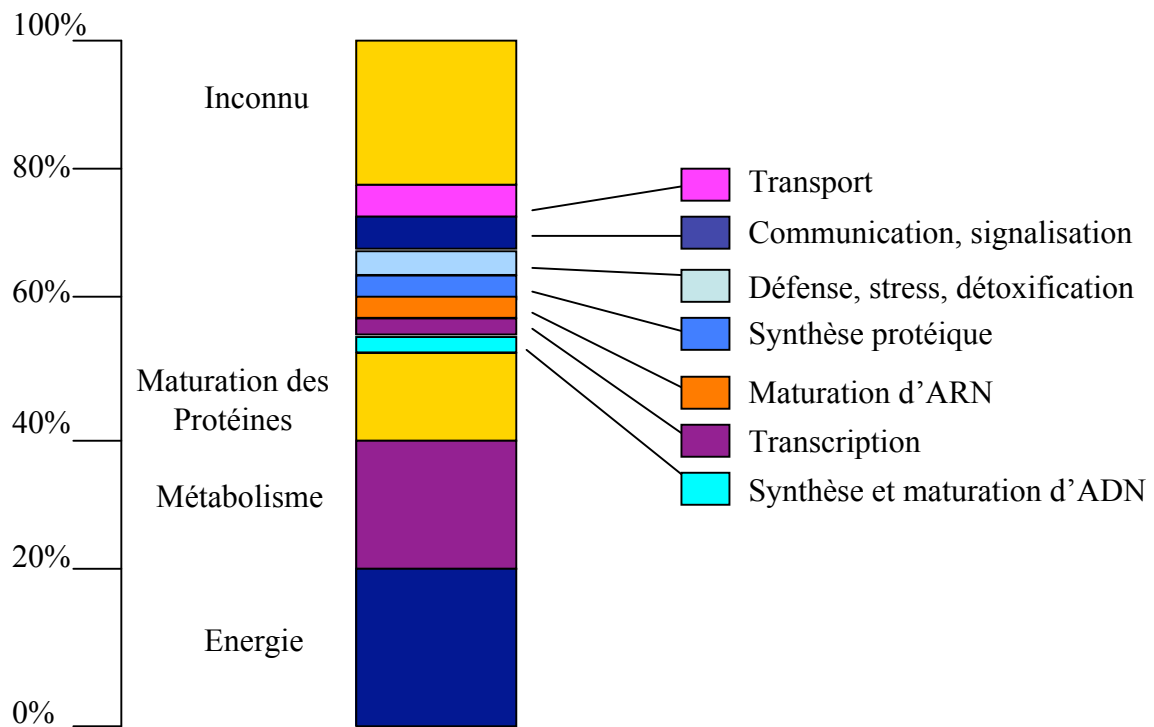


Figure 5
Répartition du protéome mitochondrial végétal suivant les fonctions protéiques
D'après Millar et al., 2005

digérées en peptides puis soumises à une analyse par spectrométrie de masse. Cette technologie permet de repérer dans les banques de données protéiques la protéine dont sont issus les peptides à partir de leur masse ou de leur séquence. Cette approche a néanmoins des limitations intrinsèques. En effet, la résolution des gels qui souvent ne permet pas de détecter et d'identifier toutes les protéines présentes dans un échantillon (Gygi & Aebersold, 2000). De plus, les gels étant limités en pI et en PM, il est difficile de détecter les protéines n'ayant pas ces caractéristiques.

Ces deux approches ont permis d'apporter des renseignements précieux au cours de ces dix dernières années. En effet, le protéome mitochondrial s'est révélé ne pas être statique mais il peut changer suivant les rôles joués par la mitochondrie dans les différents tissus et aux différents stades de développement de la plante ou encore en réponse à différents facteurs environnementaux. La taille du protéome mitochondrial est estimée à 1500 chez l'Homme (Andreoli et al., 2004), 800 chez les levures (Andreoli et al., 2004) et à environ 3000 chez les plantes (Richly et al., 2003). Plus de 400 protéines ont pu être identifiées chez les plantes (Millar et al., 2005) et une étude réalisée chez *Arabidopsis thaliana* montre que près de 20% des protéines identifiées ne présentent des similarités avec aucune des protéines connues à ce jour (**Figure 5**) (Heazlewood et al., 2004). Il est donc suggéré que de nouvelles fonctions ou de nouveaux mécanismes puissent entrer en jeu pour réguler le métabolisme mitochondrial.

5.1 Les protéines membranaires

En raison de leur localisation spécifique à l'interface entre le cytosol et la matrice mitochondriale, les protéines des membranes mitochondriales peuvent assurer des fonctions extrêmement variées (**Figure 6**).

5.1.1 Les protéines de la membrane externe mitochondriale

Au niveau de la membrane externe, le transport de métabolites ou de macromolécules depuis le cytosol vers la mitochondrie fait intervenir plusieurs protéines. Les protéines de la famille VDAC sont les protéines majoritaires de cette membrane. Ces protéines forment des canaux au sein de la membrane externe pour le passage de métabolites tels que le pyruvate,

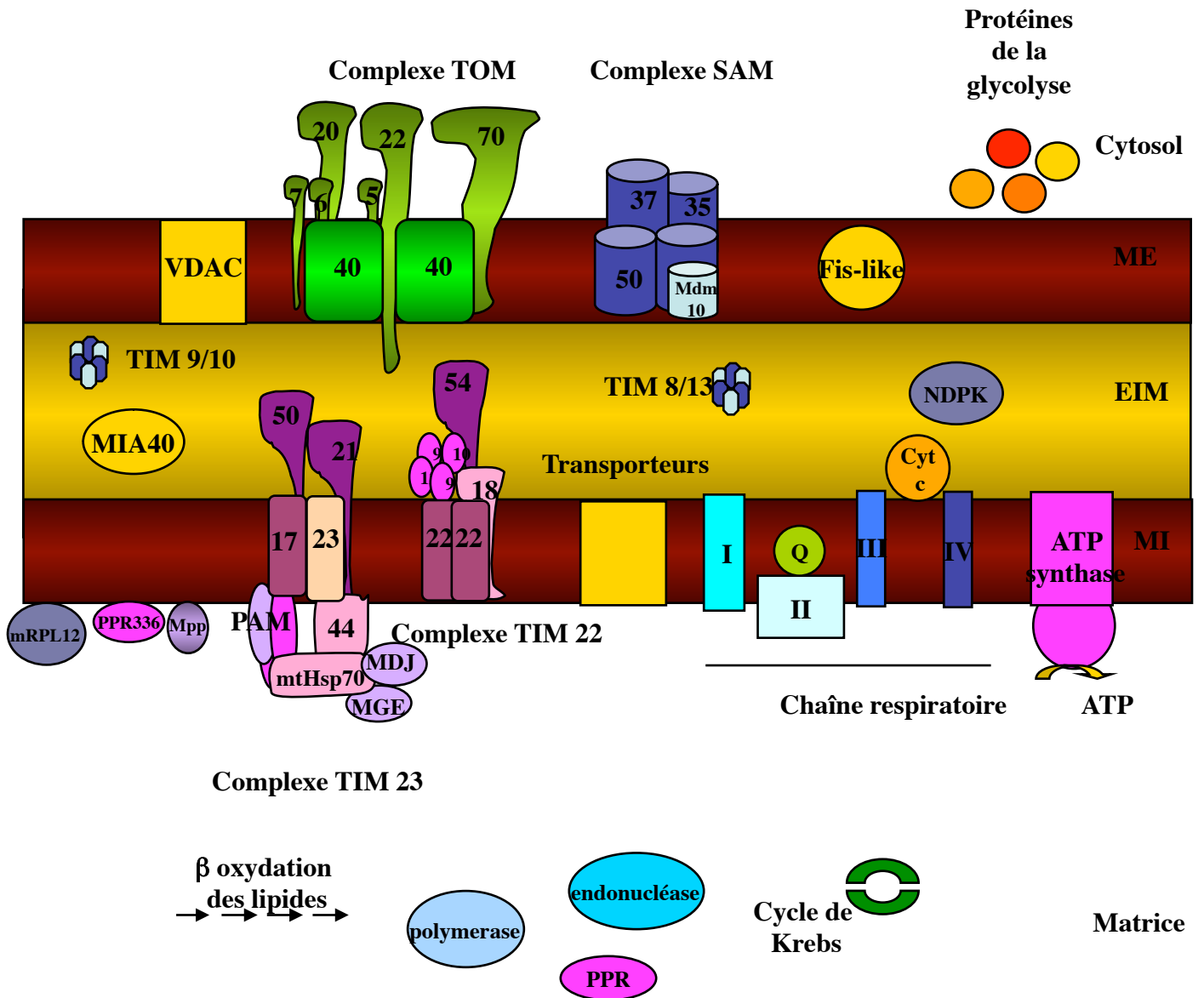


Figure 6

Quelques protéines constituant le protéome mitochondrial

TOM=translocase of the outer membrane, TIM=translocase of the inner membrane, Mpp=mitochondrial processing peptidase, mtHsp70, matrix heat shock protein 70; PAM= presequence translocase-associated motor, VDAC=voltage dependent anion channel, SAM=sorting and assembly machinery, MIA=mitochondrial intermembrane space import and assembly, ME=membrane externe, EIM=espace inter-membranaire, MI= membrane interne

l'ATP ou le succinate. Ces protéines peuvent assurer différents rôles. Par exemple, elles peuvent intervenir dans le transport des ARNt (Salinas et al., 2006), d'ADN (Koulintchenko et al., 2003; Koulintchenko et al., 2006; Weber-Lotfi et al., 2009) ainsi que dans l'apoptose en permettant le relargage du cytochrome c depuis l'espace inter-membranaire vers le cytosol (Godbole et al., 2003). Nos connaissances sur cette famille de protéines seront plus spécifiquement développées dans la partie III de l'Introduction.

Dans cette membrane externe, se trouve aussi le complexe TOM qui assure le passage vers la mitochondrie des protéines précurseurs mitochondriales codées par le génome nucléaire. Ce complexe a été initialement étudié chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* et le champignon *Neurospora crassa*. Le cœur de ce complexe constitue le « GIP » pour « General Import Pore » composé des protéines TOM40, TOM5, TOM6 et TOM7. Trois protéines sont associées à ce GIP : TOM20, TOM22 et TOM70. Elles constituent les récepteurs pour les précurseurs protéiques destinés aux mitochondries (Perry et al., 2008).

Opérant en concert avec le complexe TOM, le complexe SAM (« Sorting and Assembly Machinery ») aussi appelé complexe TOB (« Topogenesis of mitochondria Outer membrane β -Barrel proteins ») a également été initialement étudié chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* et le champignon *Neurospora crassa*. Il assure l'insertion et le repliement des protéines précurseurs au sein de la membrane externe mitochondriale après leur importation *via* le complexe TOM. Ce complexe est constitué des protéines SAM50 (TOB55), SAM35 (TOB38), SAM37 et MDM10 (Lister et al., 2007).

Ces complexes d'importation sont conservés chez l'ensemble des eucaryotes. Cependant, il existe quelques différences dans la composition des complexes que je vais détailler au paragraphe 6.1.3 de la partie I de l'Introduction.

5.1.2 Les protéines de la membrane interne mitochondriale

Au niveau de la membrane interne se trouvent les quatre complexes de la chaîne respiratoire. Ces complexes sont impliqués dans le transfert d'électrons (électrons provenant de l'oxydation des cofacteurs NADH et FADH₂ intervenant dans le cycle de Krebs par exemple) qui dans trois cas est couplé à la translocation de protons à travers la membrane

interne mitochondriale. Le gradient de protons est alors utilisé pour la production d'ATP par un autre complexe : l'ATP synthase. L'organisation de ces ensembles protéiques au sein de la membrane est complexe. En effet, les complexes I, III et IV interagissent pour former des supercomplexes (Boekema & Braun, 2007). Cette interaction est dynamique et dépend de l'état physiologique de la cellule (Dudkina et al., 2008). Plusieurs hypothèses ont été avancées pour tenter de justifier la présence de ces supercomplexes. En effet, ils pourraient augmenter le taux d'électrons transférés, représenter des unités de régulation de la respiration ou augmenter la stabilité des complexes (Boekema & Braun, 2007).

A côté de son rôle dans la respiration cellulaire, les mitochondries maintiennent la communication métabolique avec le cytosol grâce à une famille de protéines localisées au niveau des membranes mitochondriales internes. Il s'agit des transporteurs (Picault et al., 2004). Quelques exemples de ces transporteurs sont le transporteur UCP (« uncoupling protein »), DTC (« dicarboxylate-tricarboxylate carrier »), BAC (« basic amino acid carrier »), SFC (« succinate-fumarate carrier »), PiC (« phosphate carrier »), AAC (« ADP/ATP carrier »). De plus, se trouvent à ce niveau les protéines OXA1 qui permettent l'insertion des complexes respiratoires au sein de la membrane interne (Preuss et al., 2005). Enfin, deux complexes TIM sont présents dans cette membrane. Ils sont impliqués dans l'importation des protéines précurseurs mitochondriales. Tout d'abord le complexe TIM23 impliqué dans la translocation des protéines précurseurs possédant un signal d'adressage à l'extrémité N-terminale et destinées à la matrice mitochondriale. Chez la levure, le cœur de ce complexe est constitué des protéines TIM23, TIM17, et TIM50. Deux protéines sont associées à ce cœur : la protéine TIM 21 dans la membrane interne et le moteur moléculaire PAM du côté matriciel. Le deuxième complexe est le complexe TIM22 impliqué dans la translocation vers la membrane interne des protéines précurseurs possédant plusieurs segments transmembranaires. Ce complexe peut être divisé en deux parties : une première incluse dans la membrane constituée des protéines TIM54, TIM22 et TIM18 et une seconde partie exposée vers l'espace inter-membranaire constituée des protéines Tim12, Tim10, et Tim9 (Wagner et al., 2008).

Enfin, au sein de deux membranes mitochondriales, sont localisées des protéines intervenant dans la morphologie, la dynamique et la division des mitochondries comme par exemple, les protéines Fis-like au sein de la membrane externe (Logan, 2006).

5.1.3 Les protéines associées aux membranes mitochondriales

Le protéome mitochondrial végétale peut être enrichi par l'association de protéines solubles du côté cytosolique ou matriciel (**Figure 6**). En effet, des études récentes ont montré que des protéines cytosoliques étaient associées aux mitochondries au niveau de la membrane externe. Ainsi sur les 10 protéines intervenant dans la glycolyse cytosolique, sept protéines ont été retrouvées dans les fractions mitochondriales (Giege et al., 2003). Il semble que la glycolyse soit d'ailleurs intimement liée à la face cytosolique de la membrane externe de la mitochondrie. Une des hypothèses pour expliquer cette promiscuité serait qu'elle permettrait de mettre à disposition le pyruvate à la mitochondrie plus facilement. Cette association a été décrite comme dynamique car elle s'adapte au taux respiratoire de la cellule. En effet, lorsque la respiration est stimulée on observe une augmentation de l'association entre les enzymes de la glycolyse et la mitochondrie et inversement (Graham et al., 2007).

Du côté matriciel, des protéines sont associées à la membrane interne. Par exemple la protéine MPP (« mitochondrial processing peptidase ») qui clive la séquence d'adressage des protéines précurseurs importées au sein de la mitochondrie (Duchene et al., 2009), les protéines ribosomales telles que mRPL12 (Delage et al., 2007), les protéines impliquées dans la réplication et la transcription du chromosome actif mitochondrial (Fey et al., 1999) et la protéine PPR336 qui semble intervenir dans la traduction mitochondriale (Uyttewaal et al., 2008).

5.2 Les protéines solubles

Dans l'espace inter-membranaire (**Figure 6**), on retrouve entre autre le cytochrome c intervenant dans le transfert d'électrons et la mort cellulaire, la protéine NDPK (« nucleoside diphosphate kinase ») qui possède une activité nucléasique (Hammargren et al., 2007), les petites protéines TIM9/10 et TIM8/13 intervenant dans le transport des protéines (Lister et al., 2005) ainsi que la machinerie MIA (« Mitochondria inter-membrane space import and assembly ») impliquée dans l'importation des protéines destinées à l'espace inter-

membranaire (Gabriel et al., 2007). Son constituant majeur est la protéine MIA40 (Stojanovski et al., 2008).

Dans l'espace matriciel, les protéines assurent différentes fonctions comme la synthèse d'ARN et d'ADN, la maturation d'ARN, les voies de biosynthèses, etc. C'est dans cet espace que se trouvent par exemple les polymérase, les endo- et exonucléases et les enzymes de synthèse des acides aminés, des vitamines, etc. (Alberts, 1994). Nous retrouvons également les protéines de la famille PPR (Pentatricopeptide Repeat) (Schmitz-Linneweber & Small, 2008). Ces protéines sont capables de lier l'ARN. Elles sont particulièrement présentes chez les plantes terrestres. En effet, les protéines PPR sont estimées à 450 chez *Arabidopsis thaliana* et 477 chez *Oryza sativa*. Ces protéines comprennent une succession de 2 à 26 motifs PPR répétés en tandem. En moyenne 12 motifs sont retrouvés sur ces protéines. Le motif PPR est une séquence dégénérée constituée de 35 acides aminés riche en tyrosines. Bien que cette famille de protéines ait été découverte, il y a 8 ans, il est aujourd'hui admis que ces protéines interviennent dans différentes fonctions post-transcriptionnelles au sein des mitochondries comme par exemple l'édition (Kotera et al., 2005; Okuda et al., 2007), l'épissage (de Longevialle et al., 2007) et la traduction des ARN (Uyttewaal et al., 2008). Par exemple, le gène *otp43* code pour une protéine PPR mitochondriale impliquée dans l'épissage du premier intron du transcrit *nad1* codant pour la sous-unité NAD1 du complexe I de la chaîne respiratoire (de Longevialle et al., 2007). Un autre exemple est celui de la protéine PPR336 qui est associée à la membrane interne mitochondriale et plus particulièrement aux ribosomes mitochondriaux. Cette protéine pourrait intervenir dans la traduction mitochondriales chez les végétaux (Uyttewaal et al., 2008). Un autre rôle assuré par les protéines PPR est celui de restaurateur de fertilité. En effet, il a été démontré que plusieurs protéines PPR pouvaient restaurer la fertilité des plantes lorsque celles-ci souffrent de dysfonctionnements (Bentolila et al., 2002; Desloire et al., 2003).

6 Importation de macromolécules depuis le cytosol

Comme écrit précédemment, les génomes mitochondriaux peuvent ne pas renfermer un ensemble suffisant de gènes d'ARNt et de protéines. Ainsi pour pallier cette déficience, les mitochondries importent du cytosol des ARNt et des protéines codés par le génome nucléaire.

6.1 Importation de protéines

La quasi-totalité (95-98%) des protéines nécessaires au fonctionnement des mitochondries est codée par le génome nucléaire, synthétisée dans le cytosol puis importée dans les mitochondries *via* un système spécifique.

La majorité des études du mécanisme d'importation a été réalisée chez la levure *S. cerevisiae* (Bolender et al., 2008). Ce système est considéré comme similaire chez les champignons et les animaux mais présente quelques différences avec le système d'importation des protéines chez les plantes (cf paragraphe I.6.1.3) (Lister et al., 2007).

Le mécanisme d'importation des protéines va dépendre de la destination finale de celles-ci. Nous pouvons séparer les protéines en deux catégories : les protéines mitochondriales précurseurs qui possèdent une séquence d'adressage à l'extrémité N-terminale et celles qui n'en possèdent pas. Dans la première catégorie se trouvent les protéines matricielles ainsi que des protéines de la membrane interne, dans la deuxième catégorie se trouvent les protéines de la membrane externe, de l'espace inter-membranaire et certaines de la membrane interne.

6.1.1 Protéines avec une séquence d'adressage mitochondriale à l'extrémité N-terminale

Chez la levure, le système fait intervenir le complexe TOM au niveau de la membrane externe et le complexe TIM au niveau de la membrane interne (**Figure 7**). Pour être reconnues par ce système, les protéines précurseurs destinées à la matrice mitochondriale et à la membrane interne possèdent une séquence d'adressage située du côté N-terminal. Cette

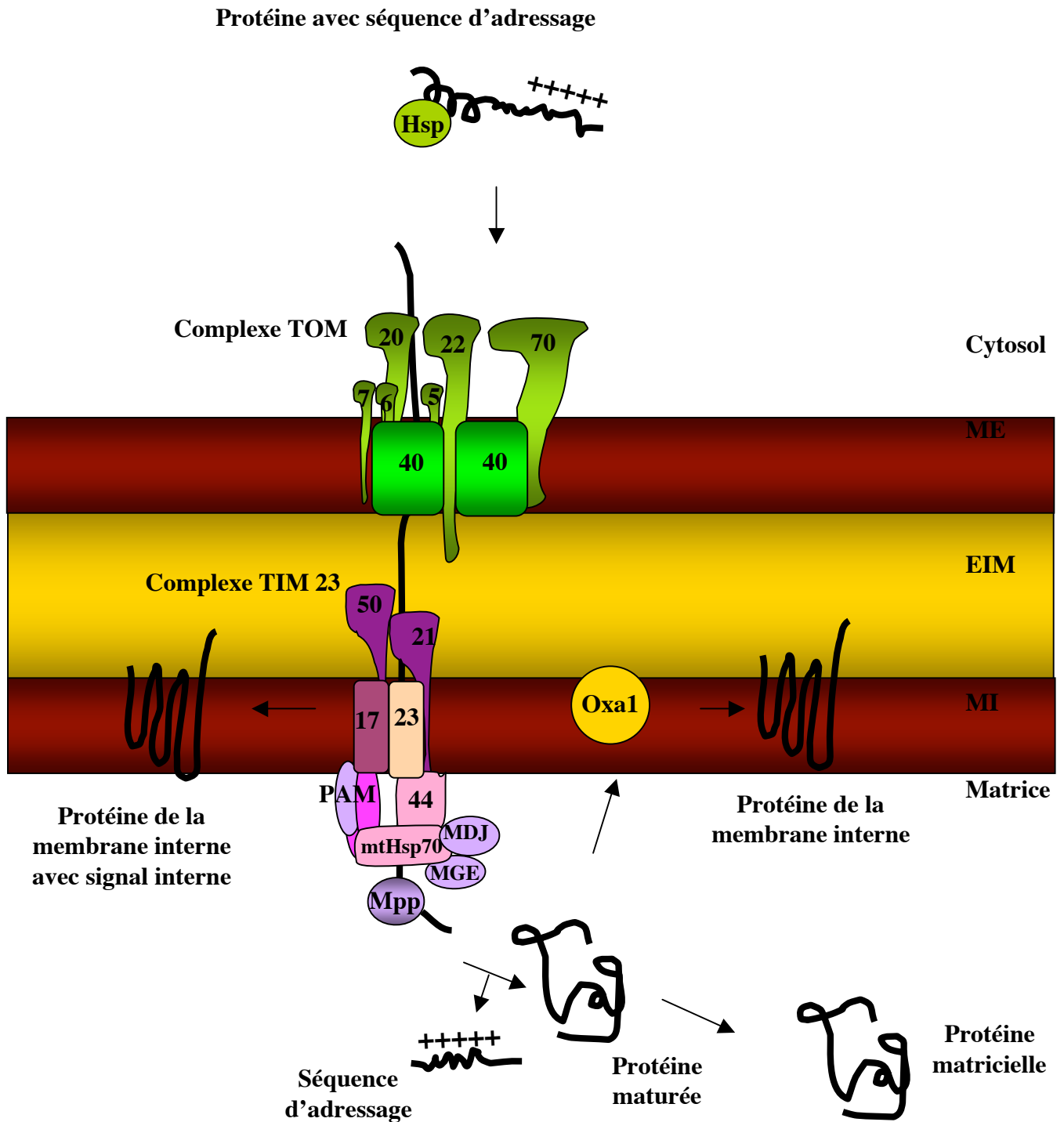


Figure 7

Machinerie d'importation des protéines avec séquence d'adressage N-terminale dans la mitochondrie de levure

TOM=translocase of the outer membrane, TIM=translocase of the inner membrane, Mpp=mitochondrial processing peptidase, mtHsp70, matrix heat shock protein 70, PAM= presequence translocase-associated motor, ME=membrane externe, EIM=espace inter-membranaire, MI= membrane interne

D'après Bolender et al., 2008

séquence, riche en résidus hydrophobes et hydroxylés, a la capacité de former une hélice amphiphile, supposée interagir de façon spécifique avec les récepteurs situés à la surface des membranes mitochondriales (Zhang & Glaser, 2002). Elle sera éliminée par une MPP (« Mitochondrial Processing Peptidase »).

Pour être importée, la protéine précurseur est d'abord prise en charge par des protéines chaperonnes cytosoliques de type Hsp (« Heat shock protein ») qui vont l'adresser à la surface de la mitochondrie et la déstructurer. Ensuite, elle est reconnue par le récepteur TOM20 et traverse la membrane externe *via* la protéine TOM40. Les protéines TOM40 appartiennent à la famille des porines, elles forment des tonneaux β en trois dimensions permettant le passage de molécules. Une fois dans l'espace inter-membranaire, la protéine précurseur traverse la membrane interne *via* le canal constitué des protéines TIM17 et TIM23 puis est tirée par l'action concertée de la protéine TIM44 et de la protéine Hsp70 mitochondriale vers la matrice mitochondriale. Cette protéine Hsp70 va permettre de maintenir la protéine déstructurée avec l'aide de chaperonnes MGE et MDJ afin que la séquence d'adressage soit clivée grâce à une peptidase mitochondriale MPP, qui chez les plantes est accrochée à la membrane interne (Braun & Schmitz, 1999; Zhang & Glaser, 2002). 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. Dans l'autre cas, les protéines sont constituées de domaines transmembranaires. Amenées jusqu'à la matrice mitochondriale, les séquences d'adressage sont clivées et les protéines matures sont prises en charge par le complexe Oxa1 qui permet leur insertion dans la membrane interne (Yi & Dalbey, 2005).

6.1.2 Protéines sans séquence d'adressage mitochondriale à l'extrémité N-terminale

Dans cette catégorie se trouvent les protéines de la membrane externe, de l'espace inter-membranaire et certaines protéines de la membrane interne. Chez la levure, les protéines sans séquence d'adressage traversent la membrane externe grâce au complexe TOM. Arrivées dans l'espace inter-membranaire, trois systèmes existent (**Figure 8**) :

-le premier concerne les protéines destinées à la membrane externe souvent riches en

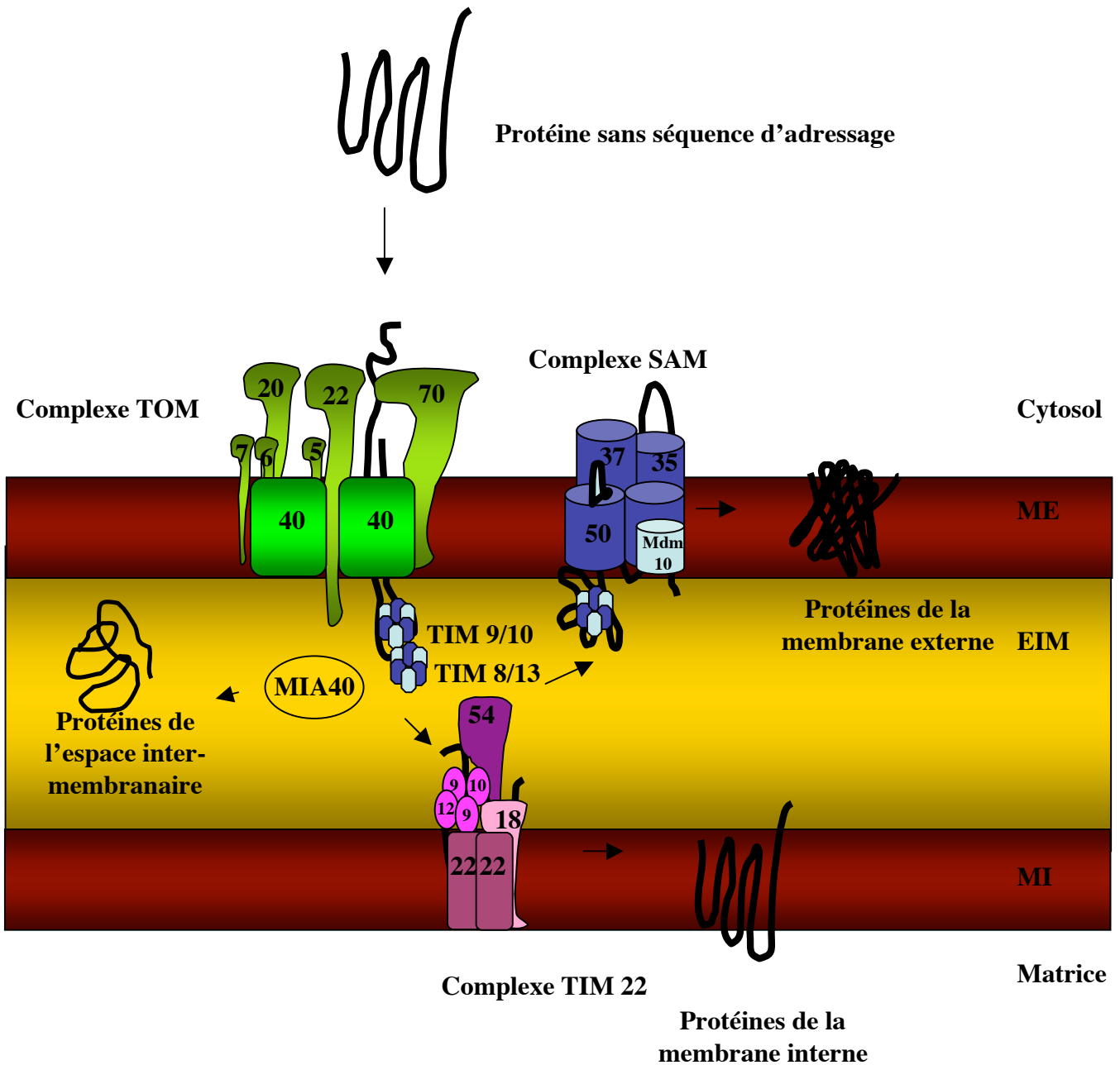


Figure 8

Machinerie d'importation des protéines sans séquence d'adressage N-terminale dans la mitochondrie de levure

TOM=translocase of the outer membrane, TIM=translocase of the inner membrane, SAM= sorting and assembly machinery, MIA=mitochondrial intermembrane space import and assembly, ME=membrane externe, EIM=espace inter-membranaire, MI= membrane interne

D'après Bolender et al., 2008

tonneaux (porine, Mdm10). La protéine précurseur est prise en charge par les complexes formés par les chaperonnes TIM9/TIM10 et TIM8/TIM13. Ils la guident jusqu'au complexe SAM (« Sorting and Assembly Machinery ») présent dans la membrane externe, qui permet la réinsertion et le repliement de la protéine dans la membrane externe (Lister et al., 2005).

-le second système concerne les protéines destinées à l'espace inter-membranaire. Un complexe d'importation leur est spécifique. Ainsi, après leur passage au travers du complexe TOM, les protéines se lient à la protéine MIA40, constituant majeur du complexe MIA, qui va leur permettre d'adopter un repliement correct (Stojanovski et al., 2008).

-le dernier système concerne les protéines destinées à la membrane interne. Ces protéines contiennent de nombreux domaines transmembranaires, comme le transporteur de phosphate, ou le transporteur d'ATP. Un signal est localisé dans la partie interne de la protéine précurseur. Il guide le précurseur vers le récepteur TOM70 situé à la surface de la membrane externe des mitochondries. Les protéines suivent ensuite la voie classique d'importation. Au niveau de l'espace inter-membranaire, elles sont prises en charge par un complexe de petites chaperonnes formé par les protéines TIM9/10 et TIM8/13, avant d'être incorporées au complexe TIM22 qui permet l'insertion du précurseur dans la membrane interne (Lister et al., 2005).

Il est à noter que l'importation des protéines peut être co-translationnelle chez les levures (Ahmed et al., 2006; Yogev et al., 2007). C'est, par exemple, le cas pour la fumarase. Cette protéine est importée vers la mitochondrie en même temps qu'elle est traduite. Cette importation co-translationnelle permet d'adresser la fumarase à la mitochondrie sans qu'elle soit dégradée (Yogev et al., 2007). En effet, cette protéine ne peut être importée après sa traduction car elle est exposée dans le cytosol à la protéase TEV.

6.1.3 Différences avec les plantes

L'analyse du mécanisme d'importation des protéines mitochondriales a été principalement réalisée chez la levure *S. cerevisiae*. Les systèmes d'importation chez les plantes sont considérés comme similaires (**Tableau 3**). Par exemple, pour le complexe TOM,

PROTÉINES	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	PROTÉINES	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
MDM10		sc-MDM10	TIM44	<i>at-TIM44-2</i>	
MGE1	at-MGE1	sc-MGE1	TIM50	<i>at-TIM50</i>	sc-TIM50
MIA40	at-MIA40	sc-MIA40	TIM54		sc-TIM54
MPP ALPHA	at-MPP-ALPHA-1	sc-MAS1	TIM8	<i>at-TIM8</i>	sc-TIM8
MPP ALPHA	at-MPP-ALPHA-2		TIM9	<i>at-TIM9</i>	sc-TIM9
MPP BETA	at-MPP-BETA	sc-MAS2	TOM20	<i>at-TOM20-1</i>	sc-TOM20
TIM10	at-TIM10	sc-TIM10	TOM20	<i>at-TOM20-2</i>	
TIM12		sc-TIM12	TOM20	<i>at-TOM20-3</i>	
TIM13	at-TIM13	sc-TIM13	TOM20	<i>at-TOM20-4</i>	
TIM17	at-TIM17-1	sc-TIM17	TOM22	<i>at-TOM9-1</i>	sc-TOM22
TIM17	at-TIM17-2		TOM22	<i>at-TOM9-1</i>	
TIM17	at-TIM17-3		TOM40	<i>at-TOM40-1</i>	sc-TOM40
TIM18		sc-TIM18	TOM40	<i>at-TOM40-2</i>	
TIM21	at-TIM21	sc-TIM21	TOM5	<i>at-TOM5</i>	sc-TOM5
TIM22	at-TIM22-1	sc-TIM22	TOM6	<i>at-TOM6</i>	sc-TOM2
TIM22	at-TIM22-2		TOM7	<i>at-TOM7-1</i>	sc-TOM7
TIM22	at-TIM22-3		TOM7	<i>at-TOM7-2</i>	
TIM23	<i>at-TIM23-1</i>	sc-TIM23	TOM70		sc-TOM70
TIM23	<i>at-TIM23-2</i>		TOM72		sc-TOM72
TIM23	<i>at-TIM23-3</i>				
TIM44	<i>at-TIM44-1</i>	sc-TIM44			

Tableau 3

Comparaison des protéines de la machinerie d'importation des protéines dans les mitochondries d'*A. thaliana* et de *S. cerevisiae*

MPP= mitochondrial processing peptidase, MGE=mitochondrial GrpE , MDM=mitochondrial distribution and maintenance ,TOM=translocase of the outer membrane, TIM=translocase of the inner membrane, MIA=mitochondrial intermembrane space import and assembly , at= *Arabidopsis thaliana*, sc= *Saccharomyces cerevisiae*

D'après <http://www.plantenergy.uwa.edu.au/applications/mpric/index.php>

les homologues suivants ont été identifiés chez *Arabidopsis thaliana* (Perry et al., 2006):

- les protéines TOM5, TOM6, TOM7 ont des homologues du même nom
- trois homologues pour la protéine TOM20, nommés TOM20-2 à TOM20-4 (le gène d'une quatrième TOM20-1 a été identifié, cependant la protéine ne semble pas être exprimée)
- deux protéines homologues de la protéine TOM22 ont été identifiées, il s'agit des protéines TOM9-1 et TOM9-2
- deux protéines homologues de la protéine TOM40 ont été identifiées (cependant seule une protéine semble être exprimée).

Par contre il existe quelques différences :

- pour les protéines récepteurs TOM70, il semble qu'il n'existe pas d'homologue chez les plantes. Néanmoins, une protéine pourrait assurer cette fonction de transport des protéines au sein des mitochondries végétales : il s'agit de la protéine mtOM64 (Lister et al., 2007).
- pour le complexe SAM, seule la protéine SAM50 a été clairement identifiée par similarité de séquence (Lister et al., 2005). Néanmoins et de manière intéressante, la protéine METAXIN a été identifiée chez *Arabidopsis thaliana* par similarité de séquence avec la protéine METAXINE1 humaine. Cette protéine est impliquée, chez l'Homme, avec la protéine METAXINE2 dans l'importation des protéines formant des tonneaux β . La protéine METAXIN d'*Arabidopsis thaliana* pourrait donc assurer la fonction du complexe SAM (Kozjak-Pavlovic et al., 2007).

6.2 Importation d'acides nucléiques

6.2.1 Importation d'ARNt

Comme écrit précédemment, les génomes mitochondriaux peuvent ne pas coder pour un ensemble suffisant d'ARNt. Ainsi, pour pallier ce manque les mitochondries vont importer depuis le cytosol des ARNt codés par le génome nucléaire. Ce mécanisme d'importation d'ARNt cytosoliques dans la mitochondrie sera décrit plus en détail dans le chapitre suivant de l'Introduction (II).

6.2.2 Importation d'autres acides nucléiques

D'autres ARN ont été démontrés comme étant importés dans les mitochondries. Par exemple, l'ARN 5S chez l'homme (Entelis et al., 2001) et le composant ribonucléique de la MRP (« Mitochondrial RNA Processing ») chez la souris (Chang & Clayton, 1989). Toutefois, leur présence au sein de la mitochondrie reste sujet à controverse (Tarassov et al., 2007).

L'importation *in vitro* d'ADN dans les mitochondries a été démontrée chez les plantes (Koulintchenko et al., 2003), les mammifères (Koulintchenko et al., 2006) et la levure *S. cerevisiae* (Weber-Lotfi et al., 2009). Ces mécanismes feraient intervenir les protéines VDAC au niveau de la membrane externe et les protéines ANT au niveau de la membrane interne en constituant un complexe proche du PTP (Koulintchenko et al., 2003; Weber-Lotfi et al., 2009).

7 Dysfonctionnements mitochondriaux

La mitochondrie assure des fonctions primordiales au sein des cellules eucaryotes (siège de la respiration, production d'énergie, biosynthèse de métabolites, apoptose). Son dysfonctionnement engendre des répercussions néfastes sur le fonctionnement cellulaire. En effet, y sont associés chez les plantes la stérilité mâle cytoplasmique (SMC, caractère qui pour autant est utilisé positivement par les agronomes), et chez l'Homme les défauts de respiration, les maladies neurodégénératives et musculaires, le cancer, le diabète ou encore le vieillissement:

-La SMC a été observée chez plus de 50 espèces végétales dont les céréales à grande importance économique, telles que le maïs, le sorgho, le tournesol (Komori et al., 2004). La stérilité mâle cytoplasmique est due à la délétion ou à l'addition de gènes dans le génome mitochondrial grâce à sa grande capacité de recombinaison. Plusieurs phénotypes peuvent être associés à ces mutations. Par exemple, dans certains types de SMC, les plantes ont tendance à

développer des fleurs à mutations homéotiques (Fujii & Toriyama, 2008), dans d'autres types, les plantes présentent un dysfonctionnement ou une absence de pollen (Hanson, 1991).

-Chez l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii*, trois mutants (dum20, dum25 et dn26) touchant l'activité du complexe I de la chaîne respiratoire présentent des retards de croissance dans le noir (Remacle et al., 2001).

-Chez l'humain, les maladies mitochondriales forment un groupe croissant d'affections multiformes sévères et aux causes génétiques multiples. La grande majorité est répertoriée sur le site <http://www.mitomap.org/>. Plus de la moitié des mutations mitochondriales se situent au niveau des gènes d'ARNt alors que ceux-ci ne représentent que 10% de l'ADNmt (Florentz et al., 2003; Levinger et al., 2004). Les maladies les plus connues qui y sont associées sont par exemple les syndromes épileptiques MELAS (« Mitochondrial myopathy, Encephalopathy, Lactic Acidosis and Stroke-like episodes ») ou MERRF (« Myoclonus Epilepsy associated with Ragged Red Fibers ») associés aux mutations des gènes codant respectivement pour les ARNt^{Leu} et ARNt^{Lys} (Kirino & Suzuki, 2005; Taylor & Turnbull, 2005).

-Un autre aspect important où les mitochondries semblent impliquer concerne le vieillissement. Depuis de nombreuses années, les liens existant entre les mutations accidentelles accumulées dans l'ADN des mitochondries et le vieillissement de l'organisme étaient connus, mais ce n'est qu'en 2004 qu'une équipe de l'institut Karolinska, en Suède, a prouvé pour la première fois le rôle des mitochondries dans le vieillissement de l'organisme (Trifunovic et al., 2004). En relation avec la sénescence, il est maintenant établi qu'un certain nombre de cancers sont directement associés à une accumulation de mutations dans l'ADN mitochondrial (Kujoth et al., 2006a; Kujoth et al., 2006b).

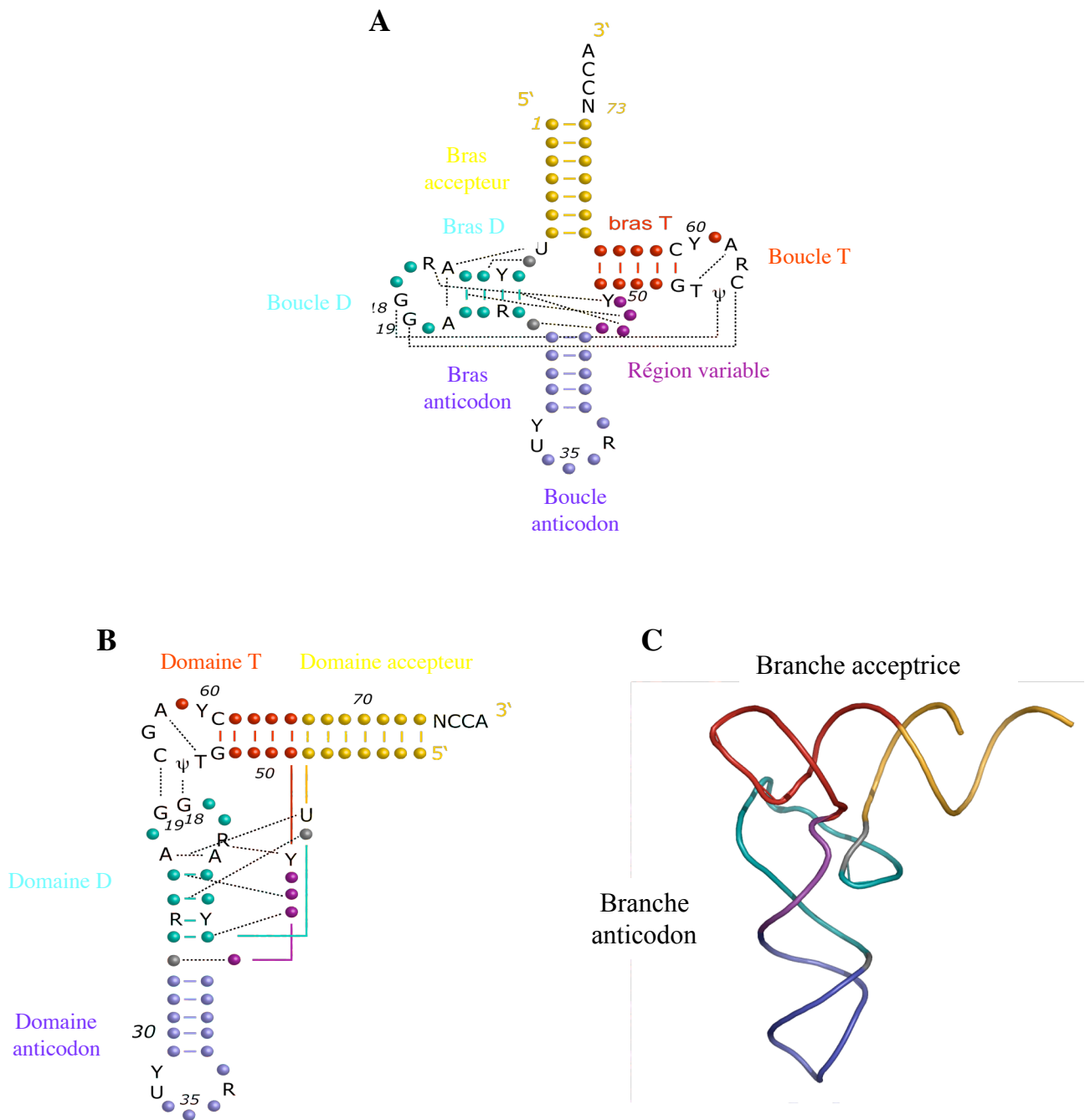


Figure 9

Représentations schématiques d'un ARNt

A Structure secondaire en feuille de trèfle

B Représentation des appariements impliqués dans le repliement spatial de l'ARNt

C Structure tertiaire en forme de « L »

N : nucléotide, Y: pyrimidine, R : purine, A : adénosine, C: cytosine, G : guanosine, T : thymidine, U : uridine, Ψ : pseudo-uridine

D'après Agris, 2004

II Importation d'ARNt cytosoliques dans les mitochondries

1 Les ARNt

1.1 Structure

Les ARNt sont des petites molécules d'ARN monocaténaire de 50 à 95 nucléotides chargés négativement (**Figure 9**, pour revue voir (Giege, 2008)). Ils sont à l'interface entre l'information génétique portée par l'ARN messager et son expression en protéine, ce qui leur vaut le terme d'adaptateurs. Ces molécules sont relativement bien conservées en termes de taille et de structure.

La plupart des ARNt ont une structure canonique conservée chez toutes les espèces. Ils se replient par des appariements intramoléculaires pour former une structure secondaire à quatre tiges ou bras, appelée « feuille de trèfle ». Ainsi on distingue généralement cinq domaines au sein des ARNt :

- le domaine accepteur qui comporte la base non discriminatrice en position 73 et l'extrémité 3'CCA, site de fixation de l'acide aminé
- le domaine D, ainsi appelé 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)
- le domaine anticodon qui est constitué par la tige inférieure terminée par une boucle qui contient en position 34, 35 et 36 l'anticodon
- et le domaine variable constitué de 4 à 24 nucléotides selon les ARNt.

Ces domaines se replient pour former une structure spatiale tridimensionnelle en forme de L renversé, fruit d'un réseau d'interactions conservées entre les boucles T et D. Cette structure est primordiale pour la fonction de l'ARNt et met en avant les deux sites essentiels de la molécule qui sont le site pour l'aminoacylation au niveau du bras accepteur et celui de l'anticodon.

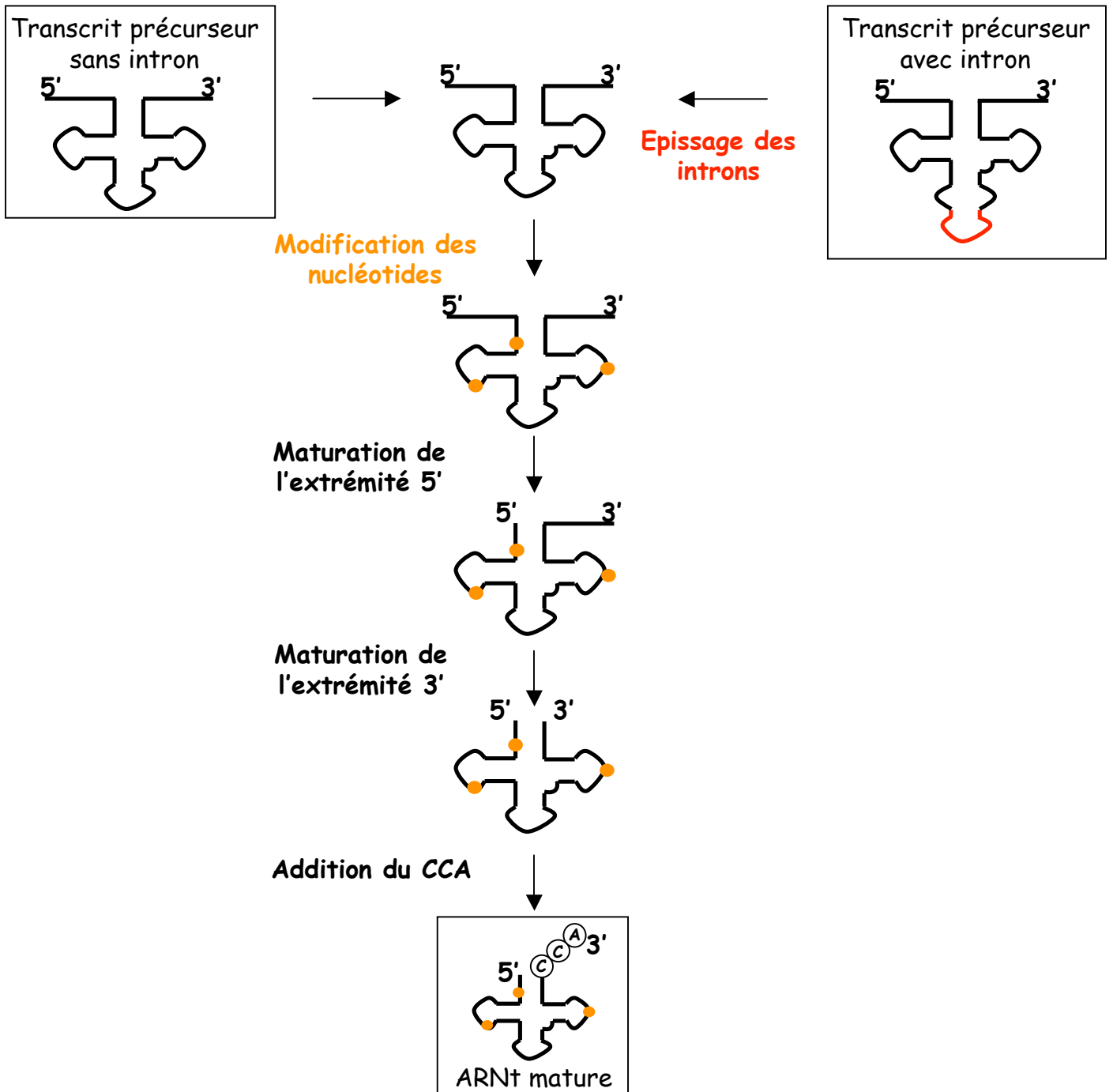


Figure 10

Maturation des ARNt cytosoliques

D'après Kunzmann *et al.*, 1998

1.2 Transcription des gènes nucléaires d'ARNt

Chez les plantes supérieures comme chez les autres eucaryotes, les gènes codant pour les ARNt cytosoliques forment des familles multigéniques dispersées dans le génome ou regroupées sous forme de « cluster ». La transcription est réalisée par une ARN polymérase III et se termine au niveau d'une séquence polyT située à l'extrémité 3' (Söll, 1995). L'interaction entre les facteurs de transcription TFIIB et TFIIC ainsi que deux régions internes du gène codant l'ARNt appelées boîtes A et B (ou 5'ICR et 3'ICR pour « Internal Control Region ») permet l'initiation de la transcription (Bartholomew et al., 1990; Kassavetis et al., 1990). D'autres éléments sont importants pour la transcription comme les motifs CAA et TATA-like (Ulmasov & Folk, 1995; Choisne et al., 1997; Yukawa et al., 2000). Les gènes codant pour les ARNt sont transcrits sous forme de précurseurs possédant parfois des introns au niveau de la boucle de l'anticodon (Grosjean et al., 1997).

1.3 Maturation des ARNt

Les précurseurs d'ARNt transcrits doivent subir un certain nombre de modifications dans le noyau pour être fonctionnels (**Figure 10**) (Hopper & Phizicky, 2003; Englert et al., 2007).

Deux étapes sont requises pour assurer l'épissage des introns lorsqu'il y en a. La première implique une endonucléase et la deuxième étape une ligase et une 2' phosphotransférase (Calvin & Li, 2008).

Pour assurer la spécificité, la fidélité et l'efficacité de leur fonctionnement, les ARNt doivent subir des modifications au niveau de leurs nucléotides. Ces modifications de nucléotides peuvent être des méthylations, des thiolations, des réductions etc. (Grosjean et al., 2007). On trouve deux grandes classes de nucléotides modifiés dans l'ARNt : ceux qui participent à l'établissement de la stabilisation de la structure tridimensionnelle, par exemple la ribothymidine et la pseudouridine dans la boucle T, et ceux qui sont localisés dans la boucle de l'anticodon et qui interviennent directement dans l'interaction avec l'ARNm et dans la lecture des codons, comme par exemple l'inosine ou ses dérivés.

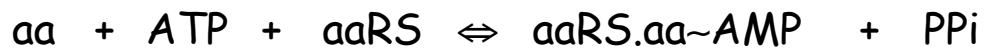


Figure 11

Réaction d'aminacylation des ARNt

Caractéristiques	Classe I	Classe II
Organisation	monomérique	dimérique
Motifs conservés	HIGH KMSKS	Motifs 1 à 3
Site d'aminacylation	2'OH	3'OH

Tableau 4

Principales caractéristiques des aminoacyl-ARNt synthétases

Adapté de Arnez JG et Moras D, 1997

Les extrémités doivent ensuite être maturées pour que l'ARNt soit fonctionnel. Ainsi, l'extrémité 5' est coupée par une ribonucléoprotéine, la RNase P (Evans et al., 2006) et l'extrémité 3' par la RNase Z (Kruszka et al., 2003). Cette dernière est ensuite reconnue par l'ARNt terminal-nucléotidyl transférase qui est capable d'ajouter le triplet CCA (Martin & Keller, 2007).

1.4 Aminoacylation des ARNt

L'aminacylation des ARNt est assurée par les aminoacyl-ARNt synthétases (aaRS). Ces enzymes assurent, avec les ARNt, le lien entre le monde des ARN et le monde des protéines. Elles catalysent la liaison d'un acide aminé sur l'ARNt homologue par une réaction qui se déroule en deux étapes. La première étape est l'activation de l'acide aminé par une molécule d'ATP (**Figure 11**). La deuxième étape consiste en la liaison de cet acide aminé activé sur le ribose de l'adénosine 3' terminale de l'ARNt. 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. Les aminoacyl-ARNt synthétases sont réparties en deux classes (type I et II) en fonction de leur structure et de leurs propriétés fonctionnelles (**Tableau 4**).

Les aaRS de classe I sont pour la plupart monomériques. 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 β parallèles reliés entre eux par des hélices α . Toutes les aaRS de classe I attachent l'acide aminé sur le 2'OH du ribose de l'adénine 3'terminale de l'ARNt.

Les enzymes de classe II sont essentiellement dimériques. Trois séquences dégénérées sont présentes dans le domaine catalytique qui se replie en brins β antiparallèles reliés par des hélices α . Le motif 1 contient une proline strictement conservée, il participe à la dimérisation de l'enzyme. Les motifs 2 et 3 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).

1.5 Eléments d'identité des ARNt

Les éléments d'identité sont les signaux moléculaires essentiels qui interviennent dans la reconnaissance de l'ARNt par son aminoacyl-ARNt. La plupart des éléments d'identité sont au contact direct avec les aminoacyl-ARNt synthétases. Ce qui pourrait expliquer qu'aucun élément d'identité n'ait été trouvé au niveau des paires de bases 6-12 du bras accepteur ainsi que sur la boucle T.

On distingue deux types d'éléments d'identité, majeurs et mineurs, selon les effets plus ou moins importants que les mutations produisent sur l'activité d'amination. Pour la plupart des ARNt, trois éléments d'identité majeurs ont été identifiés. Ils sont situés aux extrémités distales de la structure en « L » de l'ARNt (Giege, 2008) : boucle de l'anticodon (position 35), bras accepteur et nucléotide discriminant N73. Les éléments d'identité mineurs sont en position interne de l'ARNt. Chez *A. thaliana*, les éléments d'identité suivants ont été démontrés :

- G3-U70 pour l'ARNt^{Ala} (Carneiro et al., 1994; Dietrich et al., 1996)
- G34, A35, A36 et G3-C70 pour l'ARNt^{Phe} (Carneiro et al., 1994)
- A73, C34, C35, A36 pour l'ARNt^{Trp} (Ulmasov et al., 1998)

De plus, il existe également des éléments qui agissent comme « anti-déterminants » vis-à-vis de la reconnaissance par les aminoacyl-ARNt synthétases. Il s'agit généralement de nucléotides modifiés. Le premier anti-déterminant décrit, fût celui de l'ARNt^{Ile(LAU)} d'*E. coli*. Cet ARNt possède en position 34 de l'anticodon une cytidine qui est modifiée en 2-lysyl-cytidine (également appelée lysidine (L)). Lorsque la cytidine en position 34 n'est plus modifiée, l'ARNt n'est plus reconnu par l'isoleucyl-ARNt synthétase (Muramatsu et al., 1988).

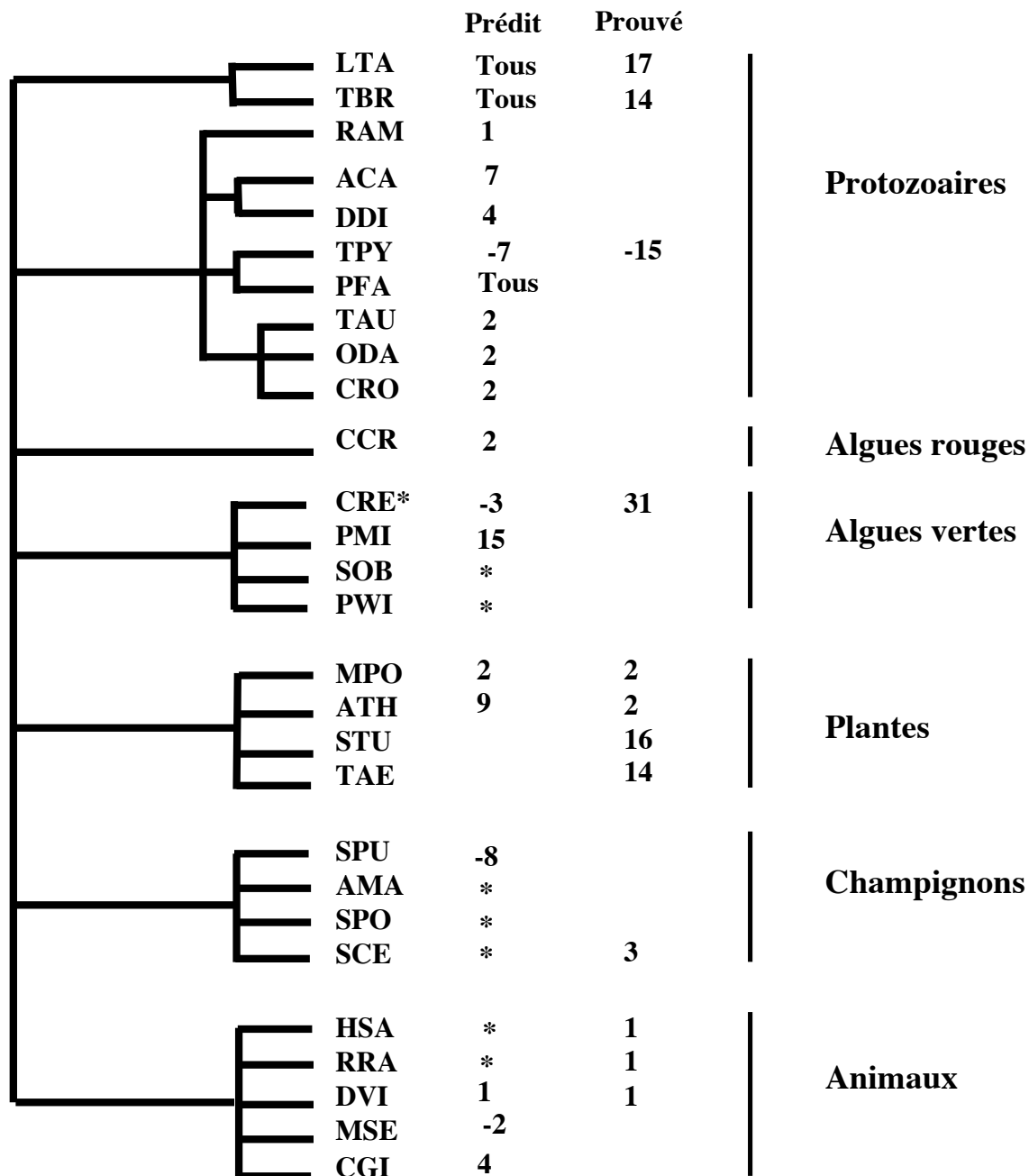


Figure 12

Distribution prédite et prouvée des ARNt importés au sein des mitochondries

Les astérix représentent les organismes pour lesquels l'importation des ARNt n'est pas prédite. Le nombre prédit d'ARNt cytosoliques requis pour compléter le pool d'ARNt mitochondrial afin d'assurer la traduction mitochondriale est indiqué. Le signe « - » précédant le nombre N signifie que tous les ARNt sont importés sauf N. Le nombre d'ARNt prouvé pour être importé est noté lorsque les données sont disponibles.

LTA: *Leishmania tarentolae*; TBR: *Trypanosoma brucei*; RAM: *Reclinomonas americana*; ACA: *Acanthamoeba castelanii*; DDI: *Dictyostelium discoideum*; PFA: *Plasmodium falciparum*; TAU: *Thaustochytrium aureum*; ODA: *Ochromonas danica*; CRO: *Cefeteria roenbergensis*; CCR: *Chondrus crispus*; CRE: *Chamydomonas reinhardtii*; PMI: *Pedinomonas minor*; SOB: *Scenedesmus obliquus*; PWI: *Prototheca wickeramii*; MPO: *Marchantia polymorpha*; ATH: *Arabidopsis thaliana*; SPU: *Spizellomyces punctatus*; AMA: *Allomyces macrogynus*; SPO: *Saccharomyces pombe*; SCE: *Saccharomyces cerevisiae*; HSA: *Homo sapiens*; RRA: *Rattus ratticus*; DVI: *Didelphis virginiana*; MSE: *Metridium senile*; CGI: *Crassostrea gigas*

D'après Duchêne et al., 2009

1.6 Export des ARNt du noyau

Pour participer à la synthèse protéique cytosolique, les ARNt maturés sont transportés du noyau vers le cytosol au travers des pores nucléaires. Ce mécanisme a été largement étudié chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Il semble que plusieurs voies existent faisant intervenir ou non la voie RAN (protéines apparentées aux protéines Ras)-GTP dépendantes et les protéines de la famille des exportines T chez les eucaryotes supérieures (Hopper & Phizicky, 2003).

Ce transport n'a pas encore été complètement élucidé chez les plantes. Néanmoins, chez *Arabidopsis thaliana*, les protéines HST et PSD semblent être impliquées. La protéine PSD est l'orthologue de l'exportine T de levures et la protéine HST est l'orthologue de l'exportine 5 qui exporte les ARNt du noyau chez les mammifères (Park et al., 2005).

2 L'importation des ARNt dans les mitochondries

2.1 Les organismes concernés

L'importation des ARNt dans la mitochondrie a été suggérée pour la première fois chez *Tetrahymena pyriformis* en 1967 (Suyama, 1967). Ensuite, à partir de mitochondries hautement purifiées, des expériences d'électrophorèse bidimensionnelle, de Northern blot et de séquençage d'ARNt ainsi que le séquençage complet de nombreux génomes d'organelles ont permis d'accumuler les preuves de l'étendue de ce transport chez la levure, les protozoaires, les plantes et les animaux. C'est un processus quasi universel très largement répandu dans de nombreux organismes évolutivement éloignés. Par contre, le nombre et l'identité des ARNt cytosoliques transportés dans les mitochondries diffèrent d'un organisme à l'autre, ce qui suggère que ce mécanisme est apparu plusieurs fois au cours de l'évolution et ceci de façon indépendante. Ainsi, le transport d'ARNt dans les mitochondries est décrit comme ayant une origine polyphylétique (**Figure 12**) (Schneider & Marechal-Drouard, 2000).

2.1.1 Les protozoaires

Chez les protozoaires, trois cas sont observés pour l'importation d'ARNt :

- les organismes qui ont perdu très peu de gènes d'ARNt comme *Reclinomonas americana*, protozoaire proche phylogénétiquement du proto-eucaryote ayant subi le processus d'endosymbiose à l'origine des mitochondries. Seul l'ARNt^{Thr} cytosolique est importé dans ses mitochondries (Lang et al., 1997). Ceci démontre d'ailleurs que l'importation d'ARNt dans la mitochondrie est un processus qui est apparu très tôt dans l'évolution
- les organismes qui ont perdu une grande partie de leurs gènes comme *Tetrahymena pyriformis* dont les mitochondries importent environ les trois quarts de ses ARNt, puisque sur l'ensemble des ARNt cytosoliques seulement sept ne sont pas importés (Suyama, 1967)
- les organismes qui ont perdu tous leurs gènes d'ARNt comme *Trypanosoma* et *Leishmania*. En effet, le pool d'ARNt utilisé dans la mitochondrie est composé uniquement d'ARNt cytosoliques (Schneider & Marechal-Drouard, 2000)

2.1.2 Les champignons

Bien que possédant un jeu complet de gènes codant pour des ARNt mitochondriaux, la levure *S. cerevisiae* importe trois ARNt. La présence de l'ARNt^{Lys(CUU)} tRK1 cytosolique dans la mitochondrie a été démontrée dès 1979 (Martin et al., 1979) et récemment l'importation de deux ARNt^{Gln} isoaccepteurs a été mise en évidence (Rinehart et al., 2005). Néanmoins, l'importation de ces deux derniers ARNt reste sujet à controverse. En effet, les mitochondries de levure utilisent la voie de transamidation pour produire l'ARNt^{Gln} à partir de l'ARNt^{Glu} et ne semblent donc pas avoir besoin d'importer d'ARNt^{Gln} (Frechin et al., 2009). Une hypothèse avancée est que ces ARNt^{Gln} soient importés sous certaines conditions et à des taux très faibles.

D'autres champignons comme le chytridiomycète *Spizellomyces punctatus* ne possède que 8 gènes d'ARNt dans son génome mitochondrial. Ces 8 ARNt ne permettant pas d'assurer la traduction, ceci suggère l'importation d'ARNt cytosoliques au sein de la mitochondrie (Laforest et al., 1997).

2.1.3 Les animaux

Chez les animaux, le séquençage complet des génomes mitochondriaux de cnidaires et de mollusques a permis d'observer qu'il manquait quelques gènes codant pour des ARNt, suggérant fortement l'importation d'ARNt cytosoliques dans les mitochondries de ces organismes. En effet, chez *Metridium senile* seulement deux gènes d'ARNt sont encore présents, l'ARNt^{f-Met} et l'ARNt^{Trp} (Beagley et al., 1998). Chez les mammifères, il est généralement admis que l'ADNmt code pour la totalité des ARNt. Néanmoins, il est intéressant de noter que chez les marsupiaux le gène mitochondrial codant pour l'ARNt^{Lys} est tronqué, ainsi les mitochondries de ces animaux semblent importer cet ARNt depuis le cytosol (Dorner et al., 2001). Par ailleurs, deux ARNt^{Gln} isoaccepteurs cytosoliques semblent être importés dans les mitochondries de l'Homme et du rat (Rubio et al., 2008). Toutefois, tout comme pour la levure *S. cerevisiae*, la voie de transamidation de l'ARNt^{Glu} pour produire l'ARNt^{Gln} est utilisée dans les mitochondries. L'importation de ces ARNt dans les mitochondries restent, à ce jour, sujet à controverse (Frechin et al., 2009).

2.1.4 Le règne végétal

Les ARNt cytosoliques importés dans les mitochondries du règne végétal diffèrent en nombre et en identité d'un organisme à l'autre.

Plusieurs situations sont observées pour les algues. Certaines algues importent peu ou pas d'ARNt. Par exemple, les algues rouges *Chondrus crispus* et *Porphyra purpurea* semblent en importer seulement deux puisque tous les autres sont codés par le génome mitochondrial. Par ailleurs, l'algue verte *Prototheca wickerhamii* n'a, à priori, besoin d'importer aucun ARNt cytosolique puisque son génome mitochondrial code pour l'ensemble des ARNt. Par contre, l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii* ne possède que trois gènes mitochondriaux codant pour un ARNt, ce qui implique une importation massive des ARNt cytosoliques dans leurs mitochondries. En effet, une trentaine d'ARNt codés par le génome nucléaire est retrouvée dans les mitochondries de cette algue (Vinogradova et al., 2009).

Les plantes vasculaires importent entre un tiers et la moitié des ARNt mitochondriaux. La complexité de ces organismes est retrouvée dans le nombre et l'identité des ARNt

Organisme	ARNt	Déterminants	Anti déterminants	Références
Protozoaires				
<i>T. brucei</i>	Ts sauf ARNt ^{Meti} et ARNt ^{Sec} ARNt ^{Meti} ARNt ^{Sec}	Paire 51-63 du bras T	Paire U51-A63 Paire U8-U66	Bouzaidi-Tiali et al., 2007
<i>T. pyriformis</i>	ARNt ^{Gln(UUG)}	Anticodon UUG		Rusconi et Cech, 1996
<i>L. tarentolae</i>	ARNt ^{Tyr} ARNt ^{Trp} ARNt ^{Thr} ARNt ^{Glu}	Bras D Anticodon Boucle variable	U34 thiolé	Mahapatra et al., 1998 Kapushoc et al., 2000 Chen et al., 1994 Kaneko et al., 2003
Champignons				
<i>S. cerevisiae</i>	ARNt ^{Lys(CUU)} ARNt ^{Lys(UUU)}	Anticodon Bras accepteur	34 (U*)	Entelis et al., 1998 Entelis et al., 1998
Plantes				
<i>N. tabaccum</i>	ARNt ^{Val} ARNt ^{Gly}	Anticodon Boules T et D Anticodon Boucle D		Delage et al., 2003b Laforest et al., 2005 Salinas et al., 2005

Tableau 5

Déterminants et anti-déterminants d'importation des ARNt dans les mitochondries

D'après Duchêne et al., 2009

importés qui varient d'une espèce à l'autre. Par exemple, chez *Arabidopsis thaliana*, les ARNt codés par le génome nucléaire correspondants à 9 acides aminés sont importés dans les mitochondries depuis le cytosol (Duchene & Marechal-Drouard, 2001) alors que chez le bryophyte *Marchantia polymorpha*, seuls trois ARNt sont importés (Akashi et al., 1998). Cette situation est d'autant plus complexe qu'un ARNt donné sera importé ou non en fonction des espèces. On peut citer l'exemple du gène mitochondrial codant pour l'ARNt^{Phe} : présent au sein du génome mitochondrial de *Solanum tuberosum* alors qu'il est absent dans le génome mitochondrial d'*Arabidopsis thaliana* (Chen et al., 1997). Ainsi, cet ARNt est importé dans les mitochondries de *A. thaliana* alors qu'il ne l'est pas chez *S. tuberosum*. Chez les monocotylédones, on peut citer le cas du blé qui importe l'ARNt^{His} (Glover et al., 2001) alors que le maïs ne l'importe pas (Kumar et al., 1996).

2.2 Les déterminants de l'importation

De multiples expériences *in vitro* et *in vivo* mettant en jeu des variants d'ARNt obtenus par mutagenèse dirigée ont permis de mettre en évidence un certain nombre de signaux d'import très différents suivant les organismes considérés. Ces signaux peuvent permettre l'importation de l'ARNt, on parle alors de déterminants, ou empêcher leur importation, on parle alors d'anti-déterminants (**Tableau 5**).

2.2.1 La levure *S. cerevisiae*

Chez *S. cerevisiae*, l'importation est un processus hautement spécifique puisque sur les deux ARNt^{Lys} cytosoliques codés par le génome nucléaire (l'ARNt^{Lys(CUU)} nommé tRK1 et l'ARNt^{Lys(UUU)} nommé tRK2), un seul est importé dans la mitochondrie : tRK1 (Martin et al., 1979; Entelis et al., 1996). L'ARNt tRK1 diffère de l'ARNt tRK2 en 21 positions. Trois positions sont cruciales pour l'importation des ARNt : la position C34 au niveau de l'anticodon, la première paire de base (G1-C72) ainsi que la base discriminante G73 du bras accepteur (Entelis et al., 1998). Des études ont également montré que la base modifiée en position 34 (U*) de tRK2 agit comme anti-déterminant pour l'importation (Entelis et al., 1998).

2.2.2 Chez les protozoaires

Chez les protozoaires, les séquences importantes pour l'importation identifiées à ce jour sur les ARNt sont très variées. Il faut noter d'une façon générale qu'il peut exister des différences non négligeables entre les expériences menées *in vitro* et celles menées *in vivo*. Ainsi, des études ont montré que des ARNt précurseurs dicistroniques peuvent être importés (LeBlanc et al., 1999; Yermovsky-Kammerer & Hajduk, 1999; Sherrer et al., 2003) alors que d'autres résultats montrent que les ARNt sont importés indépendamment de leurs séquences 5' et 3' (Tan et al., 2002).

Les déterminants ou anti-déterminants identifiés peuvent être par exemple la boucle D, l'anticodon, le bras T ou alors il peut s'agir d'une base modifiée :

-*Tetrahymena* contient trois ARNt^{Gln} isoaccepteurs. Deux sont spécifiquement cytosoliques, ils portent les anticodons UUA et CUA. Le troisième, portant l'anticodon UUG, est trouvé dans les fractions cytosolique et mitochondriale. Par une analyse quantitative, il a pu être montré en remplaçant les anticodons par mutagenèse dirigée, que l'anticodon UUG de l'ARNt^{Gln} naturellement importé est nécessaire et suffisant pour induire l'importation des deux autres (Rusconi & Cech, 1996a, b).

-*Trypanosoma brucei* : à l'aide d'une approche transgénique et en comparant les séquences des deux ARNt^{Met} élongateur et initiateur (respectivement importé et non importé dans les mitochondries de *Trypanosoma brucei*), il a été démontré que le bras T est nécessaire et suffisant pour spécifier la localisation des ARNt dans les mitochondries (Crausaz Esseiva et al., 2004). De plus, il semble que la paire de base U51-A63 de l'ARNt^{Meti} joue le rôle d'anti-déterminant car elle empêche l'interaction avec le facteur d'élongation eEF1a, essentiel pour l'importation des ARNt dans cet organisme (Bouzaidi-Tiali et al., 2007).

- *L. tarentolae* : les déterminants d'importation se situent sur les bras D et T. Ainsi, deux classes d'ARNt importés ont été déterminées. Le type I contient le motif YGGYAGAGY ou YGGYAAGY au niveau de la région du bras D et de l'anticodon. Le type II contient le motif UGGGU ou UGGGGU au niveau de la boucle variable et du domaine T. Les ARNt de type I traversent efficacement la membrane interne alors que les ARNt de type II la traversent avec une faible efficacité (Bhattacharyya et al., 2002).

-Finalement, d'autres travaux montrent que les modifications des bases peuvent aussi être à l'origine de la sélectivité d'importation chez les protozoaires. Une uridine modifiée mcm5U (5-méthoxycarbonylméthyluridine), présente dans une minorité d'ARNt^{Gln}, ARNt^{Glu} ou ARNt^{Lys} servirait de signal d'adressage mitochondrial, alors que la thiolation de ce nucléotide (mcm5sU : 5-méthoxycarbonylméthyl-thiouridine) serait un anti-déterminant d'importation (Kaneko et al., 2003).

2.2.3 Chez les plantes

Chez les plantes, le processus de sélection des ARNt importés par rapport à ceux qui ne le sont pas doit être très fin. Il est donc légitime d'imaginer qu'une telle sélection puisse être obtenue par les mécanismes de reconnaissance ARNt-aaRS. Ainsi, il a été démontré qu'une mutation en position 70 du bras accepteur de l'ARNt^{Ala(UGC)}, qui abolit sa reconnaissance par l'Alanyl-ARNt synthétase, aussi bien qu'une mutation en position 36 de l'ARNt^{Val(AAC)}, qui abolit sa reconnaissance par la Valyl-ARNt synthétase, inhibent l'importation de ces ARNt dans les mitochondries de tabac (Dietrich et al., 1996; Delage et al., 2003b). Il semble donc que la reconnaissance par une aminoacyl-ARNt synthétase importée dans les mitochondries soit une condition nécessaire pour l'importation des ARNt cytosoliques au sein des mitochondries. Par contre, lorsque les gènes codant le précurseur mitochondrial de l'AlaRS et de l'ARNt^{Ala} d'*Arabidopsis thaliana* ont été exprimés chez *S. cerevisiae*, il a été observé que, bien que l'enzyme soit importée dans les mitochondries, l'ARNt^{Ala} reste cytosolique (Mireau et al., 2000). De plus, chez les plantes dicotylédones, alors que les trois ARNt^{Gly} cytosoliques sont reconnus par la même GlyRS, seuls deux d'entre eux sont importés dans les mitochondries (Brubacher-Kauffmann et al., 1999). L'ensemble de ces résultats montre donc que la reconnaissance par une aminoacyl-ARNt synthétase importée dans les mitochondries est une condition nécessaire mais pas suffisante pour permettre l'importation d'un ARNt cytosolique.

Afin de mieux définir d'autres déterminants de l'importation portés par les ARNt, une étude a été effectuée sur plusieurs couples d'ARNt importé/ARNt non importé (par exemple ARNt^{Val}/ARNt^{Met}). Il en découle que les domaines D ou T des ARNt^{Val} et ARNt^{Gly} sont essentiels à l'importation de ces ARNt au sein de la mitochondrie (Delage et al., 2003b; Laforest et al., 2005; Salinas et al., 2005). Ainsi par exemple, la mutation d'un nucléotide de

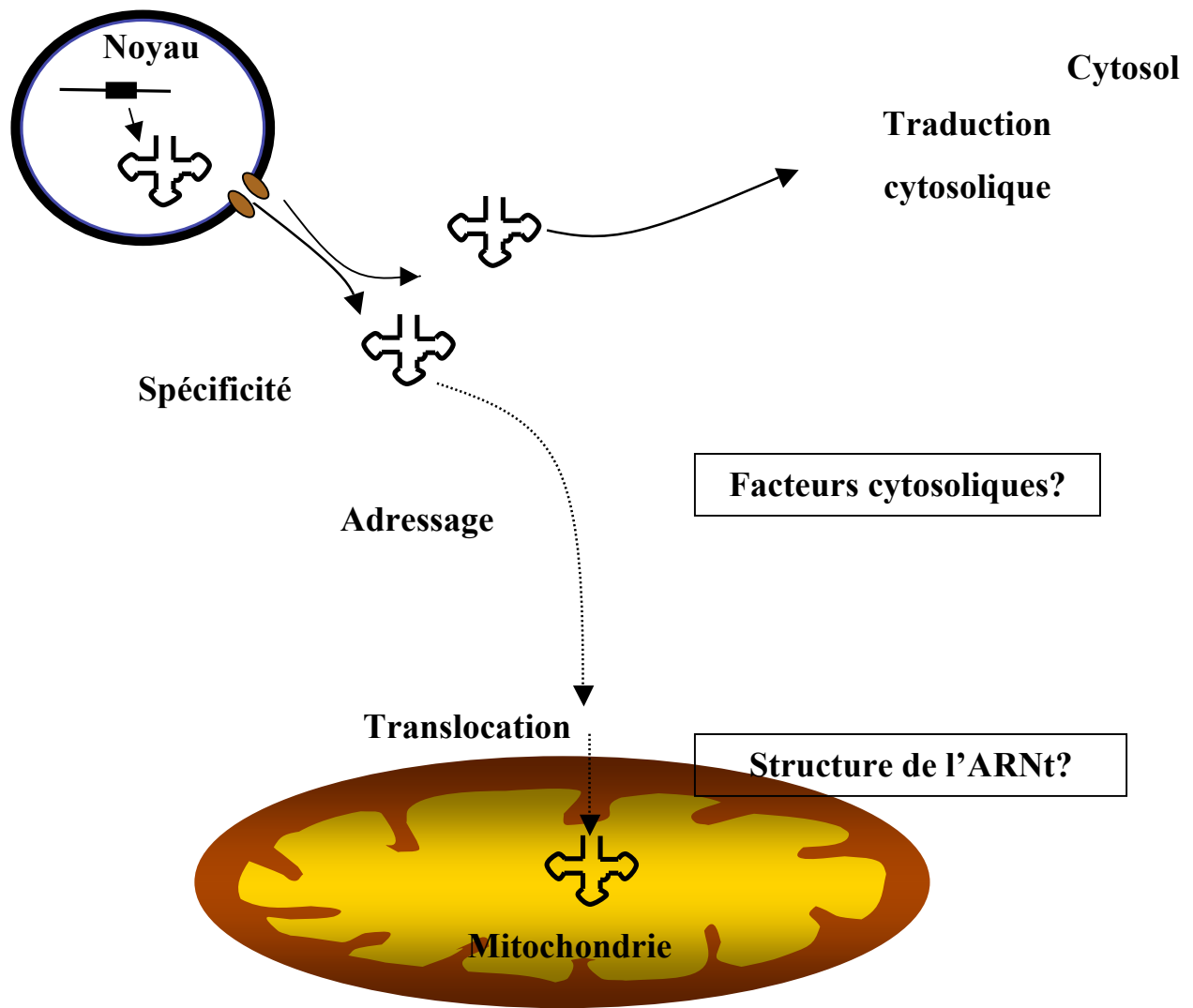


Figure 13
Problématique de l'importation des ARNt au sein des mitochondries

	Levures	Protozoaires	Plantes
Besoin en ATP	oui	oui	oui
Besoin en potentiel membranaire	oui	oui/non	oui
Facteurs cytosoliques	oui	oui	non <i>in vitro</i>
Implication du canal TOM/TIM	oui	non	non
Implication des aminoacyl-ARNt synthétases	oui	non	non <i>in vitro</i> oui <i>in vivo</i>
Récepteurs sur la membrane externe	oui	oui	oui

Tableau 6
Comparaison des différents systèmes d'importation des trois organismes modèles

l'anticodon de l'ARNt^{Gly(UCC)} cytosolique importé dans les mitochondries en GCC suffit à abolir l'importation alors que ce nucléotide ne constitue pas un élément d'identité pour les Glycyl-ARNt synthétases de plantes (Salinas et al., 2005).

2.3 Les mécanismes d'importation des ARNt dans les mitochondries

Plusieurs questions majeures doivent trouver une réponse pour tenter d'élucider les mécanismes d'importation des ARNt au sein des mitochondries (**Figure 13**) :

-les ARNt doivent « voyager » au travers du cytosol pour rejoindre la mitochondrie. Ceci pose la question de l'adressage des ARNt à la surface des mitochondries. D'après l'hypothèse du channeling (Negrutskii & El'skaia, 2001), les ARNt ne seraient pas libres dans le cytosol mais associés à d'autres molécules qui pourraient donc intervenir dans la spécificité d'importation.

-comme écrit dans les paragraphes précédents, tous les ARNt cytosoliques ne sont pas importés dans les mitochondries. Ceci suppose qu'il existe un mécanisme permettant de discriminer l'ARNt importé de celui qui ne l'est pas. En d'autres termes quelles sont les bases de la spécificité d'importation des ARNt ? Les déterminants et les anti-déterminants d'importation décrits précédemment font partie des signaux qui permettent aux ARNt d'être importés ou non au sein des mitochondries.

-les ARNt doivent traverser la double membrane mitochondriale et ceci contre le gradient électrochimique de la membrane interne, alors que ce sont des molécules de grande taille (25 kDa) structurées et chargées négativement. Ainsi se pose la question de la machinerie de translocation des ARNt à travers les deux membranes mitochondriales.

Les données actuelles laissent supposer que des systèmes biologiques évolutivement différents ont acquis de façon indépendante la possibilité d'importer des ARNt. De ce fait, il est très vraisemblable que des mécanismes d'importation d'ARNt radicalement différents puissent exister : ainsi si tous les systèmes requièrent de l'énergie ou des récepteurs membranaires, certains n'ont pas besoin du potentiel membranaire mitochondrial ou des aminoacyl-ARNt synthétases (**Tableau 6**). A ce jour, les travaux publiés portant sur l'étude des mécanismes impliqués dans cette importation ont permis de proposer trois modèles très différents chez la levure, les protozoaires et les plantes.

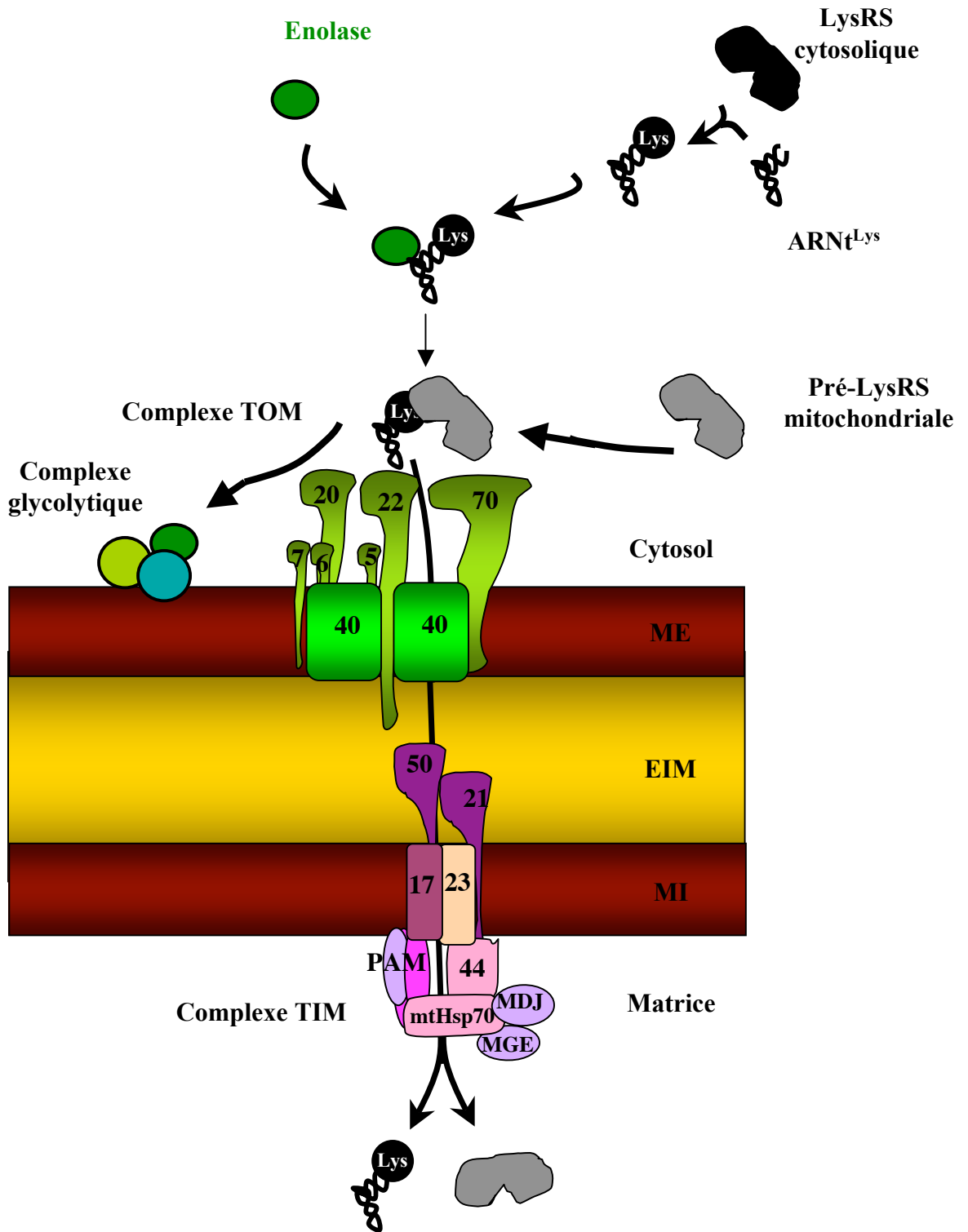


Figure 14

Modèle du système d'importation de tRK1 chez *S. cerevisiae*

LysRS=Lysyl-ARNt synthétase, Lys=lysine, Pré-LysRS=précurseur de la Lysyl-ARNt synthétase mitochondriale, TOM=translocase of the outer membrane, TIM= translocase of the inner membrane, ME=membrane externe, MI=membrane interne, EIM=espace inter-membranaire, Hsp=Heat shock protein, PAM=presequence translocase-associated motor

D'après Entelis et al., 2006

2.3.1 Chez la levure *S. cerevisiae*

Le premier modèle repose sur l'adressage de l'ARNt^{Lys(CUU)} (tRK1) dans les mitochondries de *S. cerevisiae* (**Figure 14**). Ce processus est ATP-dépendant et nécessite l'intégrité du potentiel membranaire mitochondrial ainsi qu'une machinerie d'importation des protéines intactes. L'interaction entre l'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 (Entelis et al., 2006). L'ARNt^{Lys} est tout d'abord aminoacylé par la lysyl-ARNt synthétase cytosolique. Il est ensuite reconnu par l'énolase, une enzyme glycolytique qui le dirige vers la surface de la mitochondrie. A ce niveau l'énolase rentre dans le complexe glycolytique et l'ARNt est pris en charge par le précurseur de la lysyl-ARNt synthétase mitochondriale qui est synthétisé à la périphérie des mitochondries (Entelis et al., 2006). Ici l'énolase joue un double rôle, celui de transporteur pour l'adressage mitochondrial mais aussi celui de chaperonne. En effet, l'interaction entre tRK1 et l'énolase provoquerait un changement conformationnel de l'ARNt, facilitant et stabilisant l'interaction de tRK1 avec le précurseur de la lysyl-ARNt synthétase mitochondriale. Cette protéine précurseur va entraîner l'ARNt dans la mitochondrie *via* le complexe d'importation des protéines (Tarassov et al., 1995).

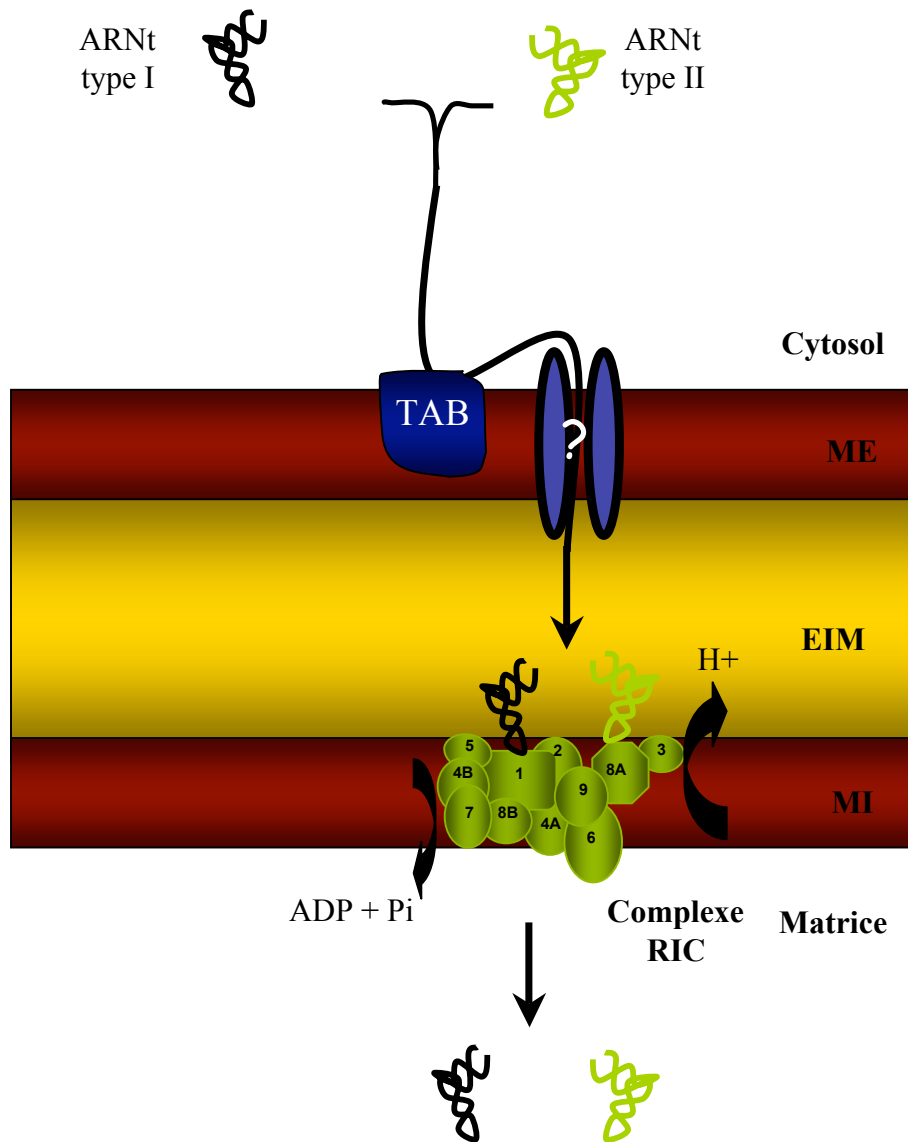


Figure 15

Modèle du système d'importation des ARNt chez *L. tropica*

ME=membrane externe, MI=membrane interne, EIM=espace inter-membranaire, RIC=RNA Import Complex, TAB=Tubulin antisense binding

D'après Goswami et al., 2006

2.3.2 Chez les protozoaires

Le second modèle correspond à un mécanisme de transport direct des ARNt dans les mitochondries de *Leishmania* (**Figure 15**) (Adhya, 2007). Il se ferait par le biais de récepteurs localisés sur la membrane externe mitochondriale et à travers un canal spécifique. De plus, il ne fait intervenir aucun facteur cytosolique. Les ARNt destinés à être importés sont tout d'abord reconnus et fixés par le récepteur TAB (« Tubulin antisense binding ») (Bhattacharyya et al., 2000). Après le passage à travers la membrane externe, les ARNt sont pris en charge par un complexe au niveau de la membrane interne appelé RIC (« RNA Import Complex ») (Bhattacharyya et al., 2003). Au niveau de la membrane interne, se met en place une régulation allostérique pour permettre le passage soit de l'ARNt de type I soit de l'ARNt de type II sans qu'il y ait compétition entre l'un et l'autre. Ce mécanisme permet de réguler les différents ARNt importés dans la matrice mitochondriale (Bhattacharyya et al., 2003). Le passage des ARNt à travers la membrane interne a besoin d'énergie et génère un potentiel membranaire local. En effet, la fixation de l'ARNt sur le récepteur provoque le transport de l'ATP dans la matrice *via* une translocase et le complexe ARNt-récepteur induit l'hydrolyse de l'ATP par une ATPase présente au sein de RIC. Cette hydrolyse est accompagnée d'un pompage de proton depuis la matrice jusqu'à l'espace inter-membranaire provoquant ainsi un gradient de protons permettant l'ouverture du canal et le passage de l'ARNt. Les protons pourraient agir à ce niveau pour neutraliser la charge négative de l'ARNt ou bien ils induiraient un passage électrophorétique de l'ARNt (Bhattacharyya & Adhya, 2004).

Le complexe RIC de 640 kDa est composé de 11 sous-unités majeures, dont 4 présentent des homologues avec les sous-unités des complexes respiratoires. Les composants RIC1 et RIC8 ont été identifiés comme étant les récepteurs pour les ARNt de type I et de type II respectivement. RIC8 a été identifié comme l'homologue de la sous-unité 6b du complexe de l'ubiquinol cytochrome c réductase (complexe III de la chaîne respiratoire mitochondriale) (Chatterjee et al., 2006) et RIC1 comme l'homologue de la sous-unité α de l'ATP synthase (Goswami & Adhya, 2006). De manière intéressante, cette protéine, nommée par la suite RIC1/F1 α , est capable d'être active au niveau du complexe RIC et au niveau du complexe V. Néanmoins, sa conformation dans ces deux complexes semble être différente. En effet, le site de fixation pour les ARNt est exposé dans le complexe RIC alors qu'il ne l'est pas dans le complexe V (Goswami & Adhya, 2006). Comme aucun site d'activité ATPase n'a été trouvé sur RIC1/F1 α , les auteurs proposent que l'interaction entre la partie C-terminale de

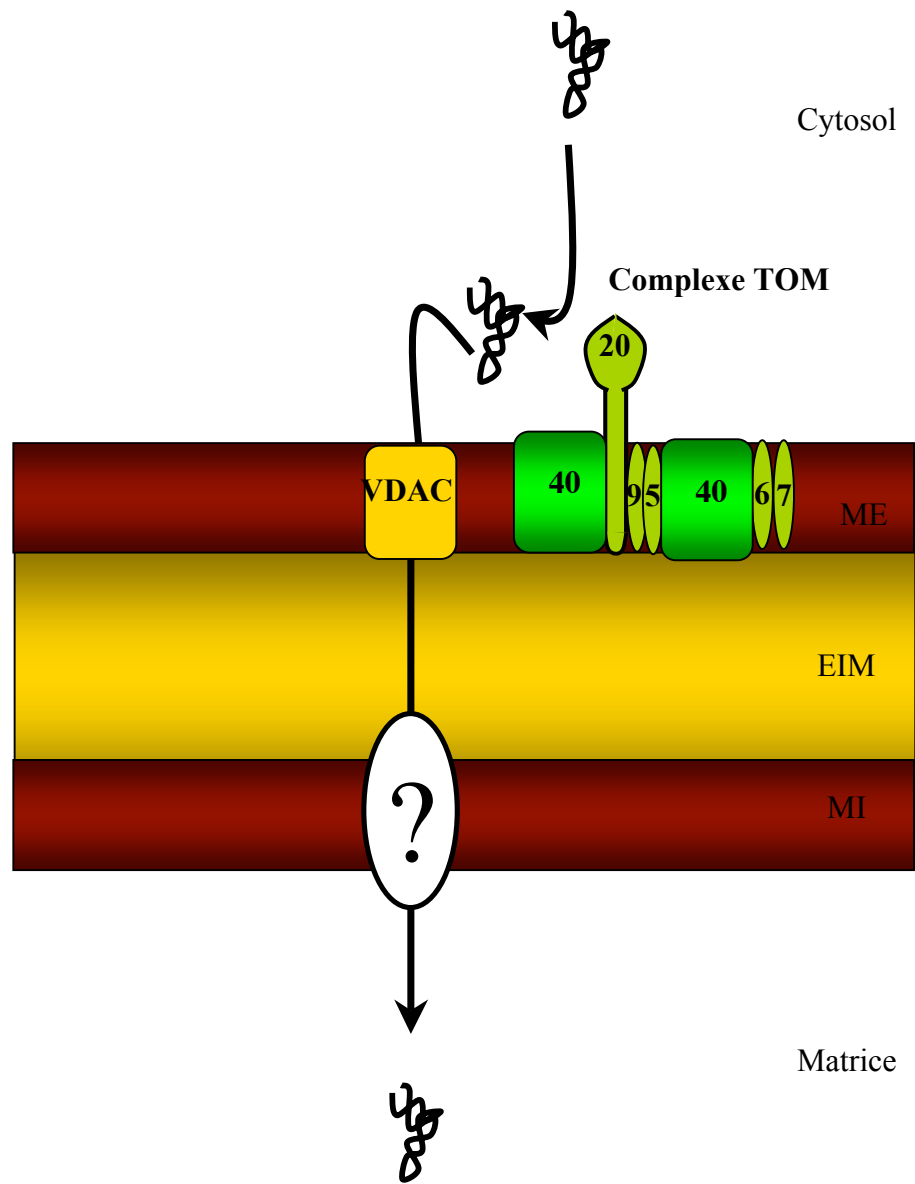


Figure 16

Modèle du système d'importation de l'ARNt^{Ala} chez *S. tuberosum*

ME=membrane externe, MI=membrane interne, EIM=espace inter-membranaire, TOM=translocase of the outer membrane, VDAC=voltage dependent anion channel

D'après Salinas et al., 2006

la protéine avec le domaine D des ARNt type I provoquerait un changement conformationnel permettant d'exposer le site catalytique.

Les études menées chez les *Trypanosoma* et chez *Leishmania*, montrent des points communs mais également des différences. Ainsi par exemple, tous ces systèmes d'importation nécessitent l'hydrolyse de l'ATP. Par contre, alors que la nécessité d'un potentiel membranaire a été démontrée chez *Leishmania tarentolae*, il ne semble pas nécessaire dans le cas de *Trypanosoma brucei*. Un autre point de divergence concerne la thiolation des ARNt qui constitue un anti-déterminant d'importation chez *Leishmania*. L'inhibition de l'expression de la cystéine désulfurase TbNfs, enzyme clé de la thiolation des ARNt, n'a aucun effet sur l'importation des ARNt dans les mitochondries de *Trypanosoma brucei* (Paris et al., 2009).

2.3.3 Chez les plantes

L'importation des ARNt dans les mitochondries de plantes est dépendante de l'ATP et du potentiel membranaire. Des études *in vivo* ont montré qu'il existait une corrélation entre aminoacylation et importation mettant ainsi en évidence l'implication des aminoacyl-ARNt synthétases. Par contre *in vitro*, aucun facteur cytosolique n'est nécessaire pour l'importation des ARNt et ceux-ci ne doivent pas être aminoacylés pour être importés. La sensibilité de l'importation des ARNt aux traitements aux protéases des mitochondries, suggère qu'il existe un ou des récepteurs, au niveau de la membrane externe, impliqués dans l'importation des ARNt (Delage et al., 2003a). En effet, la fixation des ARNt à la surface mitochondriale se ferait par un complexe protéique comprenant au moins deux protéines du complexe TOM, TOM20 et TOM40 (**Figure 16**). Le passage des ARNt à travers la membrane externe se ferait ensuite par le pore formé par la protéine VDAC (Salinas et al., 2006). Le passage à travers la membrane interne reste pour l'instant inconnu. Néanmoins, des expériences de compétition écartent l'implication de la voie de transport des protéines.

2.3.4 Chez l'Homme

Le mécanisme d'importation des ARNt^{Gln} au sein des mitochondries humaines est à l'heure actuelle encore inconnu. Par contre, il est à noter que les mitochondries de mammifères

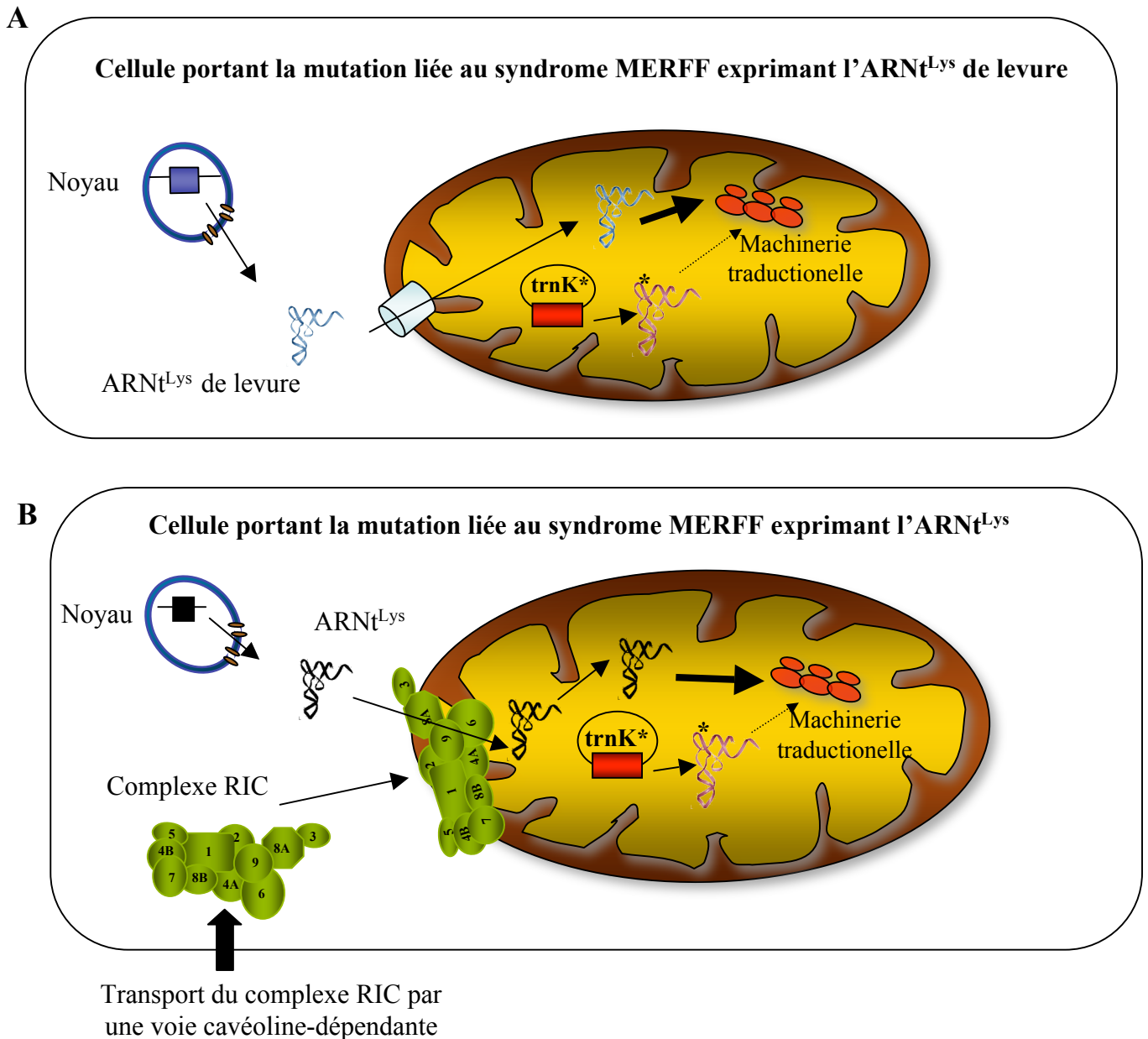


Figure 17

Stratégie de restauration des dysfonctionnements mitochondriaux liés au syndrome MERFF par le système d'importation des ARNt

Le syndrome MERFF est causée par la mutation A8344G dans le gène codant l'ARNt^{Lys} mitochondrial. Ainsi, la synthèse protéique mitochondriale est perturbée provoquant des déficits respiratoires.

A L'existence de systèmes cryptiques d'import d'ARNt présents chez l'Homme permettent l'import d'ARNt provenant de levure exprimé dans des cellules portant la mutation MERFF et ainsi la restauration partielle de la synthèse protéique mitochondriale et la complémentation fonctionnelle de déficits liés à des mutations d'ARNt mitochondriaux

B Le transport d'un complexe RIC par une voie contrôlée par la cavéoline dans des cellules humaines portant la mutation MERFF permet l'importation d'ARNt dans les mitochondries. Ainsi, la traduction mitochondriale est partiellement restaurée et les déficits respiratoires sont partiellement complémentés.

D'après Salinas et al., 2008

ont la compétence d'importer de façon naturelle l'ARNr 5S (Entelis et al., 2001). Cet import requiert de l'énergie sous forme d'ATP, le potentiel membranaire et la présence de protéines additionnelles, suggérant que ce transport s'effectue par le biais du système d'import des protéines. Deux régions ont été identifiées comme étant des éléments d'identité pour l'import de l'ARN 5S dans les mitochondries humaines. La première est localisée dans la partie proximale de l'hélice I et contient la paire de base G-U. La seconde est la région associée à la boucle E-hélice IV (Smirnov et al., 2008).

3 Dysfonctionnements mitochondriaux liés à l'import des ARNt et stratégies de correction

Plus de la moitié des mutations mitochondriales se situent au niveau des gènes d'ARNt alors que ceux-ci ne représentent que 10% de l'ADNmt (Florentz et al., 2003; Levinger et al., 2004). A l'heure actuelle, les quelques stratégies développées pour la manipulation du système génétique mitochondrial passent par l'importation de macromolécules (protéines, ADN et ARN) dans les mitochondries. Ces rares approches ont pour principal objectif la complémentation de mutations de l'ADN mitochondrial chez l'humain (Smith et al., 2004).

Par exemple, il a été démontré que l'expression de l'ARNt^{Lys} de levure dans les cellules humaines portant une mutation dans le gène codant l'ARNt^{Lys} mitochondrial liée au syndrome MERRF permet une récupération partielle des fonctions mitochondriales affectées par la mutation, comme l'activité des complexes respiratoires, le potentiel de membrane, la synthèse des protéines (Kolesnikova et al., 2004). Plus récemment, en se fondant sur les résultats obtenus chez les protozoaires, il a été montré que l'on pouvait forcer le complexe RIC à entrer dans des cellules humaines par une voie contrôlée par la cavéoline. Une fois dans les cellules, le complexe RIC s'intègre aux mitochondries et permet l'import d'ARNt (Mahata et al., 2006). Ainsi il est possible de compléter fonctionnellement des fibroblastes humains porteurs de mutations dans l'ARNt^{Lys} mitochondrial associées aux syndromes MERRF et KSS (Mahata et al., 2006) (**Figure 17**).

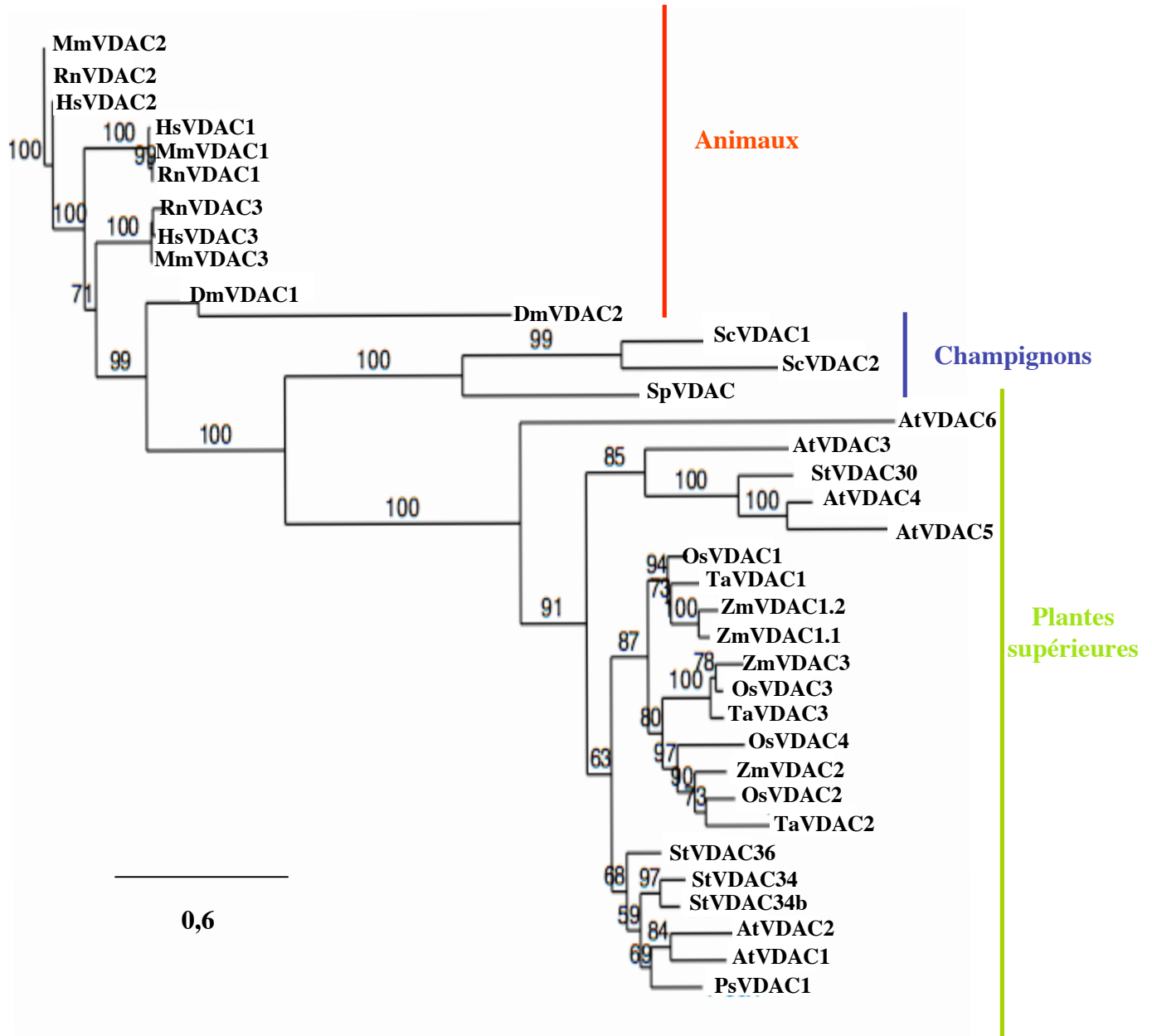


Figure 18
Arbre phylogénétique des protéines VDAC

Les séquences ont été alignées avec le logiciel Muscle. La phylogénie a été réalisée avec le logiciel PhyML (Guindon et al, 2003). Les arbres non racinés obtenus ont été dessinés avec le logiciel Treedyn (Chevenet et al, 2006). La robustesse des branches a été testée par la méthode des bootstraps (le nombre de bootstrap réalisé est de 100). Seules les valeurs de bootstrap supérieures à 50 ont été indiquées. La barre horizontale indique la distance d'évolution (nombre de substitutions par site).

Cet arbre a été construit avec l'aide de Valérie Cognat (Plateforme bioinformatique, IBMP)

Mm: *Mus musculus*, Rn: *Rattus norvegicus*, Sc: *Saccharomyces Cerevisiae*, Sp: *Schizosaccharomyces pombe*, Dm: *Drosophila melanogaster*, Hs: *Homo sapiens*, At: *Arabidopsis thaliana*, Os: *Oryza sativa*, Ps: *Pisum sativum*, St: *Solanum tuberosum*, Ta: *Triticum aestivum* et Zm: *Zea mays*

III Les protéines VDAC

Depuis leur première découverte en 1976 (Schein et al., 1976), les canaux dépendant du voltage ont fait l'objet de nombreuses études. Ces protéines forment des pores dans la membrane externe des mitochondries de tous les eucaryotes d'où leur nom de « porines ». Elles présentent toutes des propriétés structurales et fonctionnelles conservées et ont une taille généralement comprise entre 28 et 36 kDa. Ces porines sont les protéines les plus abondantes dans les membranes externes mitochondriales. Cette localisation stratégique les place au cœur d'un grand nombre de processus.

1 Les gènes

Les protéines VDAC représentent une famille multigénique conservée au cours de l'évolution. Le nombre de gènes codant pour des protéines VDAC ainsi que le nombre de protéines exprimées varient d'un organisme à l'autre. Ainsi par exemple, l'Homme possède 3 gènes codant pour ces protéines, la levure *Saccharomyces* en contient 2, la plante *Arabidopsis thaliana* présente 6 gènes, la pomme de terre en a 4 et l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii* en possède deux. Les différents gènes codant pour ces protéines sont généralement localisés sur différents chromosomes (Young et al., 2007). Néanmoins, chez la drosophile les gènes codant pour les différentes isoformes de VDAC sont organisés en tandem répétés sur le même chromosome (Graham & Craigen, 2005).

2 La famille des protéines VDAC

Un arbre phylogénétique a été construit à partir des séquences des protéines VDAC publiées ou identifiées dans GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). L'étude phylogénétique des protéines VDAC montre que les VDAC de plantes, de levure et d'animaux se trouvent sur trois branches distinctes (**Figure 18**).

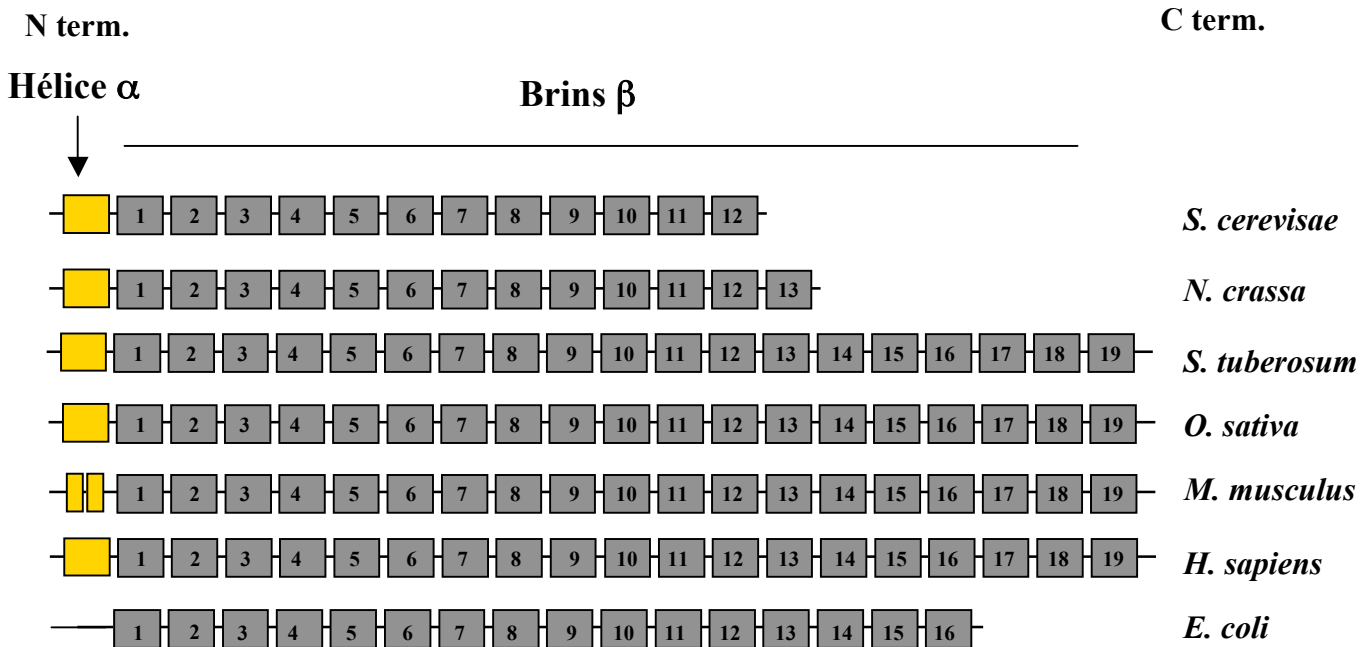


Figure 19

Comparaison des structures secondaires des protéines VDAC et de la porine bactérienne OmpF d'*E. coli*

L'hélice α est représentée par un carré jaune, les brins β par des carrés gris et les boucles par des lignes horizontales.

3 Structure des protéines VDAC

Pour comprendre l'aspect fonctionnel de ces protéines, il est indispensable de résoudre leur structure. Il ressort des études actuelles que tous les membres de cette famille possèdent une structure similaire (Young et al., 2007). Au vu de l'importance de VDAC dans le métabolisme, la modélisation et la détermination de sa structure est au centre de nombreux programmes de recherches.

3.1 Modélisation de la structure des protéines VDAC

Puisqu'il existe des similarités de séquences et de fonctions entre les protéines VDAC et les porines bactériennes et que certaines structures bactériennes étaient résolues, les structures de protéines eucaryotiques ont pu être prédites (**Figure 19**). Par contre, à la différence des porines bactériennes, les protéines VDAC eucaryotiques ont une hélice α au niveau de l'extrémité N-terminale. Cette hélice est suivie d'une succession de brins β dont le nombre varie de 12 à 19 suivant les protéines.

La première structure d'une porine a été proposée en 1987 chez la levure (Forte et al., 1987). En se basant sur l'alternance d'acides aminés hydrophobes et hydrophiles nécessaires à la formation des brins β amphipathiques, Forte et al. proposèrent une structure en tonneau β avec des résidus successivement orientés face aux espaces hydrophiles (cytosol, espace inter-membranaire mitochondrial) et face à la bicouche lipidique. Toutes les modélisations proposées par la suite pour ces protéines sont allés dans le sens d'un tonneau β en 3 dimensions d'environ 3 nm de diamètre (Mannella, 1989; Shao et al., 1996). La position de l'hélice α par rapport au tonneau reste un sujet à controverse. En effet, quand certains pensent qu'elle forme un clapet permettant d'ouvrir ou de fermer le pore et d'autres la voient à l'intérieur du pore (De Pinto et al., 2007). De plus, l'orientation de cette protéine au sein de la membrane externe mitochondriale n'est toujours pas clair (McDonald et al., 2009). Néanmoins, il semble que cette protéine ait un comportement dynamique au sein de la membrane lui permettant de moduler son orientation suivant les conditions.

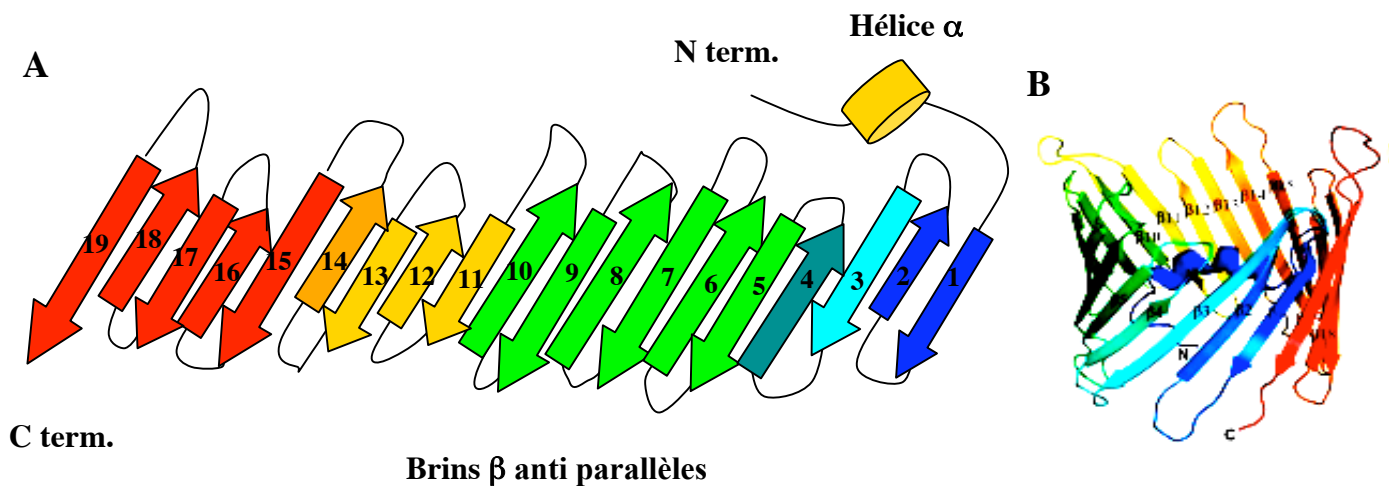


Figure 20

La protéine VDAC1 de l'Homme

A Structure secondaire de la protéine VDAC1 humaine

La protéine est colorée de l'extrémité N-terminale en bleu à l'extrémité C-terminale en rouge.

B Structure tertiaire de la protéine VDAC1 humaine

Le numéro des brins β est indiqué. La protéine est colorée de l'extrémité N-terminale en bleu à l'extrémité C-terminale en rouge.

D'après Bayrhuber et al., 2008

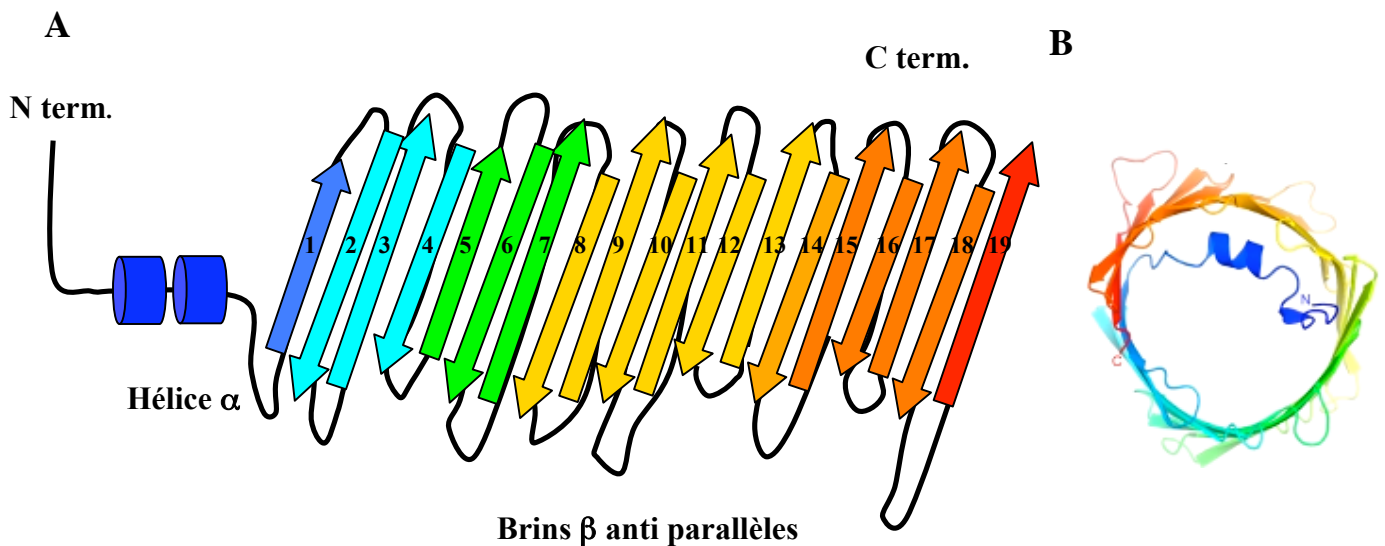


Figure 21

La protéine VDAC1 de souris

A Structure secondaire de la protéine VDAC1 de souris

La protéine est colorée de l'extrémité N-terminale en bleu à l'extrémité C-terminale en rouge.

B Structure tertiaire de la protéine VDAC1 de souris

La protéine est colorée de l'extrémité N-terminale en bleu à l'extrémité C-terminale en rouge.

D'après Ujwal et al., 2008

3.2 Structure 3D des protéines VDAC

L'obtention de la structure tridimensionnelle des protéines VDAC est soumise à plusieurs pré-requis. Tout d'abord il faut produire de grande quantité de protéines. De plus, ces protéines doivent être dans des conditions natives. Enfin elles doivent être très pures pour permettre la production de cristaux. Dans la mesure où les protéines VDAC s'agrègent, il est difficile de les purifier en grande quantité et en condition native. C'est pourquoi la première structure de protéine VDAC n'a été résolue que récemment. A ce jour, deux structures tridimensionnelles de protéines VDAC ont été décrites. Il s'agit des protéines VDAC1 humaine et de souris.

La structure 3D de la porine humaine a été résolue par résonance magnétique nucléaire et par diffraction aux rayons X (**Figure 20**). Cette protéine a été purifiée puis renaturée avec des détergents (LDAO) pour lui permettre d'adopter sa structure spatiale. La structure a été résolue à plus de 4 Å. Elle forme un tonneau β de 3,7 nm de diamètre. Ce tonneau est constitué d'une hélice α , localisée dans le pore, suivie de 19 brins β séparés par 18 boucles dynamiques. L'hélice α est comprise entre les 7^e et 17^e acides aminés de la protéine. Les extrémités N- et C-terminale sont orientées dans la même direction (Bayrhuber et al., 2008).

Chez la souris, la structure de la protéine VDAC1 a été résolue à 2,3 Å dans un environnement lipidique (**Figure 21**). Cette protéine forme un tonneau β composé de 19 brins β et une hélice α située au milieu du tonneau permettant de réguler la conductance des ions et des métabolites traversant VDAC. Cette hélice est formée de deux segments d'une dizaine d'acides aminés, elle est orientée du même côté de la membrane que l'extrémité C-terminale. Cette étude a montré que la face externe du tonneau est composée d'acides aminés hydrophobes qui sont exposés à l'environnement lipidique alors que la face interne est hydrophile et conductrice pour le passage d'ions et de métabolites. Cette face interne a une densité en charges positives plus forte par rapport aux acides aminés chargés négativement, ce qui peut expliquer la sélectivité du canal aux anions dans son état ouvert (Ujwal et al., 2008).

Ainsi, les structures de ces deux protéines VDAC sont très similaires puisque toutes deux sont constituées d'une hélice α suivie de 19 brins β . De plus, l'hélice α est située au

milieu du pore chez les deux organismes. Enfin, les extrémités N- et C-terminales sont orientées dans la même direction.

4 Signature des protéines VDAC

Une analyse faite sur les porines de plantes, de champignons et d'animaux a permis de mettre en évidence un motif (PS 00558) au niveau de l'extrémité C-terminale de plusieurs protéines. Ce motif contient la séquence « VKAKV » (Smith et al., 1995) au niveau du 16^e brin β . Cependant ce motif n'est pas universel puisqu'il n'est pas retrouvé chez toutes les protéines VDAC (Wandrey et al., 2004). Les protéines VDAC présentent un autre motif conservé « GLK » au niveau du 6^e brin β . La séquence de ces motifs peut néanmoins varier d'une protéine à l'autre (Young et al., 2007).

5 Etat oligomérique des protéines VDAC

Plusieurs études ont montré qu'il existait différentes formes multimériques. Par exemple, chez la pomme de terre les protéines VDAC peuvent former des monomères, des dimères, des tétramères, des hexamères et même des oligomères de plus grande taille (Hoogenboom et al., 2007). Cette oligomérisation a pu être visualisée au sein des membranes mitochondriales de levures grâce à des études réalisées par microscopie à force atomique (Goncalves et al., 2007).

La raison de cette oligomérisation reste à l'heure actuelle inconnue. Cependant, dans la mesure où cette association est spontanée, on peut suggérer qu'elle a une fonction. Une des hypothèses avancées serait la formation de site de liaison pour certaines protéines comme l'hexokinase (Young et al., 2007). Une autre hypothèse serait que l'oligomérisation induise la formation d'un pore de plus grande taille pour le passage d'éléments structurés tel que le cytochrome c (Shoshan-Barmatz et al., 2008).

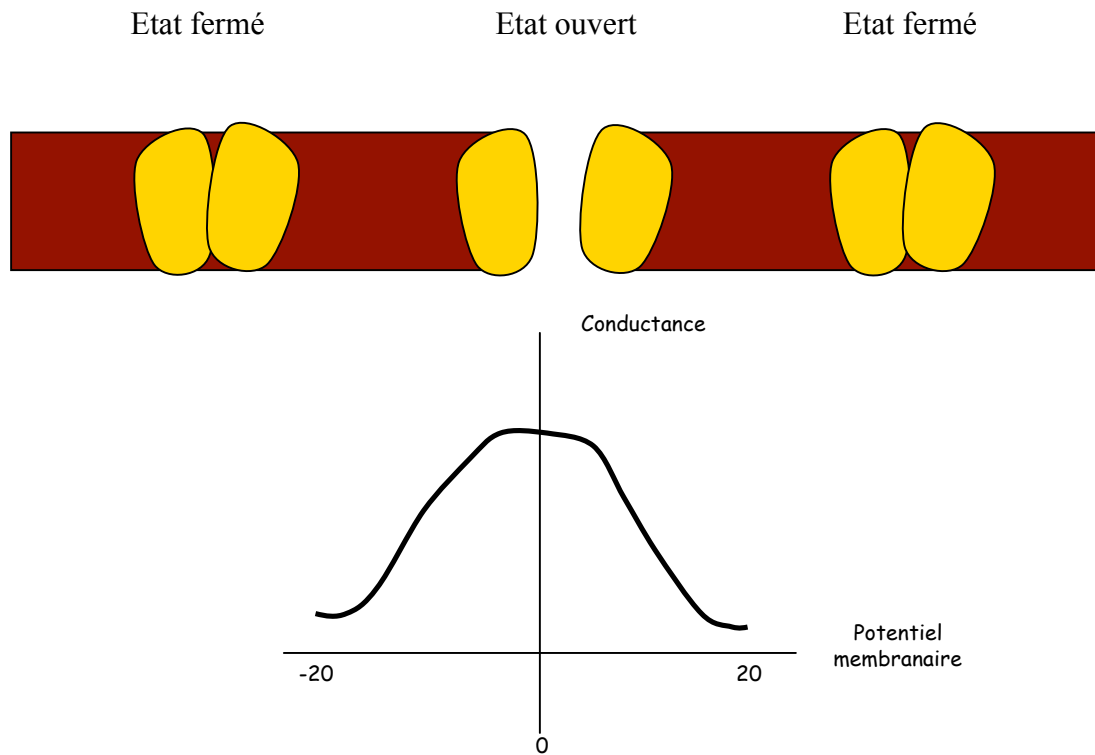


Figure 22

Représentation de la dépendance au voltage des canaux VDAC de *Dictyostelium discoideum* normalisée par rapport à la conductance de 0 mV

D'après Troll et al., 1992

6 Etat conformationnel des protéines VDAC

La protéine VDAC peut exister sous plusieurs conformations (Colombini, 1980, 1989). En effet, il est admis que la protéine VDAC peut adopter un état ouvert et plusieurs états fermés (**Figure 22**) (Schein et al., 1976; Colombini, 1989; Mannella & Guo, 1990). A faible potentiel de membrane, les protéines VDAC possèdent une forte conductance d'environ 4,5 nS en présence de 1 M KCl, c'est l'état ouvert dans lequel le canal est sélectif aux anions. Si le voltage est augmenté d'environ 20-30 mV, que ce soit dans des potentiels positifs ou négatifs, les canaux passent alors dans des états de faible conductance, ce sont les états fermés dans lequel les porines sont sélectives aux cations. La dépendance vis-à-vis du voltage résulte des mouvements des charges présentes à l'intérieur du pore (Doring & Colombini, 1985a, b). Ces charges constituent le « voltage sensor » (capteur de voltage). Elles sont localisées dans les parties N- et C-terminales de la protéine et interviennent dans la sélectivité du canal dans l'état fermé ou ouvert. Ainsi, le changement du potentiel membranaire qui induit des mouvements d'un ou plusieurs « voltage sensor » est à l'origine de réarrangements dans la structure du pore qui impliquent le mouvement de brins β à l'intérieur du canal (Peng et al., 1992; Zizi et al., 1995; Song et al., 1998). Ce sont ces mouvements qui provoquent les changements de conformation de la protéine. Il est à noter que l'hélice α pourrait aussi participer aux processus d'ouverture et de fermeture du canal en se comportant tel un clapet (Blachly-Dyson et al., 1990; Thomas et al., 1993; Mannella, 1997). Ces propriétés sont conservées dans les différents règnes (Colombini, 1989).

7 Fonctions des protéines VDAC

L'activité des cellules requiert un échange efficace de molécules entre le cytoplasme et les mitochondries. Ainsi ancrée dans la membrane externe mitochondriale, la protéine VDAC assure un rôle crucial dans la cellule en régulant les fonctions métaboliques et énergétiques des mitochondries (**Figure 23**).

Modulateurs de l'activité des protéines VDAC

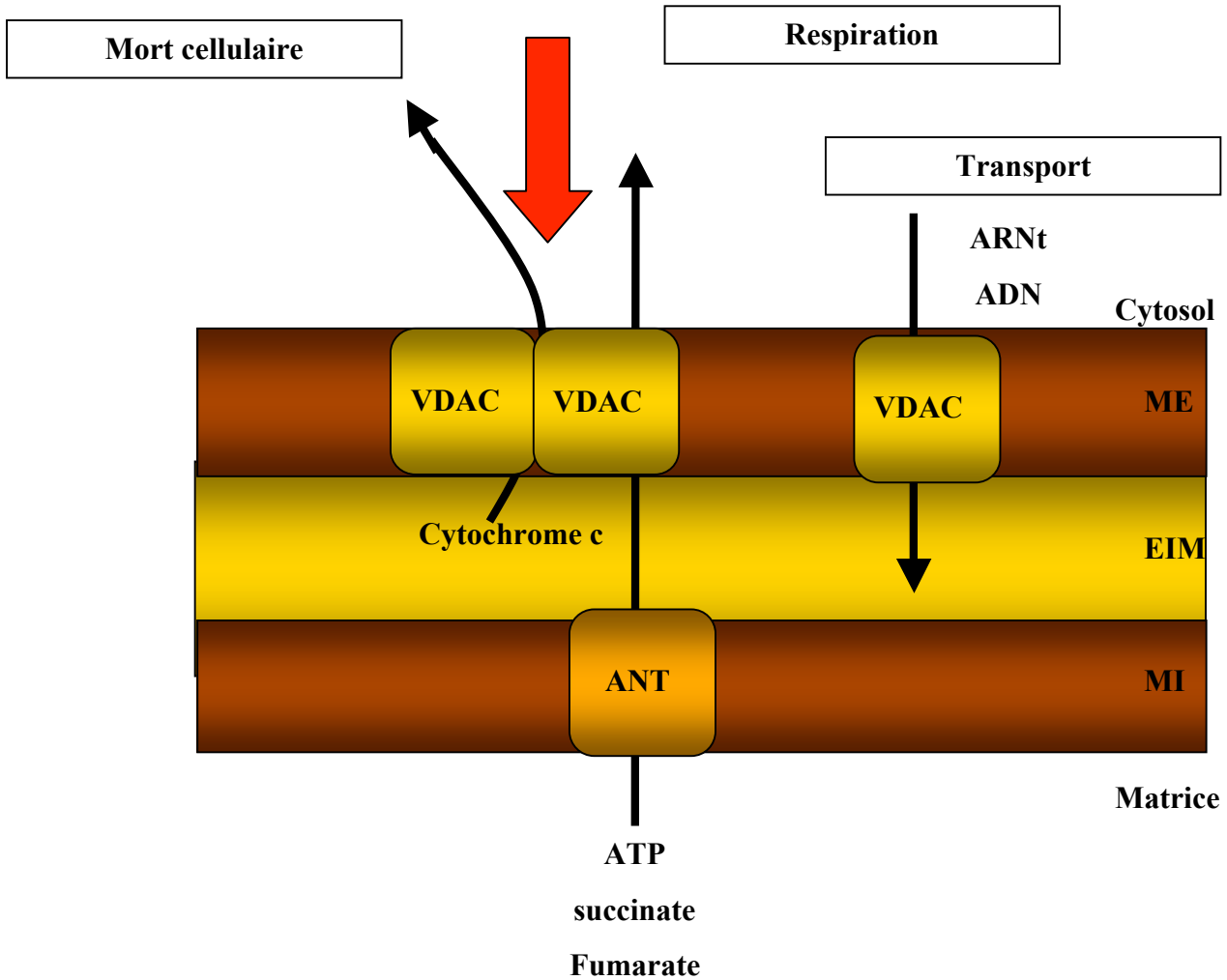


Figure 23
Quelques fonctions des protéines VDAC

7.1 Respiration et croissance cellulaire

Les protéines VDAC ont une fonction essentielle. Elles interviennent dans la respiration cellulaire puisqu'elles sont la principale voie de transport des métabolites tels que les nucléotides adénylés (Liu & Colombini, 1992). La respiration peut être influencée par les modulateurs de la protéine VDAC qui peuvent induire la réduction ou l'augmentation de la perméabilité des porines aux nucléotides (cf paragraphe III.7) (Liu & Colombini, 1992; Zizi et al., 1994).

De plus, elles ont la capacité de fixer des kinases cytosoliques (hexokinase, glycérol kinase, créatine kinase) (Font et al., 1987; Adams et al., 1991) ce qui leur donne un accès préférentiel à l'ATP produit par la mitochondrie. Inversement, les protéines VDAC donnent aux mitochondries, par cette fixation aux kinases, un accès préférentiel à l'ADP produit par ces enzymes (Adams et al., 1991). L'interaction de ces enzymes avec la membrane externe des mitochondries constitue une interaction régulatrice significative du métabolisme puisqu'elle est dynamique, variable selon les tissus et le stade de développement (Adams et al., 1991).

7.2 L'apoptose

L'implication des protéines VDAC dans l'apoptose chez les animaux a toujours été sujet à controverse. Il est suggéré que des molécules pro-apoptotiques interagissent avec le PTP, formé par les protéines VDAC dans la membrane externe et les protéines ANT dans la membrane interne (Kroemer, 1998), pour permettre la libération du cytochrome c. Ce cytochrome va ensuite dans le cytosol activer des enzymes protéolytiques, qui par clivage des protéines induisent la mort des cellules (Thornberry & Lazebnik, 1998). Dans ce schéma, l'ouverture et la fermeture du PTP sont étroitement associées à l'ouverture et à la fermeture de la protéine VDAC (Crompton, 1999). Ainsi, l'interaction entre VDAC et les facteurs pro-apoptotiques tels que Bax et Bak augmente la perméabilité du canal et donc l'ouverture du PTP permettant le passage du cytochrome c et l'apoptose. A l'inverse, les protéines anti-apoptotiques ferment le canal et donc le PTP, empêchant l'apoptose de se réaliser. De plus, il a été démontré que la surexpression de la protéine VDAC dans des cellules humaines, murines, de levure ou de riz induit la mort des cellules. Il semble donc que le niveau

d'expression de cette protéine soit un facteur crucial dans le mécanisme d'induction de l'apoptose (Shoshan-Barmatz et al., 2008; Abu-Hamad et al., 2009).

Cependant plusieurs expériences contredisent ce modèle (Shoshan-Barmatz et al., 2008). Tout d'abord, que la protéine VDAC fasse partie du PTP ou non, des solutés peuvent traverser la membrane externe par les canaux VDAC ouverts. De plus, le calcium, plus fort stimulus pour l'ouverture du PTP, n'a aucun effet sur VDAC. Il a même été démontré que le flux de calcium était plus important à travers VDAC dans son état fermé vu que dans cet état il est sélectif aux cations (Tan & Colombini, 2007). Enfin, des études menées sur des mutants VDAC de souris ont montré la persistance du PTP et l'induction de l'apoptose par les facteurs pro-apoptotiques (Baines et al., 2007). Récemment, il a même été proposé que la fermeture de VDAC induirait l'apoptose des cellules de souris (Vander Heiden et al., 2000; Vander Heiden et al., 2001). Cependant, le mécanisme reste à ce jour inconnu.

Chez les plantes, plusieurs études ont montré l'implication des protéines VDAC dans la mort cellulaire. Par exemple, la surexpression des protéines OsVDAC4 de riz dans des cellules T de Jurkat induit l'apoptose (Godbole et al., 2003). Ce mécanisme peut être bloqué par Bcl-2, facteur anti-apoptotique et le DIDS (acide dihydro-4,4'diisothiocyanostilbene-2,2'-disulfonique), inhibiteur de VDAC (Godbole et al., 2003). De plus, la fixation de l'hexokinase à VDAC inhibe l'apoptose en interférant sur l'interaction entre VDAC et Bax, facteur pro-apoptotique (Godbole et al., 2003) alors que l'inhibition de son expression chez *N. benthamiana* induit la mort des cellules végétales (Kim et al., 2006).

7.3 Autres fonctions

L'implication des protéines VDAC dans différents autres processus a été démontrée chez plusieurs organismes. Ainsi, les protéines VDAC de spermatozoïdes de bovins permettraient de maintenir l'intégrité de l'acrosome et de réguler le volume de sperme (Triphan et al., 2008).

Récemment, il a été démontré que les protéines VDAC pourraient être impliquées dans le cancer. En effet, ces protéines interviennent dans la distribution du cholestérol au sein de la membrane externe mitochondriale animale. Et dans les cellules cancéreuses,

l'expression des protéines VDAC est augmentée (Abu-Hamad et al., 2006) et le taux élevé de cholestérol empêche l'apoptose des cellules (Pastorino & Hoek, 2008). Ceci fait de cette protéine un agent anticancéreux de choix (Simamura et al., 2008).

Chez les plantes, il a été montré que les protéines VDAC interviennent dans la défense contre les pathogènes. Les protéines NbVDAC1 et NbVDAC2 de *N. benthamiana* sont surexprimées lors de l'infection par *Pseudomonas cicorii*. De plus, l'inhibition de l'expression de ces deux protéines VDAC compromet la défense des plantes contre ce champignon (Tateda et al., 2009). Parallèlement, une seconde étude a montré que les transcrits VDAC d'*Arabidopsis thaliana* étaient surexprimés en réponse à une infection bactérienne (Lee et al., 2009).

Enfin, les protéines VDAC interviennent également dans le transport d'acides nucléiques au sein des mitochondries. Ainsi, le laboratoire a démontré qu'elle intervenait *in vitro* dans la translocation des ARNt dans les mitochondries de pomme de terre (Salinas et al., 2006). De plus, VDAC est impliquée dans le transport *in vitro* d'ADN dans les mitochondries de mammifères (Koulintchenko et al., 2006), de levure (Weber-Lotfi et al., 2009) et de plantes (Koulintchenko et al., 2003).

8 Modulation de l'activité des protéines VDAC

L'activité des protéines VDAC peut être modulée de différentes manières. Tout d'abord, les modifications post-traductionnelles peuvent jouer des rôles très importants. Ainsi, des sites de phosphorylation ont été mis en évidence dans la protéine VDAC de rat. Lorsque ces sites sont phosphorylés, en présence de protéine kinase A et d'ATP, le canal se ferme (Bera et al., 1995).

De plus, de nombreux régulateurs physiologiques de l'activité du canal VDAC ont été identifiés. Ces modulateurs peuvent être de nature variée. Ainsi des quantités micromolaires d'aluminium peuvent inhiber la dépendance au voltage d'un canal VDAC de *Neurospora* en neutralisant les charges positives du « voltage sensor » (Dill et al., 1987). Par ailleurs, des

concentrations micromolaires de NADH induisent l'ouverture du canal VDAC humain, de levure et de *Neurospora* et augmentent sa dépendance au voltage (Zizi et al., 1994).

Enfin, les canaux VDAC peuvent également être régulés par des protéines. Il a été identifié par exemple un régulateur du canal localisé dans l'espace inter-membranaire mitochondrial dans de nombreuses espèces (Holden & Colombini, 1988; Liu & Colombini, 1991; Elkeles et al., 1997). Cette protéine de 54 kDa augmente la dépendance au voltage des VDAC, les conduisant à adopter une conformation fermée de faible conductance. De plus, la fixation de kinases telle que l'hexokinase induit la fermeture du canal et empêche le déroulement normal de l'apoptose (Azoulay-Zohar et al., 2004; Shoshan-Barmatz et al., 2008).

9 Plusieurs isoformes, plusieurs fonctions ?

Comme écrit précédemment il existe plusieurs isoformes des protéines VDAC dans les organismes. La présence de diverses formes peut jouer sur leurs fonctions physiologiques. Ainsi, par exemple il a été démontré que, chez l'homme, HVDAC1 lie l'hexokinase mais pas HVDAC2 (Blachly-Dyson et al., 1993). De plus, la protéine YPOR1 de levure présente une activité canal mais pas YPOR2 (Blachly-Dyson et al., 1997). Chez la souris, les différentes isoformes de VDAC ne complètent pas de manière identique le mutant VDAC δ por1 de levure (Sampson et al., 1997). Il semble donc que les différentes isoformes de VDAC présentes dans un organisme assurent des fonctions différentes.

10 Localisation cellulaire des protéines VDAC

10.1 Localisation mitochondriale

Depuis leur première découverte en 1976 dans les fractions mitochondriales de *Paramecium aurelia*, les protéines VDAC d'une grande variété d'eucaryotes ont dans un premier temps été considérées comme étant uniquement localisées dans les membranes mitochondriales. (Yu & Forte, 1996). Cette localisation a d'abord été mise en évidence par des tests électrophysiologiques mettant en évidence l'activité VDAC, puis par des approches

d'immunolocalisation. Ces protéines se regroupent en amas pour former des oligomères souvent associés à des sites de contact entre les membranes internes et externes mitochondriales (Yu et al., 1995).

10.2 Localisation au niveau de la membrane plasmique

C'est en 1989, que les travaux de Thinnes et al. suggèrent pour la première fois que les protéines VDAC sont également localisées au niveau de la membrane plasmique des lymphocytes B (Thinnes et al., 1989). Cependant, l'existence de tels canaux dans la membrane plasmique a souvent été sujet à controverse. C'est en 2000, que les travaux réalisés par Buettner et al. ont levé le doute et montré que sur les deux protéines VDAC1 de souris obtenues par épissage alternatif, la protéine pl-VDAC1 était localisée dans la membrane plasmique alors que la protéine mt-VDAC1 était localisée dans la membrane mitochondriale (Buettner et al., 2000). D'ailleurs, l'interaction des protéines VDAC1 humaines avec les protéines Hsp74, présentes dans la mitochondrie et au contact des endosomes, suggère que les protéines Hsp74 participent à l'adressage des protéines VDAC vers la membrane plasmique (Schwarzer et al., 2002).

De plus, tout comme dans la membrane mitochondriale, les protéines VDAC se regroupent en domaines souvent associés à des caveolines (Bathori et al., 1999; Bahamonde & Valverde, 2003). Certains auteurs proposent que les protéines VDAC pourraient être transportées à la membrane plasmique *via* un complexe cavéoline/cholestérol, puisqu'elles sont capables de lier le cholestérol (De Pinto et al., 1989; Popp et al., 1995).

10.3 Autres localisations

Les protéines VDAC sont aussi présentes dans d'autres compartiments que les mitochondries ou la membrane plasmique. Ainsi, leur présence a été mise en évidence dans le réticulum sarcoplasmique (SR) de cellules musculaires de lapin où elles interviendraient dans le transport d'ATP et du calcium (Shoshan-Barmatz et al., 1996). Cette localisation a également été trouvée dans les cellules musculaires d'amphibiens (Lewis et al., 1994). Les protéines VDAC ont également été localisées au niveau des vésicules d'endocytose du cortex

rénal de rat (Reymann et al., 1998) ou dans la région acrosomale des spermatozoïdes de bovins (Triphan et al., 2007).

Travaux de thèse

Chapitre I :

Etude de l'interaction des protéines VDAC de pomme de terre avec les ARNt

La mise en place d'un système d'importation d'ARNt *in vitro* dans des mitochondries isolées couplé à des analyses biochimiques a permis de montrer chez les plantes l'implication d'une porine mitochondriale de type VDAC (« Voltage Dependant Anion Channel »). A ce jour, aucun motif connu de reconnaissance à l'ARN n'a été identifié sur ce type de protéine.

Ainsi au cours de ma thèse, nous nous sommes dans un premier temps attachés à étudier l'interaction de cette protéine avec les ARNt. Chez la mitochondrie de pomme de terre, deux porines majoritaires de 34 kDa et 36 kDa respectivement appelées VDAC34 et VDAC36 ont été identifiées. Ces deux protéines sont présentes en quantité équivalente dans la membrane externe de mitochondrie de pomme de terre. Lors d'expériences de northwestern réalisées avec les protéines de la membrane externe mitochondriale de pomme de terre ou avec des protéines surexprimées chez *E. coli* et purifiées, il a été observé que VDAC34 interagit plus efficacement avec les ARNt que VDAC36 (Delage, 2003). Deux questions se sont posées :

- D'une part, comment la protéine VDAC34 qui ne possède aucun motif de fixation aux ARN peut-elle fixer les ARNt ?
- D'autre part pourquoi l'une des deux VDAC peut-elle interagir plus efficacement avec les ARNt alors que ces deux VDAC possèdent 75 % d'identité de séquence {Heins, 1994 #102}.

Chapitre II :

Essais de cristallisation des protéines VDAC34 et VDAC36 de pomme de terre

L'étude de l'interaction de VDAC34 avec les ARNt nous a montré qu'elle ne pourra être complètement comprise qu'en déterminant la structure tridimensionnelle de cette protéine. La structure secondaire des protéines de type VDAC a été modélisée chez différents organismes. Ces protéines possèdent généralement une hélice α amphiphile suivie d'une succession de brins β . Cette protéine forme une structure en tonneau de 3 nm de diamètre en 3 dimensions. Malgré l'importance de VDAC dans la biogenèse mitochondriale aucune

structure tridimensionnelle n'a jamais été élucidée chez les plantes. Nous nous sommes donc, dans un deuxième temps, attelés à la purification en condition native de cette porine en vue de sa cristallisation.

Chapitre III :

Recherche de partenaires de VDAC potentiellement impliqués dans le transport des ARNt dans les mitochondries de plantes

Un autre aspect que nous avons étudié concerne l'identification des partenaires membranaires de VDAC potentiellement impliqués dans l'importation des ARNt dans les mitochondries végétales. Pour se faire, nous avons réalisé des fractionnements de membranes mitochondriales en 2 dimensions que nous avons soumis à des expériences de farwestern avec les protéines VDAC natives. Les partenaires des protéines VDAC mis en évidence ont été identifiés par spectrométrie de masse et analysés pour leur capacité à être impliqués dans le mécanisme d'importation des ARNt au sein des mitochondries végétales.

Chapitre IV :

Etude de la sélectivité dans le transport des ARNt dans les mitochondries végétales

Dans le mécanisme d'importation des ARNt dans la mitochondrie, VDAC ne semble pas impliquée dans la sélectivité puisqu'elle est capable d'interagir avec n'importe quel acide nucléique. Cette sélection peut se faire à plusieurs niveaux (qui ne sont pas exclusifs) : lors de l'adressage à la surface des mitochondries, lors de la translocation à travers chacune des deux membranes, par le biais d'une dégradation préférentielle à l'intérieur de la mitochondrie. Aussi, nous nous sommes attachés à développer une approche basée sur le fractionnement mitochondrial et sur la quantification des ARNt par PCR quantitative afin d'analyser et de comprendre à quel niveau la sélectivité de l'importation des ARNt dans les mitochondries végétales se faisait.

Matériel
et
Méthodes

I MATERIEL

1 Matériel végétal

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

2 Souches bactériennes d'*Escherichia coli*

MI5 (Qiagen) : Na1, StrS, RifS, Thi⁻, Lac⁻, Ara⁺, Gal⁺, Mtl⁻, F⁻, RecA⁺, Uvr⁺, Lon⁺

TOPO10F' (Invitrogen) : F'*{(lacI^qTn10(Tet^R)}* *mcrA* *d(mrr-hshRMS-mcrBC)*
p80lacZdM15 dlacX74recA1araD139 d(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG

3 Plasmides

pUC18, pUC19

Le vecteur pUC18 (Stratagène) de 2,7 kb comporte une origine de réplication reconnue dans *Escherichia coli* (*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). Les vecteurs pKS et pSK diffèrent par l'orientation de leur cassette de clonage. Ils possèdent une origine de répllication 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 polymérase des phages Sp6 et T7, ce qui permet la transcription spécifique d'un brin de l'ADN inséré dans la cassette. Ce vecteur contient aussi le gène codant pour la β -lactamase qui confère aux bactéries transformées la résistance à l'ampicilline ainsi qu'un gène de la β -galactosidase permettant la sélection des bactéries ayant un insert, selon le principe de l' α -complémentation.

pQE60

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

4 Constructions

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

-le premier dérive du vecteur pUC18 dans lequel est inséré le gène codant pour l'ARNt^{Ala(UGC)} cytosolique d'*Arabidopsis thaliana*. La construction réalisée permet l'obtention, par transcription *in vitro*, de molécules d'ARNt de taille mature.

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

5 Anticorps polyclonaux

Anti-VDAC 34 /36

Ces anticorps sont dirigés contre les deux protéines VDAC34 et VDAC36 (« voltage dependent anion channel ») de mitochondrie de pomme de terre (34 et 36 kDa respectivement) (Heins et al., 1994). Ils ont été fournis par Udo Klaus Schmitz et Hans-Peter Braun (Allemagne).

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 déshydrogénase E1 α (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 Oligonucléotides

Plusieurs oligonucléotides synthétisés par la société Sigma-Genosys ont été utilisés. Leur température de fusion est estimée par la formule suivante (Sambrook & Russell, 2001) :
 $T_m (^{\circ}\text{C}) = 2 \times (\text{nbre de A} + \text{nbre de T}) + 4 \times (\text{nbre de G} + \text{nbre de C})$.

7 Outils informatiques

7.1 Analyse de séquences

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

7.2 Quantification

Le logiciel MacBAS a été utilisé pour la quantification des protéines transférées sur membrane et colorées au bleu de Coomassie et pour celle des signaux radioactifs obtenus à partir des expositions des plaques de PhosphoImager.

7.3 Logiciels relatifs à la PCR quantitative

7.3.1 Détermination des couples d'oligodésoxyribonucléotides pour PCR quantitative

Les oligonucléotides utilisés dans le cadre des PCR quantitatives ont été dessinés grâce au logiciel Universal Probe Library (Roche Applied Science). Il permet de déterminer les séquences des amorces à utiliser pour l'amplification d'une séquence donnée en minimisant les effets de structure et les amplifications aspécifiques.

7.3.2 Détermination de l'efficacité des couples d'oligodésoxyribonucléotides pour PCR quantitative

Le logiciel LinReg (Ramakers et al., 2003) permet de déterminer l'efficacité d'un couple d'amorces pour l'amplification d'un ADN donné. Ce logiciel établit une régression

linéaire de la partie exponentielle de la courbe d'amplification, courbe obtenue par la détection de la fluorescence émise par le SYBR®Green. Le coefficient de corrélation de la régression linéaire ainsi obtenu permet de juger de l'efficacité de l'amplification réalisée par le couple d'amorces utilisé. Cette efficacité doit être comprise entre 1,8 et 2.

7.4 Bases de données

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

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

NCBI : http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/cobalt.cgi?link_loc=BlastHomeLink

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

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

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

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

Séquences d'ARNt et de gènes d'ARNt :

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

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

Données de séquençage de génomes mitochondriaux :

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

Données des protéines mitochondriales :

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

Données de microarrays d'*A. thaliana* :

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

Programmes de prédiction de structure :

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

HelixDraw : www.bioinf.man.ac.uk

Logiciel pour la conception des amorces pour la PCR quantitative :

Universal Probe Library : <https://www.roche-applied-science.com/sis/rtPCR/upl/ezhome.html>

Logiciel pour la prédiction d'interaction avec les ARN :

BindN : <http://bioinfo.ggc.org/bindn/>

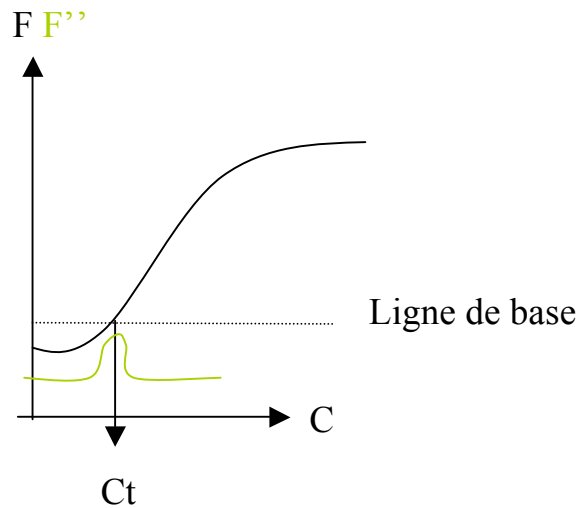


Figure 24

Principe de la quantification d'ADNc par PCR quantitative.

En noir est représentée l'évolution de la fluorescence en fonction du nombre de cycles d'amplification (C)

En vert est représentée l'évolution de l'accélération en fonction du nombre de cycles d'amplification (C).

Le cycle seuil (Ct) correspond au cycle d'amplification pour lequel l'accélération est maximale

II METHODES

1 Techniques spécifiques à l'ADN

1.1 Amplification par PCR (« Polymerase Chain Reaction »)

Il s'agit d'une amplification exponentielle d'un fragment d'ADN réalisée par une série de cycles de type dénaturation-hybridation-élongation avec deux amorces oligonucléotidiques spécifiques des extrémités du fragment à amplifier. Le milieu réactionnel de 50 μ L final contient 5 μ L de tampon PCR 10x, 1,5 mM de $MgCl_2$, 50 pmoles de chacune des 2 amorces, 0,2 mM de chaque dNTP, 0,1 ng d'ADN plasmidique, 2,5 U de *Taq* polymérase (Invitrogen) et de l'eau q.s.p. 50 μ L. La réaction est menée dans un appareil automatisé (icycler, Biorad) selon le programme suivant : une étape de dénaturation de l'ADN de 3 minutes à 94°C suivie de 30 cycles comportant successivement une étape de dénaturation de 30 secondes à 94°C, une étape d'hybridation des amorces de 30 secondes à 10°C en dessous de la température de fusion des oligonucléotides et une étape de synthèse de l'ADN de 30 secondes à 72°C. Les produits synthétisés sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose (cf paragraphe 9.4).

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

1.2 PCR quantitative (qPCR)

1.2.1 Principe de la PCR quantitative et détermination du cycle seuil

La PCR quantitative consiste à suivre l'amplification d'un acide nucléique cible au cours du temps (**Figure 24**). Les quantités relatives présentes dans chaque extrait initial sont ensuite calculées à partir de la cinétique d'amplification. Le suivi de l'amplification des ADNc correspondants aux différents ARNt a été réalisé par l'intermédiaire d'un agent intercalant, le SYBR Green qui fluoresce lorsqu'il s'associe aux molécules d'ADN double brin produit pendant la réaction de PCR. La fluorescence est ainsi directement corrélée à la quantité d'ADN double brin présente dans le milieu réactionnel. A partir de la courbe d'amplification, le cycle seuil (Ct) est déterminé. Il correspond au cycle de PCR à partir duquel la fluorescence émise par le SyBR Green présent dans l'échantillon dépasse le bruit de

fond déterminé par la ligne de base. Au cycle seuil, la quantité d'ADN (N_{Ct}) amplifiée est proportionnelle à la quantité initiale d'ADNc (N_0) présente dans l'échantillon.

1.2.2 Conception des oligonucléotides

Les oligonucléotides ont été dessinés grâce au logiciel Universal Probe Library (Roche Applied Science). Leur efficacité a été vérifiée par le logiciel LinRegPCR (Ramakers et al., 2003). Toutes les analyses ont été opérées grâce au logiciel Light Cycler (Roche).

1.2.3 Réactions de qPCR

Les réactions de PCR ont été réalisées dans 10 μ L de milieu réactionnel composé de 5 μ L de mix LightCycler® 480 *SYBR-Green I Master* (Roche), 2,5 μ M d'oligonucléotides direct et inverse ainsi que de 1 μ L de RT réalisée avec des oligonucléotides spécifiques (cf paragraphe 9.5.3).

Le programme utilisé est le suivant :

- 1) Préincubation, 1 cycle : -95°C, 5 secondes

- 2) Amplification, 40 cycles : -95°C, 10 secondes
 -60°C, 20 secondes
 -72°C, 15 secondes

- 3) Courbe de fusion, 1 cycle : -95°C, 5 secondes
 -65°C, 1 minute
 -97°C continu

LightCycler® 480 *SYBR-Green I Master*: FastStart Taq DNA Polymerase, tampon, dNTP (avec dUTP à la place de dTTP), MgCl₂, *SYBR® Green* (la composition exacte n'est pas donnée par le fabricant).

1.2.4 Détermination des efficacités d'amplification

Les efficacités des différents couples d'amorces ont été déterminées à l'aide du logiciel LinRegPCR (Ramakers et al., 2003) puis validée par la méthode des dilutions sérielles. Cette méthode consiste à réaliser plusieurs dilutions en série, de raison 10, des différents échantillons d'ADNc puis à déterminer le Ct de chacune des dilutions pour chaque couple d'amorces. L'efficacité peut ensuite être calculée à partir de la pente de la droite décrivant l'évolution du Ct en fonction du logarithme décimal de la dilution par l'intermédiaire de la formule :

$$E = 10^{-1 / \text{pente}}$$

1.2.5 Méthode de calcul

Il existe plusieurs méthodes pour déterminer les Ct, nous avons choisi d'utiliser celle du maximum des dérivées secondes pour déterminer les Ct. Cette méthode consiste à calculer la dérivée seconde de la fluorescence en fonction du nombre de cycles, ce qui revient à calculer l'accélération du signal de fluorescence en fonction du cycle d'amplification. Le Ct correspond au cycle pour lequel l'accélération est maximale. Il correspond au cycle de PCR à partir duquel la fluorescence émise par le SyBR Green présent dans l'échantillon dépasse le bruit de fond déterminé par la ligne de base (**Figure 24**).

1.3 Mutagenèse par PCR

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

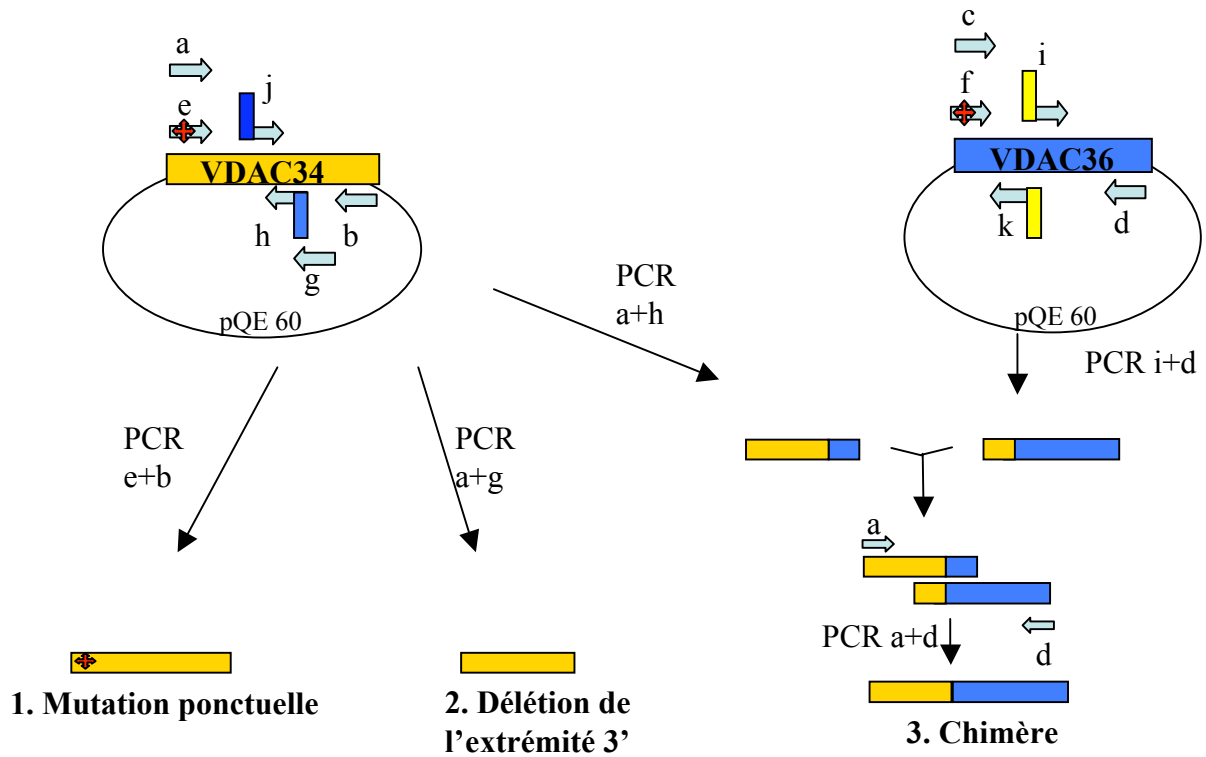


Figure 25

Les trois types de construction réalisées par mutagenèse dirigée par PCR.

Chacune d'elle est schématisée par un exemple :

1. Introduction d'une mutation ponctuelle à l'extrémité 5'
2. Délétion de l'extrémité 3'
3. Construction d'une séquence codant pour une protéine « chimère » entre VDAC34 et VDAC36.

1.3.1 Pour réaliser une mutation ponctuelle à l'extrémité 5'

Dans ce cas, l'un des deux oligonucléotides utilisés lors de la PCR porte une mutation ponctuelle (amorces du type e ou f sur la **Figure 25**).

1.3.2 Pour déléter une partie de l'extrémité 3'

Dans ce cas, l'une des deux amorces est située à l'intérieur de la séquence codante (oligonucléotide de type g sur la **Figure 25**).

1.3.3 Pour construire des séquences chimériques

Prenons l'exemple d'une protéine chimère constituée d'une partie de VDAC34 suivie de VDAC36 (par exemple C7 ou C8 **Figure 25**). Dans un premier temps, deux réactions de PCR sont menées en parallèle : une partie du gène codant VDAC34 est amplifiée par PCR en utilisant des amorces de types a et h, de sorte que l'extension ajoutée en 5' de l'amorce de type h soit complémentaire à la séquence du gène de VDAC36. La seconde réaction PCR est réalisée à partir du gène codant la protéine VDAC36 en utilisant des amorces de type i et d, l'amorce de type i portant une extension en 5' complémentaire à la séquence du gène codant pour VDAC34. Les produits des deux PCR sont alors utilisés ensemble pour effectuer la dernière PCR en présence des deux amorces correspondant respectivement aux extrémités 5' et 3' de chacun des gènes (ici amorces a et d). Ceci permet l'obtention d'un produit PCR chimérique des deux gènes initiaux.

1.4 Electrophorèse 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 2% (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 (0,5 µg/mL).

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

Tampon de charge : Glycérol 30% (v/v), xylène cyanol 0,25% (p/v), bleu de bromophénol 0,25% (p/v)

1.5 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 10 minutes à 5000 g sur colonne Ultrafree-DNA (Millipore).

1.6 Techniques de clonage

1.6.1 Clonage de fragments coupés par des enzymes de restriction

1.6.1.1 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 le ou les enzyme(s) 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 minutes à 14 000 g, le culot est resuspendu dans un volume d'eau adéquat.

1.6.1.2 Ligation

La réaction de ligation est incubée 1 heure à température ambiante ou une nuit à 14°C. Le milieu réactionnel de 20 µL contient : 10 à 20 ng de vecteur digéré, l'insert 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). Une extraction phénolique est ensuite réalisée sur les produits de la ligation et l'ADN contenu dans la phase aqueuse est précipité à l'éthanol puis redissous dans l'eau.

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

1.6.1.3 Transformation et sélection

Après précipitation, les produits de la ligation sont resuspendus dans 10 µL d'H₂O. Un µL du mélange de ligation est ajouté à 60 µL de bactéries compétentes M15 préalablement préparées au laboratoire. Après 1 minute sur la glace, les bactéries sont transformées par électroporation (électroporateur Bio-Rad 2,5 kV, 25 µF, 200 W) puis reprises dans 700 µL de milieu LB. Après une incubation de 1 heure à 37°C, les bactéries sont étalées sur des boîtes de Pétri contenant du milieu LB-agar, 25 µg/mL de kanamycine et 100 µg/mL d'ampicilline. Après une nuit d'incubation à 37°C, les bactéries transformées sont criblées par PCR pour vérifier la présence de l'insert comme décrit au paragraphe 8.8.

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

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

1.6.2 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.

1.6.2.1 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.

1.6.2.2 Méthode

Deux μL du produit de la réaction PCR sont incubés 5 minutes à température ambiante en présence de 2,5 μL d'eau et 0,5 μL de vecteur pCR-II TOPO. Un μL de **solution 1** saline est ajouté et l'incubation est prolongée de 5 minutes. Le mélange est ajouté à 20 μL de bactéries F' TOPO compétentes, et laissé 30 minutes sur glace. Un choc thermique est effectué en plaçant successivement le tube 30 s à 42°C puis 2 minutes sur glace, ce qui permet la transformation des bactéries. 250 μL de milieu **SOC** sont ajoutés et le tube est incubé 30 minutes à 37°C. La suspension bactérienne (100 μL) est étalée sur boîte de Pétri contenant du milieu **LB-agar**, 100 mg/L d'ampicilline, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'X-Gal et 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'IPTG. Après une nuit d'incubation, les bactéries transformées sont identifiées par le principe de l' α -complémentation et criblées par PCR comme décrit au paragraphe 8.8.

Solution 1 : NaCl 1,2 M, MgCl₂ 60 mM

Milieu SOC : tryptone 20 g/L, extrait de levure 5 g/L, NaCl 0,5 g/L, glucose 3,6 g/L, pH 7,0

LB-agar : extrait de levure 5 g/L, bacto tryptone 10 g/L, NaCl 10 g/L, pH 7,0, 1,5% (p/v) d'agar.

1.7 Préparation des bactéries compétentes

Les bactéries d'une colonie isolée sont cultivées dans 50 mL de milieu LB pendant une nuit. Le lendemain, cette suspension est diluée dans 500 mL de milieu LB et mise à cultivée jusqu'à l'obtention d'une densité optique à 600 nm de 0,5. Puis les cultures sont placées 30 minutes dans la glace avant d'être centrifugées 10 minutes 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 reprises 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 réparties dans des tubes par fractions de 50 μ L.

1.8 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, nous préparons un milieu réactionnel de PCR commun contenant les amorces permettant d'identifier l'insert. Ce milieu est réparti en 20 μ L et les bactéries de colonies blanches sont transférées dans ce milieu à l'aide d'un cure-dent. Les étapes et les nombres de cycles sont les mêmes que pour la PCR (cf paragraphe 8.1). La première étape de dénaturation de 3 minutes à 94°C suffit à lyser les bactéries et à libérer l'ADN.

1.9 Préparation de l'ADN plasmidique

Les kits utilisent 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.

1.9.1 Minipréparation d'ADN plasmidique

Le kit de minipréparation Nucleospin® Plasmid (Macherey-Nagel) a été utilisé. En pratique, 3 mL de milieu LB contenant 100 µg/mL d'ampicilline sont inoculés avec une colonie de bactéries puis incubés une nuit à 37°C sous agitation. Deux mL de la culture saturée sont prélevés puis centrifugés 30 s à 11000 g et le surnageant est éliminé. Le culot est remis en suspension dans 250 µL de **tampon de resuspension**, puis les cellules sont lysées par addition de 250 µL de **tampon de lyse alcaline** pendant 5 minutes à température ambiante. L'ADN chromosomique est précipité par 300 µL de **tampon de précipitation** puis éliminé par centrifugation 5 minutes à 11000 g. Le surnageant contenant l'ADN plasmidique est déposé sur une colonne de silice, l'ensemble est centrifugé 1 minute à 11000 g. La colonne est lavée par 450 µL de **tampon de lavage** puis centrifugée 4 minutes à 11000 g. L'élution de l'ADN plasmidique se fait ensuite avec 50 µL d'eau par centrifugation à 11000 g pendant 1 minute après une incubation de 1 minute à température ambiante.

Tampon de resuspension : Tris-HCl 50 mM pH 8, EDTA 10 mM, RNase A 100 µg/mL

Tampon de lyse alcaline : NaOH 200 mM, SDS 1%

Tampon de précipitation : Acétate de potassium 2,8 M, pH 5,0

Tampon de lavage : Tris 100 mM, éthanol 15%, KCl 1,15 M, pH 6,3

1.9.2 Midipréparation d'ADN plasmidique

Le kit Nucleobond® Xtra Midi (Macherey-Nagel) a été utilisé. En pratique, 100 mL de milieu LB contenant 100 µg/mL d'ampicilline sont inoculés avec une colonie de bactéries isolée sur boîte puis incubés une nuit à 37°C sous agitation. Le lendemain, les bactéries sont culotées par centrifugation à 5000g pendant 20 minutes à 4°C et le surnageant est éliminé. Les culots bactériens sont ensuite repris dans 8 mL de **tampon de resuspension**, puis les cellules sont lysées par 8 mL de **tampon de lyse** pendant 5 minutes à température ambiante. Après addition de 8 mL de **tampon de neutralisation**, le lysat est simultanément clarifié et chargé dans le filtre sur la colonne, l'ensemble filtre et colonne ayant été préalablement équilibré par 12 mL de **tampon d'équilibration**. Le filtre est ensuite retiré après un lavage par 5 mL de **tampon d'équilibration** et la colonne est lavée par 8 mL de **tampon de lavage**.

L'ADN plasmidique est ensuite élué avec 5 mL de **tampon d'éluion**. Après précipitation de l'ADN avec 3,5 mL d'isopropanol pendant 2 minutes à température ambiante suivie d'une centrifugation de 30 minutes à 15000g à 4°C, les culots sont lavés avec 2 mL d'éthanol 70% puis centrifugés 5 minutes à 15000g à température ambiante. Les culots secs sont finalement repris dans un volume adéquat de **tampon TE**.

La composition des tampons n'est pas donnée par le fabricant.

1.10 Séquençage de l'ADN

Les séquences d'ADN sont réalisées par Malek Alioua dans le service de séquençage de l'IBMP à l'aide d'un appareil « Applied Biosystems 3100 » (Perkin Elmer). La méthode repose sur une amplification par PCR asymétrique incorporant des didésoxynucléotides, chacun couplé à un fluorophore possédant une longueur d'onde spécifique. Ainsi, lors de la migration sur gel, les fluorophores sont excités par un laser à argon. Les signaux réémis sont transmis au système informatique et analysés.

1.11 Marquage d'oligonucléotide à l'extrémité 5'

Les oligonucléotides synthétisés chimiquement sont marqués radioactivement à leur extrémité 5' par incubation 30 minutes à 37°C dans le milieu réactionnel suivant : 200 nM d'oligonucléotide, 2,5 μCi [γ - ^{32}P]ATP, 1 μL **Tampon PNK 10x**, 10 U de T4 polynucléotide kinase (Fermentas) et de l'eau q.s.p. 10 μL . Le volume est ensuite ajusté à 50 μL d'eau et la radioactivité non incorporée est éliminée par chromatographie d'exclusion sur une colonne de Séphadex G50.

Tampon PNK 10x : Tris-HCl 500 mM pH 7,6, MgCl_2 100 mM, DTT 50 mM, spermidine 1 mM, EDTA 1 mM

1.12 Marquage d'un fragment d'ADN double brin

La sonde radioactive a été réalisée par la technique de PCR. La sonde est amplifiée avec deux amorces déterminées sur un plasmide purifié. Le marquage radioactif est distribué tout le long de la séquence grâce à l'incorporation d' $[\alpha^{32}\text{P}]$ dCTP. Le milieu réactionnel de 50 μL final contient 5 μL de tampon PCR 10x, 2,5 mM de MgCl_2 , 100 μmoles de chacune des 2 amorces, 10 mM de dATP, dTTP et dGTP, 2,5 mM de dCTP, 50 ng d'ADN plasmidique, 50 μCi d' $[\alpha^{32}\text{P}]$ dCTP, 2,5 U de *Taq* polymérase (Invitrogen) et de l'eau q.s.p. 50 μL . L'amplification est réalisée pendant deux cycles de PCR. Le premier cycle comporte une étape de dénaturation de l'ADN de 3 minutes à 94°C, une étape d'hybridation des amorces de 30 secondes à 50°C et une étape de synthèse de l'ADN de 30 secondes à 72°C. Le deuxième cycle comporte une étape de dénaturation de l'ADN de 30 secondes à 94°C, une étape d'hybridation des amorces de 30 secondes à 50°C et une étape de synthèse de l'ADN de 30 minutes à 72°C. La radioactivité non incorporée est éliminée par chromatographie d'exclusion sur une colonne de Séphadex G50.

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

2 Techniques spécifiques à l'ARN

2.1 Extraction d'ARN

2.1.1 ARN totaux de pomme de terre

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°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 éliminés par une précipitation au lithium (LiCl 3,3M ; Tris-HCl 33mM pH 7,5). Après centrifugation 20 min à 15000 g à 4°C, 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*. Celles-ci sont broyées 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, MgCl₂ 10 mM, SDS 1% (p/v)

2.1.2 ARN mitochondriaux de pomme de terre

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

2.2 Electrophorèse dénaturante sur gel de polyacrylamide

La migration sur gel de polyacrylamide est utilisée pour la séparation des molécules d'ARN. Le gel (8 x 12 x 0,03 cm) est préparé à partir d'une solution d'acrylamide/N,N' méthylène bisacrylamide (19/1) à 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 20 mA dans le **tampon TBE 1x**. Le bleu de bromophénol et le xylène cyanol constituent des témoins de migration (l'équivalence en nucléotides (nt) dépend de la concentration du gel : 15 et 60 nt sur un gel 15%). Les acides nucléiques sont ensuite visualisés par autoradiographie s'ils sont marqués ou sous UV après coloration au bromure d'éthidium.

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

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

2.3 Elution des ARN sur gel de polyacrylamide

La technique de coloration utilisée est celle décrite par {Peacock, 1967 #469}, avec quelques modifications. Après migration, les taches d'ARNt sont détectées par coloration du gel dans une **solution de coloration** 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 foncé. Les fragments de gel contenant les ARNt sont ensuite découpés, broyés et les ARNt sont extraits du gel avec 500 µl d'un **tampon d'élution** {Maxam, 1977 #468}. 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 10 minutes à 10 000g et mise à précipiter dans 2,5 volumes d'éthanol et 0,1 volume d'acétate de sodium 1 M pH 4,8 au moins 1 heure à -20°C. Après centrifugation 20 minutes à 4000 rpm, les culots sont repris dans un volume adéquat d'eau.

Tampon d'élution : Acétate d'ammonium 0,5 M, acétate de magnésium 10 mM, EDTA 0,1 mM, SDS 0,1 %

Solution de coloration : bleu de méthylène 0,2%, acétate de sodium 0,2 M pH 4,8

2.4 « Northern blot »

2.4.1 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 scotchs brites. L'électrotransfert est effectué dans du **tampon TAE 0,25x** pendant

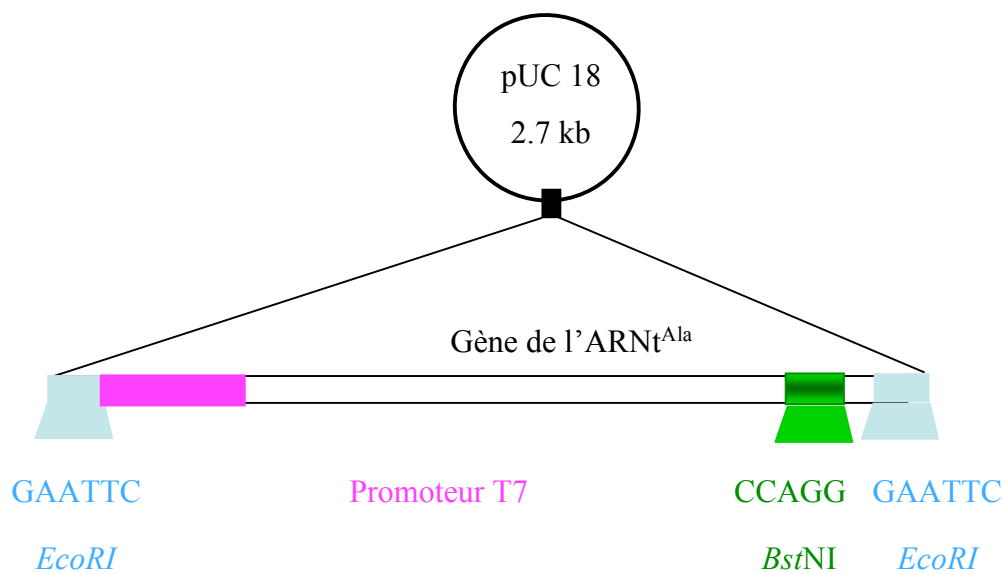


Figure 26

Vecteur pUC 18 contenant le gène d'ARNt^{Ala} cytosolique d'*A. thaliana*.

Le **promoteur T7** en phase avec la séquence codante permet la transcription du gène d'ARNt à partir du premier nucléotide (+1). Le site **BstNI** permet d'obtenir l'extrémité CCA après transcription de l'ADN matrice digéré par cette enzyme. Les sites *EcoRI* ont servi comme sites de clonage.

45 minutes sous une intensité de 60 mA. La membrane est brièvement séchée et les ARN sont fixés par irradiation en lumière UV (366 nm) pendant 3 minutes.

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

2.4.2 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 minutes dans du **tampon SSC 2x** puis une fois 30 minutes 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.

2.5 Transcription *in vitro*

2.5.1 Transcription non radioactive

Après linéarisation du plasmide contenant le gène de l'ARN^t^{Ala} (**Figure 26**) par *Bst*NI (ce site permet de générer l'extrémité CCA à des transcrits correspondant à des ARN^t de taille mature), la transcription est réalisée à l'aide de la T7 ARN polymérase (Promega) pendant 2 à 3 heures à 37°C dans un volume réactionnel de 100 μ L contenant : 5 à 10 μ g d'ADN plasmidique digéré par *Bst*NI, 20 μ L de **tampon de transcription 5x**, 30 μ L d'un mélange de 25 mM de chaque NTP (ATP, CTP, GTP, UTP), 10 μ L du **mix enzymatique** (Kit Ribomax de Promega). Après la réaction de transcription, de la DNase RQ1 est ajoutée (à raison de 1U/ μ g d'ADN initial) et l'ensemble est incubé 15 minutes à 37°C afin de dégrader les ADN. Un volume de phénol saturé en eau est ensuite ajouté. Après 15 minutes d'agitation forte sur vortex puis centrifugation 10 minutes à 12 000 g, la phase aqueuse est

prélevée et mise à précipiter à -20°C pendant au moins une heure avec 2,5 volumes d'éthanol en présence de 0,1 volume d'acétate de sodium pH 4,8 1M. Après centrifugation 20 minutes à 12000 g, le culot est séché à l'air libre et repris dans de l'eau.

Tampon de transcription 5x : HEPES-KOH 400 mM pH 7,5, MgCl_2 120 mM, spermidine 10 mM, DTT 200 mM,

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

2.5.2 Transcription radioactive

Pour l'obtention d'un ARNt radioactif, la transcription du gène de l'ARNt se fait en présence de l' $[\alpha^{32}\text{P}]\text{UTP}$. La transcription se déroule 3 heures à 37°C dans le milieu réactionnel suivant : 4 μg d'ADN plasmidique digéré par *BstNI*, 4 μL de tampon de transcription 5x, 2 μL d'un mélange de NTP (ATP, GTP, CTP 2,5 mM chacun), 0,5 μL d'UTP 0,5 mM, 40 μCi d' $[\alpha^{32}\text{P}]\text{UTP}$, 1 μL de mix enzymatique et de l'eau q.s.p. 20 μL . Après incubation, la radioactivité non incorporée est éliminée par gel filtration sur une colonne de Sephadex G-50.

2.5.3 Transcription inverse suivie d'une PCR (RT-PCR)

L'enzyme utilisée pour réaliser la réaction de transcription inverse est la « SuperscriptTM III » (Invitrogen). Le protocole utilisé est celui recommandé par le fabricant.

Dans un premier temps, 10 pg à 5 μg d'ARN totaux ou mitochondriaux sont ajoutés à 2 pmol de l'oligonucléotide inverse spécifique de l'ARN recherché. Un microlitre de d NTP à 10 mM chacun est ajouté, puis le volume est complété à 13 μL . Le mélange est incubé 5 minutes à 70°C puis immédiatement mis dans la glace pendant au moins 1 minute. 4 μL de tampon de réaction (« **First-Strand Buffer** ») sont ensuite ajoutés ainsi que 1 μL de DTT 0,1 M, 40 unités d'inhibiteur de RNase et 200 unités d'enzyme SuperscriptTM III reverse transcriptase. Les échantillons sont ensuite placés 1 heure à 55°C . Afin d'inactiver la

réaction, une incubation à 70°C pendant 15 minutes est réalisée. Les échantillons sont directement utilisés pour la réaction de PCR (cf paragraphe 9.2).

« **First-Strand Buffer** » : Tris-HCl 200 mM pH 8,3, KCl 375 mM, MgCl₂ 15 mM

2.6 Quantification de l'ADN et de l'ARN

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

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

La quantité d'un fragment d'ADN ou d'ARN peut également être évaluée 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.

3 Techniques relatives aux protéines

3.1 Surexpression de protéines dans *E.coli*

L'ADNc codant pour une protéine d'intérêt est introduit dans le vecteur d'expression pQE60. Le vecteur recombinant ainsi obtenu est ensuite utilisé pour transformer la souche d'expression M15. 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 de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$

d'ampicilline et de 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de kanamycine. La préculture est mise sous agitation une nuit à 37°C. Le lendemain, 300 μL de la préculture sont utilisés pour ensemer 3 mL de LB additionnés de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'ampicilline, de 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de kanamycine, et de 100 μM d'IPTG. L'IPTG va se lier de façon stable au répresseur LacI^q, ce qui va lever l'inhibition qu'il exerçait sur le promoteur. Le promoteur qui devient alors actif peut induire la production de protéines. La mise en culture est ensuite réalisée pendant 3 heures à 37°C sous agitation vive. Les bactéries sont récupérées par centrifugation pendant 5 minutes à 11000 g à température ambiante. Elles sont analysées immédiatement ou conservées à -20°C jusqu'à purification ultérieure.

3.2 Techniques de purification de protéines

Les purifications de protéines à partir d'une petite préparation ou d'une grande préparation sont faites avec deux méthodes différentes qui utilisent le même principe. En effet, les protéines surexprimées avec le vecteur d'expression de type pQE possèdent une queue polyhistidine. Cette queue poly-histidine permet, grâce à son affinité pour le nickel, de fixer la protéine sur une matrice enrobée de nickel. Les protéines ainsi purifiées sont ensuite récupérées en rajoutant de fortes concentrations d'un analogue de l'histidine, l'imidazole. La purification peut se faire soit en conditions natives soit en conditions dénaturantes en présence d'urée 8 M.

3.2.1 Petites préparations (3mL)

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

Après obtention des bactéries surexprimant la protéine recombinante (cf paragraphe ci-dessus), celles-ci sont lysées par 3 cycles de congélation dans l'azote liquide/décongélation à température ambiante. La remise en suspension du culot se fait par ajout de 200 μL de solution de lavage. Les protéines VDAC que nous voulons purifier sont des protéines membranaires très insolubles, l'urée ajouté entraîne la dénaturation des protéines et facilite

leur solubilisation. Après 10 minutes d'agitation douce, 60 μL d'une solution de billes magnétiques enrobées de nickel sont ajoutées. Le mélange est ensuite placé dans une barre magnétique adaptée aux microtubes. Celle-ci va retenir contre la paroi des microtubes les billes magnétiques de nickel où sont accrochées les protéines d'intérêt. Le surnageant est enlevé et les billes sont lavées 3 fois avec 300 μL de la solution de lavage. L'élution des protéines se fait par l'ajout de 50 μL de solution d'élution. Après 2 minutes à température ambiante, le mélange est de nouveau placé dans la barre magnétique. Le surnageant contenant les protéines décrochées des billes est récupéré.

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

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

3.2.2 Grandes préparations (500 mL)

Pour les grandes préparations, la purification des protéines a toujours été faite avec la matrice Ni-NTA-agarose de Qiagen en conditions natives. La préculture est réalisée à l'aide d'une colonie incubée dans 50 mL de LB additionnée de 100 mg/mL d'ampicilline. Le lendemain les 50 mL de bactéries sont induites dans 500 mL de LB additionné de 100 mg/mL d'ampicilline et de 100 μM d'IPTG pendant 5 heures à 37°C sous agitation. Les bactéries sont ensuite centrifugées 15 minutes à 8000 rpm (JLA 10.5) et le culot est remis en suspension dans 30 mL de **tampon A**. L'ouverture des cellules est réalisée par addition de lysozyme (1 mg/mL de suspension) pendant 30 minutes à 4°C puis par 10 mL de Triton X-100 0,2% pendant 10 minutes à 4°C. Après centrifugation 30 minutes à 3000 g à 4°C, le culot est remis en suspension dans 15 mL de **tampon B** et mis sous agitation pendant 45 minutes à température ambiante. A ce stade les protéines sont solubilisées dans l'urée. La suspension est ensuite incubée toute la nuit sous agitation à 4°C en présence de 1 mL de matrice Ni-NTA agarose préalablement équilibrée avec 2 volumes de **tampon B**. La matrice est alors coulée dans une colonne à 4°C puis lavée avec 10 mL de **tampon B**, 2,5 mL de **tampon C** et 2,5 mL de **tampon D**. Ces étapes permettent de renaturer les protéines. Deux éluions sont alors réalisées : la première avec 2,5 mL de **tampon E** qui permet de récupérer les protéines natives et la seconde avec 2,5 mL de **tampon F** contenant de l'urée qui permet de décrocher les

protéines encore fixées à la matrice. Après dilution du premier éluat dans le **tampon E**, la purification est répétée sur cette fraction et sur la fraction non retenue de la colonne.

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

Tampon B : Tris-Maléate 50 mM pH 8,2 MgCl₂ 5 mM, urée 8 M, n-octyl glucoside 2%

Tampon C : Tris-Maléate 50 mM pH 8,2 MgCl₂ 5 mM, urée 4 M, n-octyl glucoside 2%

Tampons D : Tris-Maléate 50 mM pH 8,2 MgCl₂ 5 mM, n-octyl glucoside 2%

Tampons E : HEPES 25 mM pH 7,5, MgCl₂ 5 mM, n-octyl glucoside 2%, Imidazole 250 mM

Tampons F : Tris-Maléate 50 mM pH 8,2 MgCl₂ 5 mM, urée 8 M, Imidazole 250 mM

3.3 Techniques de concentration des protéines : cellule de concentration (« centrifugal filter device » 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.

3.4 Quantification des protéines

La quantification des protéines est faite par la méthode de Bradford. Cette méthode est basée sur la modification de la longueur d'onde d'absorption du bleu de Coomassie G-250 en milieu acide après sa fixation sur les acides aminés (595 nm) (Bradford, 1976). Un mL de réactif de Bradford (BioRad) et 100 µL d'extrait protéique à quantifier sont mélangés et l'absorbance est mesurée à 595 nm. Cette mesure de DO permet de déterminer la quantité de protéines présentes en se référant à une gamme étalon établie avec des quantités connues de BSA. 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)

3.5 Electrophorèse sur gel de polyacrylamide

3.5.1 Electrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)

La séparation des protéines est réalisée par migration électrophorétique en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (Laemmli, 1970). Les mailles de la matrice sont définies par le rapport polyacrylamide/N,N' méthylène bisacrylamide (37.5/1 dans le cas de gel de protéines). Le gel (8 cm x 12 cm x 0,1 cm) comporte deux parties : un **gel de concentration** (hauteur 3 cm) et un **gel de séparation**. La polymérisation de l'acrylamide est catalysée par l'ajout d'APS 0,1% (p/v) et de TEMED 0.01% (v/v). Les protéines additionnées de 0,2 volume 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.

Gel de concentration : Acrylamide 5%, Tris-HCl 125 mM pH 6,8, SDS 0,1% (p/v)

Gel de séparation : Acrylamide 12 à 15% selon la taille des protéines à fractionner, Tris-HCl 380 mM pH 8,8, SDS 0.1% (p/v)

Tampon de charge : Tris-HCl 100 mM pH 6,8, glycérol 10%, SDS 4% (p/v), bleu de bromophénol 0,05% (p/v), β -mercaptoéthanol 4% (v/v)

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

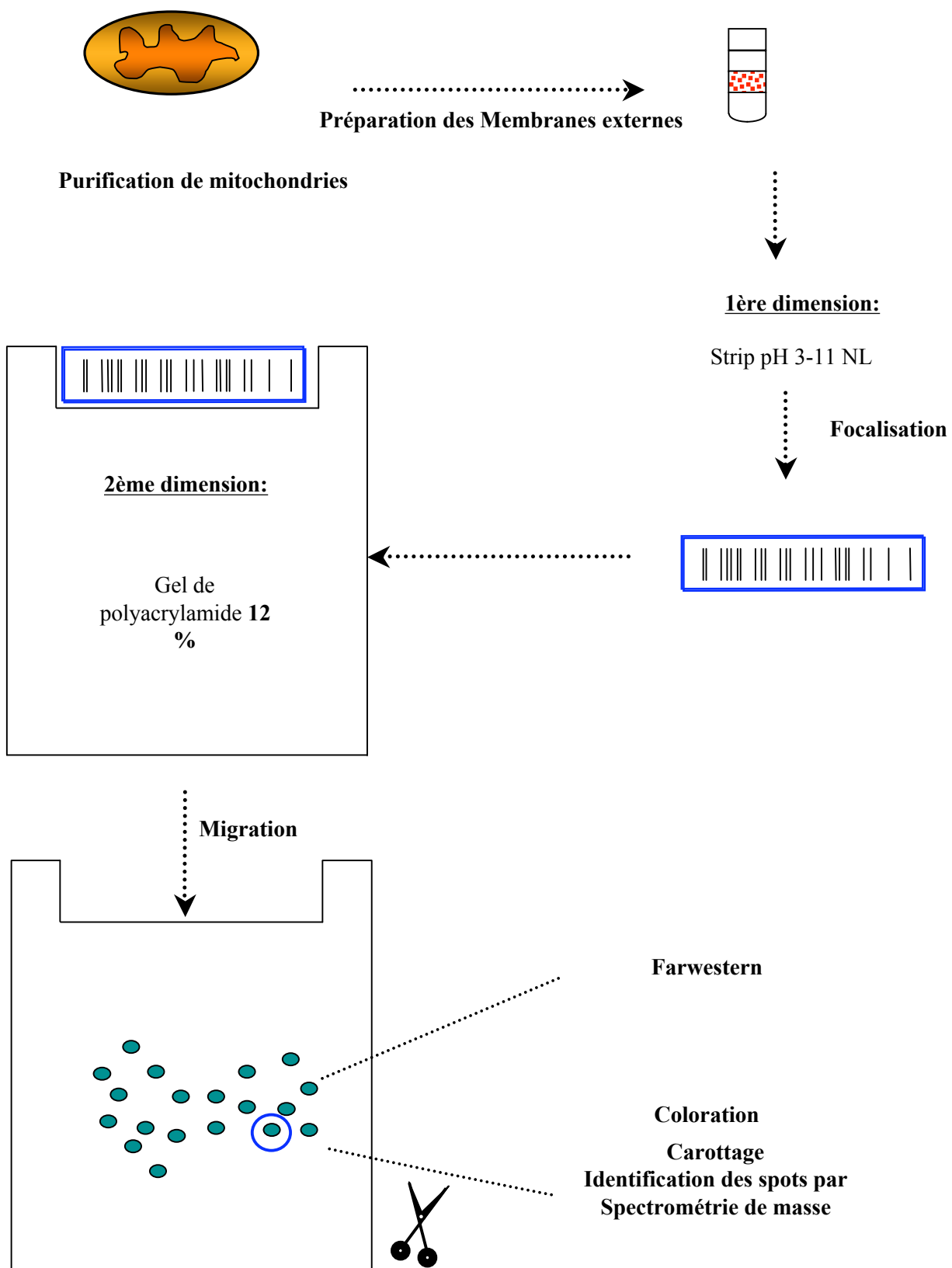


Figure 27
Fractionnement des protéines par électrophorèse bidimensionnelle sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes.

3.5.2 Electrophorèse bidimensionnelle

Cette technique d'électrophorèse bidimensionnelle permet de séparer des protéines selon leur pH isoélectrique puis lors de la seconde dimension selon leur poids moléculaire par un SDS-PAGE classique (**Figure 27**).

Les focalisations préisoélectrique et isoélectrique ont été réalisées à l'aide des gels ReadyStrip™ IPG Strip de 18 cm pH 3-11NL (BIO-RAD). Les strips sont tout d'abord réhydratés activement (50V) 15 heures en présence de mitochondries ou de membranes externes préparées dans du **tampon IEF**.

La focalisation est ensuite lancée comme suit :

Etape	Voltage à atteindre	Montée	Durée	Température
1	250 V	Rapide	15 minutes	20°C
2	3000 V	Progressive	3 heures	20°C
3	3000 V	Rapide	10 000 VH	20°C
4	500 V	Rapide	5 heures	20°C

Pour la deuxième dimension, les strips sont équilibrées dans du **tampon d'équilibration** avec 1% DTT pendant 15 minutes puis dans du **tampon d'équilibration** avec 4% d'iodoacetamide pendant 15 minutes. Chaque strip est ensuite placée au dessus d'un gel de polyacrylamide 12% et l'électrophorèse est lancée 15 minutes à 20V puis 60 minutes à 150V.

Tampon IEF : urée 7M, thiourée 2M, CHAPS 4% (p/v), DTT 20 mM, ampholyte 0,2% (p/v), bleu de bromophénol 0,004%

Tampon d'équilibration : Urée 7M, glycérol 30%, Tris-HCl 0,05M pH 8,8, SDS 2%.

3.6 Identification des protéines par spectrométrie de masse

Lors d'une analyse en spectrométrie de masse, une protéine est digérée par la trypsine (**Figure 28**). Cette digestion va entraîner la création de différents peptides. Ces peptides entrent ensuite dans la source du spectromètre de masse qui va donner pour chaque peptide

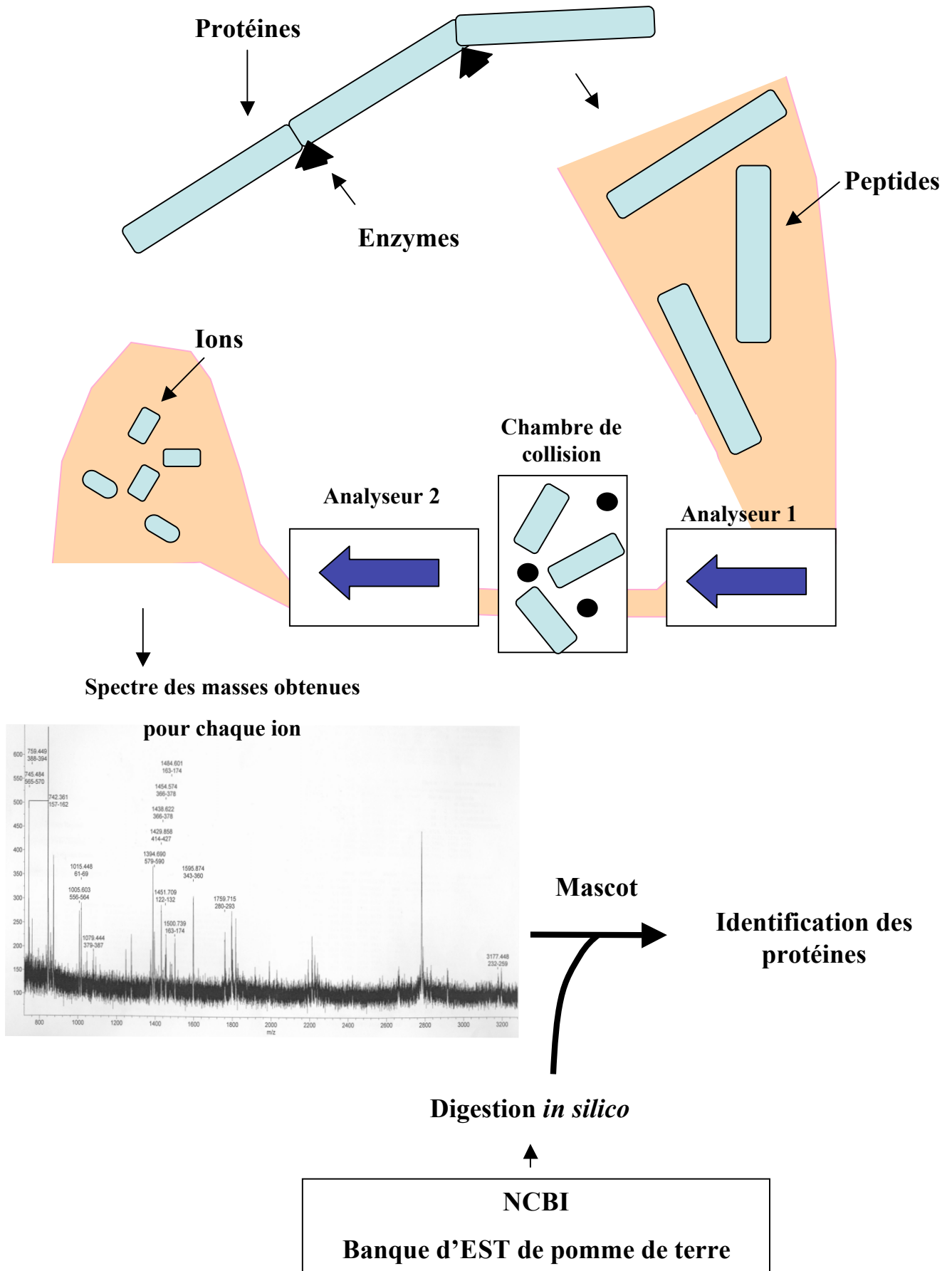


Figure 28

Schéma de l'analyse par spectrométrie de masse

une masse sous la forme d'un spectre. Ce spectre est directement interprété pour donner la séquence d'acides aminés correspondante. Une fois les spectres de tous les peptides obtenus pour une protéine, il s'agit d'identifier les protéines.

Pour se faire, les listes de masses des peptides produits sont comparées à des listes de masses de peptides théoriques issus de la digestion *in silico* des protéines présentes dans des banques de données. Les banques de données que nous avons utilisées sont la banque d'EST (étiquettes de *gènes* exprimés) de pomme de terre et la banque généraliste NCBI's Entrez Protein (Entrez Protein du National Center for Biotechnology Information).

La comparaison des listes de masses entre les peptides analysés et les peptides théoriques issus de la digestion *in silico* a été réalisée par l'algorithme MASCOT développé par Matrix Science (<http://www.matrixscience.com>). Cet algorithme est basé sur une approche probabilistique (Perkins et al., 1999). En effet, la probabilité d'identité est mesurée par un « score » qui dépend entre autre du nombre de peptides attribuées à la protéine et du nombre d'entrées de la banque. L'algorithme Mascot se fonde sur des identités strictes de masses entre les peptides analysés et les peptides théoriques issus de la digestion *in silico* de l'ensemble des protéines présentes dans les banques de données. Dans cette approche « non tolérante aux erreurs », l'exigence d'identité parfaite entre les peptides analysés et les peptides théoriques présents dans les banques induit que la moindre différence de séquence et donc de masse entre les peptides analysés et ceux présents dans les banques est critique et conduit rapidement à l'impossibilité d'identifier la protéine. De plus, cet algorithme permet la comparaison de séquences peptidiques par rapport aux différentes séquences des banques et donc d'identifier des protéines par homologie de séquence. En effet, il permet de rechercher les séquences protéiques ou les séquences issues de la traduction des génomes ce qui permet de s'affranchir des problèmes d'annotation ou de protéines issues de familles multigéniques (Delalande et al., 2005). Il est donc possible de travailler et d'identifier des protéines d'organismes dont le génome n'a pas encore été séquencé.

3.7 Détection des protéines après fractionnement électrophorétique

3.7.2 Coloration au bleu de Coomassie

Pour un gel analytique, les protéines sont révélées par incubation du gel dans une **solution de coloration** pendant 1 heure. L'excès de colorant est éliminé par plusieurs passages successifs dans une **solution de décoloration**.

Lorsque les protéines sont transférées sur une membrane, les protéines sont révélées par incubation du gel dans la **solution de coloration** pendant 5 minutes. L'excès de colorant est éliminé par plusieurs passages successifs dans une solution contenant 7% (v/v) d'acide acétique et 50% (v/v) de méthanol.

Solution de coloration : acide acétique 10% (v/v); méthanol 40% (v/v); bleu de coomassie R250 0.125% (p/v)

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

3.7.1 Coloration à l'argent

Cette technique permet de colorer de très petites quantités de protéines fractionnées sur gel de polyacrylamide en augmentant la sensibilité de détection des protéines. Les lavages ont toujours été réalisés avec 10 volumes de gel.

La première étape consiste en une fixation de 40 à 60 minutes dans le **tampon 1**. Puis un lavage dans le **tampon 2** est réalisé pendant 30 minutes. L'étape de sensibilisation consiste en une incubation de 30 minutes dans le **tampon 3**. Trois lavages successifs de 10 minutes dans les **tampons 2** et **4** puis dans de l'eau sont effectués. Le gel est ensuite coloré 15 à 20 minutes dans le **tampon 5**. Il est ensuite rincé 20 secondes dans 5 volumes d'eau puis dans 5 volumes de **tampon 6** en agitant doucement. Le développement est réalisé par agitation constante dans 100 mL de **tampon 7** pendant 30 secondes. Lorsque la coloration noire s'intensifie, 200 mL de **tampon 7** frais sont ajoutés jusqu'à ce que les bandes soient complètement colorées. Trois lavages de 10 minutes sont ensuite réalisés dans le **tampon 8** permettant d'amplifier la coloration et le développement est arrêté par passage dans le **tampon 9** pendant 5 minutes. Une décoloration de 10 minutes est ensuite effectuée dans le **tampon 10** puis 3 lavages dans de l'eau sont réalisés. Le gel est ensuite séché.

Tampon 1 : méthanol 50% (v/v), TCA 12% (p/v), CuCl_2 2% (v/v)

Tampon 2 : éthanol 10% (v/v), acide acétique 5% (v/v)

Tampon 3 : KMnO_4 0,01% à partir de 1% fraîchement préparé

Tampon 4 : éthanol 10%

Tampon 5 : AgNO_3 0,2% (p/v)

Tampon 6 : K_2CO_3 10 % (p/v)

Tampon 7 : formaldéhyde 0,02%, K_2CO_3 2% (p/v)

Tampon 8 : K_2CO_3 1% (p/v)

Tampon 9: acide acétique 1%

Tampon 10 : glycérol 3% (v/v), méthanol 45% (v/v), acide acétique 7,5% (v/v)

3.8 Immunorévélation de type «western blot »

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

3.8.1 Transfert des protéines sur membrane

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

Tampon de transfert : Tris 48 mM, glycine 39 mM

3.8.2 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)

3.8.3 Fixation des anticorps

La membrane est équilibrée et les sites aspécifiques de fixation sont saturés par incubation, pendant 1 heure sous agitation constante, dans du **tampon bloquant**. L'anticorps primaire spécifique de lapin est ajouté à la solution, puis l'ensemble est incubé toujours sous agitation constante, une nuit à 4°C ou 1 à 2 heures à température ambiante. La membrane est ensuite lavée 3 fois 10 minutes 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 minutes dans le **tampon bloquant** et 3 fois 10 minutes avec le **tampon de lavage** avant révélation.

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

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

3.8.4 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.

3.9 Technique de « farwestern »

Cette technique permet de mettre en évidence des interactions entre une protéine purifiée et des protéines transférées sur une membrane. Des protéines mitochondriales ou de membrane externe sont fractionnées par un gel de polyacrylamide dénaturant de 12% puis transférées sur une membrane Immobilon-P (Millipore). La membrane est lavée deux fois 15 minutes avec du **tampon de renaturation** pour éliminer le SDS puis incubée 15 heures dans ce même tampon pour renaturer les protéines transférées. La membrane est saturée dans du **tampon de renaturation** contenant 5% (p/v) de lait écrémé pendant 1 heure. La membrane est ensuite incubée avec la protéine purifiée (10 mg/mL) dans du **tampon de renaturation** contenant 2% (p/v) de lait écrémé pendant 15 heures à 4°C. Après trois lavages avec du tampon de renaturation, une immunodétection est réalisée avec des anticorps dirigés contre la protéine purifiée

Tampon de renaturation : Tris-HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 75 mM, MgCl₂ 50 mM, NP 40 0,1%.

3.10 Technique de diffusion élastique de la lumière « DLS »

La technique de DLS permet de déterminer la taille d'une particule, d'un complexe et donc de visualiser en temps réel la formation d'un complexe. En pratique, un laser émet un rayon monochromatique qui éclaire l'échantillon en solution contenu dans une cuve en quartz. Une partie de la lumière est transmise mais une autre fraction est diffusée par les particules en solution. Un détecteur permet de mesurer l'intensité de lumière diffusée en fonction de la distribution en taille des particules. Ainsi, ce qu'on mesure en DLS c'est un coefficient de diffusion. On en déduit un diamètre de particule (exprimé en nm) en faisant l'approximation que la particule en question est sphérique (formule de Stokes-Einstein). De là, on peut estimer la masse moléculaire correspondante.

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

3.11.1 Technique de « northwestern »

Cette technique permet l'identification des protéines interagissant avec les ARN. Nous avons utilisé celle décrite par (Adhya et al., 1997).

Les protéines fixées sur la membrane Immobilon-P sont renaturées une nuit à 4°C dans du tampon de renaturation. Le NP 40, détergent non ionique, permet une meilleure élimination du SDS. Après 4 lavages de 15 minutes de la membrane dans le même tampon à 4°C sous agitation douce, celle-ci est saturée 5 minutes à température ambiante dans du tampon de blocage. Le filtre est alors mis en présence de 10^6 cpm du transcrit d'ARNt radiomarqué (cf paragraphe 9.5.2) dans 5 mL de tampon d'hybridation et incubé une nuit à 4°C. Après 4 lavages de 5 minutes à 4°C avec le tampon de lavage, la membrane est séchée puis mise en autoradiographie et/ou exposée contre une plaque de PhosphoImager.

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

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

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

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

3.11.2 Technique du gel retard

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

3.11.2.1 Préparation de l'échantillon

La réaction est faite dans un volume réactionnel de 9 μL comprenant : 0 à 21 pmol de la protéine native, 2 μL de **tampon gel retard 5x**. Le milieu est incubé 10 minutes à température ambiante. Dix fmol d'ARNt radiomarqué sont ensuite ajoutés et l'ensemble est incubé 20 minutes à température ambiante. Avant migration, le milieu est additionné d'un μL de **tampon de charge**.

Tampon gel retard 5x : Glycérol 20 %, MgCl_2 5mM, EDTA 2,5 mM, DTT 2,5 mM, NaCl 250 mM, Tris-HCl 50 mM pH 7,5

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

3.11.2.2 Préparation du gel

Le gel est préparé à partir d'une solution d'acrylamide/N,N' méthylène bisacrylamide (19/1) à 4% dans du **tampon TBE 0,5x**. La polymérisation du gel est catalysée par l'addition d'APS 0,04% (p/v) et de TEMED 0,04% (v/v). Avant de charger les échantillons, le gel est mis sous une tension de 350 V pendant 10 minutes. La migration s'effectue ensuite pendant 20 minutes à 350 V dans le **tampon TBE 0,5x**. Le gel est fixé dans une solution d'acide acétique 10% (v/v) et d'éthanol 20% (v/v) puis séché et exposé contre une plaque de PhosphorImager (Fuji) ou mis en autoradiographie.

Tampon TBE 0,5x : Tris 45 mM, EDTA 1,25 mM pH 8,3, acide borique 45 mM

3.12 Techniques de cristallisation des protéines

La cristallogénèse est la formation d'un cristal, c'est à dire que c'est le passage d'un état désordonné à un état ordonné solide. Cette transition est contrôlée par des lois cinétiques complexes. La fabrication d'un cristal se déroule sous le contrôle de différents facteurs tels que la température, la pression, le temps d'évaporation, la force ionique, etc. La nucléation correspond à l'apparition d'une phase cristalline stable. La croissance est le processus qui va suivre la nucléation et permettre l'augmentation de taille des noyaux pour conduire aux

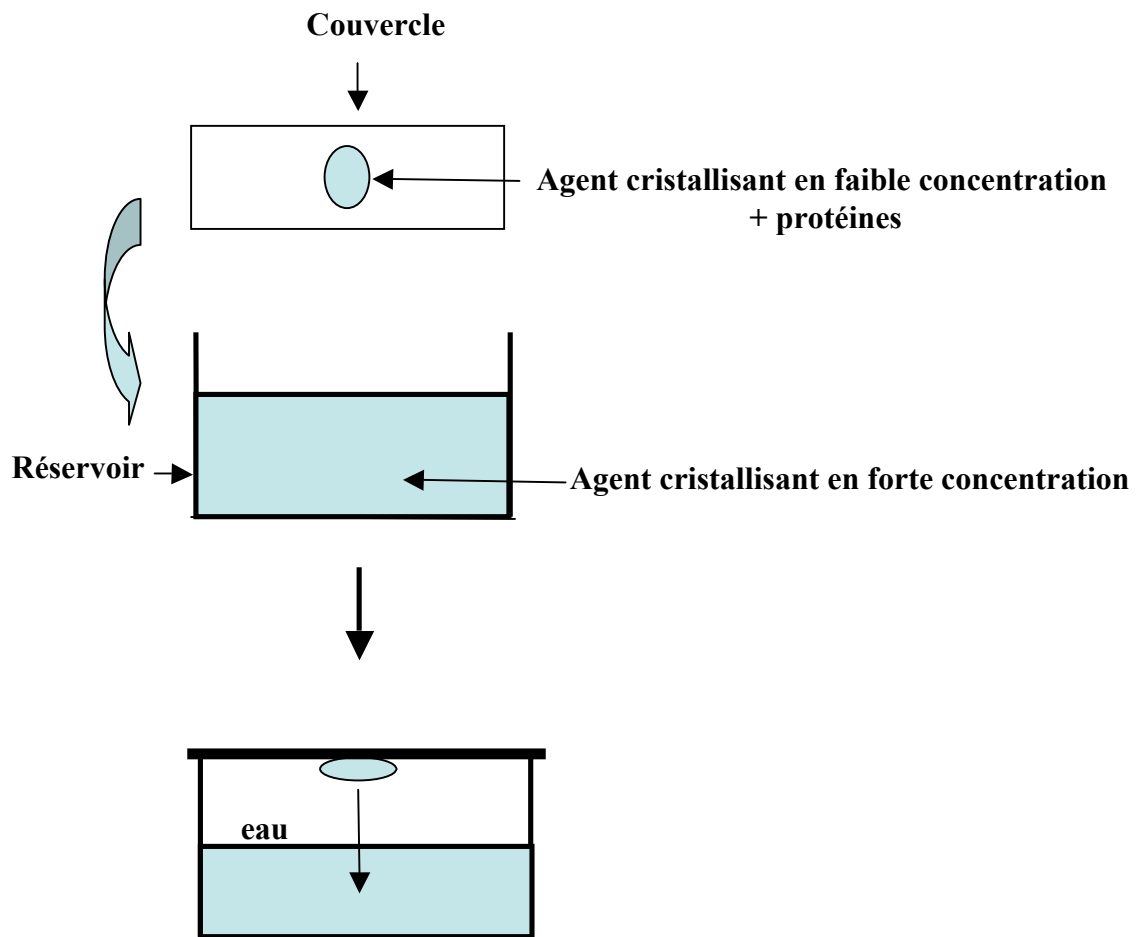


Figure 29
Schéma de la technique de diffusion de vapeur

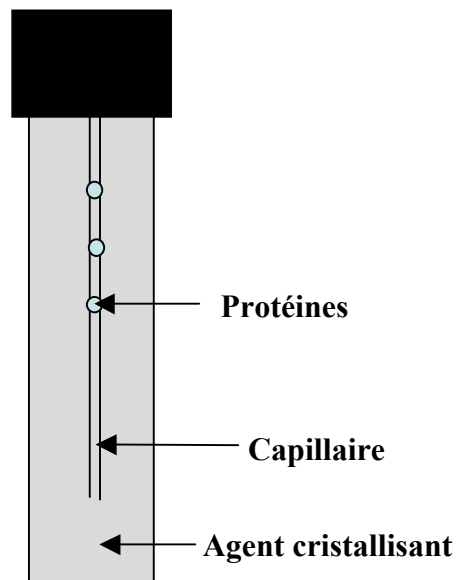


Figure 30
Schéma de la technique de diffusion contre capillaire

cristaux. Elle est caractérisée par l'empilement à la surface du cristal de nouvelles particules. Ainsi, un cristal est composé de particules identiques parfaitement empilées de façon régulière et périodique dans les trois dimensions de l'espace. L'obtention de cristaux est subordonnée à l'obtention de protéines pures et concentrées mais aussi et surtout à la mise au point des conditions de nucléation. Cette mise au point consiste à rechercher les agents cristallisants ainsi que les conditions de concentration et de pH qui permettront la nucléation des cristaux.

3.12.1 Technique de diffusion de vapeur

Une méthode classique de cristallisation est la diffusion de vapeur ou technique de la goutte suspendue. Cette technique consiste à placer les protéines dans une solution contenant un agent cristallisant en faible concentration (**Figure 29**). La goutte ainsi formée est suspendue au-dessus d'un réservoir contenant une solution plus concentrée en agent cristallisant. Ainsi, comme le réservoir est plus concentré que la goutte, l'eau diffuse de la goutte vers le réservoir. La protéine se concentre, cristallise et croît.

3.12.2 Technique de diffusion contre un capillaire

Cette technique consiste à placer les protéines purifiées et concentrées dans un capillaire. L'ensemble est ensuite plongé dans une solution d'agent cristallisant qui va entrer dans le capillaire et permettre la cristallisation des protéines (**Figure 30**).

4 Techniques relatives aux mitochondries de plantes

4.1 Purification de mitochondries de pomme de terre

Ce protocole est une combinaison des techniques décrites par (Neuburger et al., 1982) et par (Struglics et al., 1993). Le rendement est d'environ 10-15 mg d'équivalents de protéines mitochondriales par kg de tubercules de pommes de terre. Toutes les étapes se déroulent à 4°C (**Figure 31**). Les tubercules sont pelés, coupés en morceaux. Pour 5 kg de tubercules, la

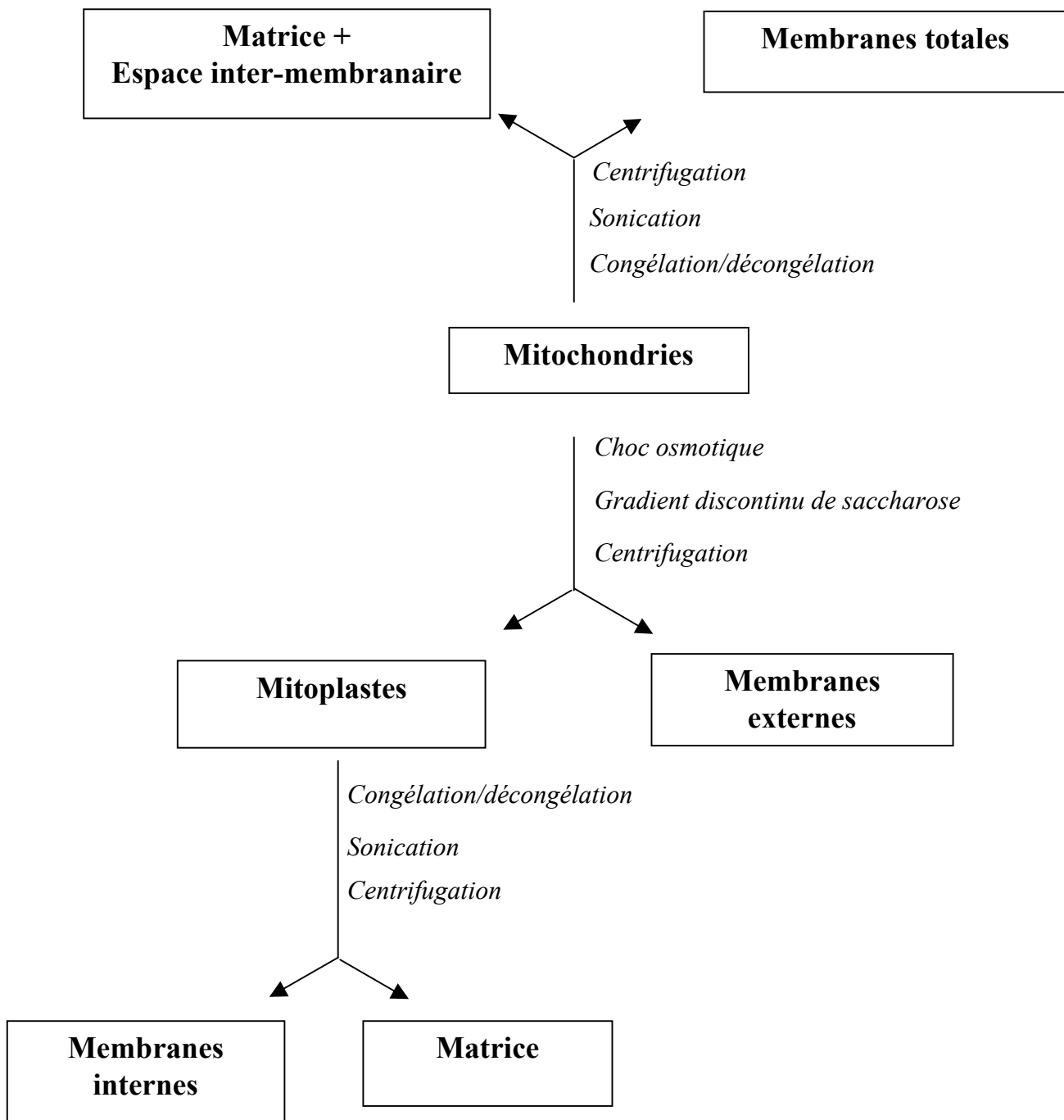


Figure 31

Les différentes étapes de fractionnement des sous-compartiments de mitochondries de pommes de terre.

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 K_2HPO_4 1 M. Il est préférable de laisser décanter la solution quelques minutes (culot d'amidon) avant de la filtrer sur une toile de Nylon de 46 μm de diamètre de maille. La solution est ensuite enrichie en mitochondries par une série de centrifugations différentielles à basse vitesse (1600 g, rotor Beckman J6B) pour éliminer l'amidon résiduel et les débris cellulaires, puis à haute vitesse (16000 g, rotor Beckman JA10.5 puis JA25.5) répétées deux fois. Les mitochondries sont enfin purifiées sur des **gradients de Percoll** de 30 mL (40000 g pendant 60 minutes, rotor Beckman JA25.5). Trois lavages successifs avec le **tampon de lavage** permettent l'élimination du Percoll. Pour une utilisation ultérieure, les mitochondries sont culotées, congelées dans l'azote liquide et conservées à -80°C .

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

Tampon d'extraction 3x : Saccharose 0,9 M, diphosphate de sodium 90 mM pH 7,5, EDTA 6 mM; PVP K25 2,4% (p/v), cystéine 0,15% (p/v), glycine 15 mM, BSA 0,9% (p/v), β -mercaptoéthanol 6 mM

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

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

Tubercules de pommes de terre

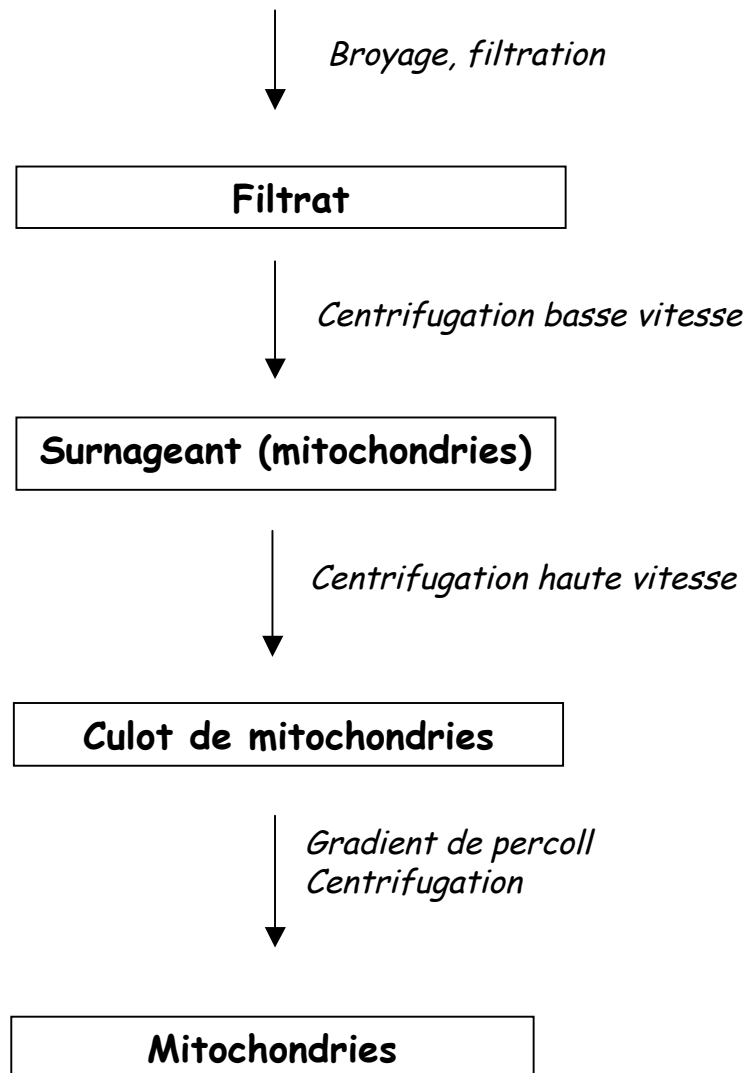


Figure 32

Les différentes étapes de purification des mitochondries de pommes de terre.

4.2 Fractionnement fait sur les mitochondries de pomme de terre (Figure 32)

4.2.1 Préparation de mitoplastes et de membranes externes

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

Les mitochondries « fraîchement » préparées et culotées sont resuspendues dans le **tampon 1** de basse osmolarité à raison de 0,1 mg de protéines par mL de tampon. Après 10 minutes à 4°C, un volume de ce tampon est ajouté et la suspension est maintenue à nouveau 15 minutes à 4°C. L'osmolarité finale entraîne la rupture de la membrane externe, mais pas celle de la membrane interne. La suspension est passée dans un homogénéisateur de type Potter afin de décrocher, de la membrane interne, les fragments de membrane externe. Les membranes externes sont alors séparées des mitoplastes et des mitochondries non cassées par centrifugation à travers un gradient discontinu de saccharose : 600 μ l de l'échantillon sont déposés par gradient discontinu formé de trois couches de 800 μ l de **solution de gradient** renfermant respectivement 15, 32 et 60% (p/v) de saccharose. Après centrifugation à 4°C, pendant 18 minutes à 57 000 rpm (rotor Beckman TL-100), les mitoplastes se trouvent à l'interphase 32-60% et les membranes externes à l'interphase 15-32%. Les mitoplastes et les membranes externes sont prélevés, dilués 5 fois dans du **tampon de lavage** et collectés par centrifugation pendant 10 minutes à 65000 rpm (rotor Beckman TLA-100).

Tampon 1 : phosphate de potassium 5 mM pH 7,2, PMSF 0,5 mM

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

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

4.2.2 Préparation de matrice, de membranes totales, et de membranes internes

Les mitochondries ou les mitoplastes sont resuspendus dans du tampon de lavage à raison de 1 mL de solution pour 50 mg de protéines mitochondriales contenant du cocktail inhibiteur de protéases (CompleteTM, Boehringer, 40 µL par mL de solution) et 1 mM PMSF. Après 3 cycles de congélation/décongélation dans de l'azote liquide, les échantillons maintenus à 4°C dans la glace sont soniqués 5 fois pendant 10 secondes (40 kHz, 70 W). Ces 2 étapes permettent la rupture de la membrane et le relargage de la matrice et de l'espace inter-membranaire. Les mitochondries encore intactes sont éliminées par centrifugation 10 minutes à 9000 rpm. Le surnageant est ensuite centrifugé 15 minutes 60 000 rpm (rotor Beckman TLA-100). Le fractionnement suivant est alors obtenu :

- à partir des mitochondries, le culot contient les membranes totales et le surnageant les protéines de la matrice et de l'espace inter-membranaire.

- à partir des mitoplastes, le culot contient les membranes internes et le surnageant les protéines de la matrice.

Résultats et Discussion

Chapitre I

Etude de l'interaction des protéines VDAC de pomme de terre avec les acides nucléiques

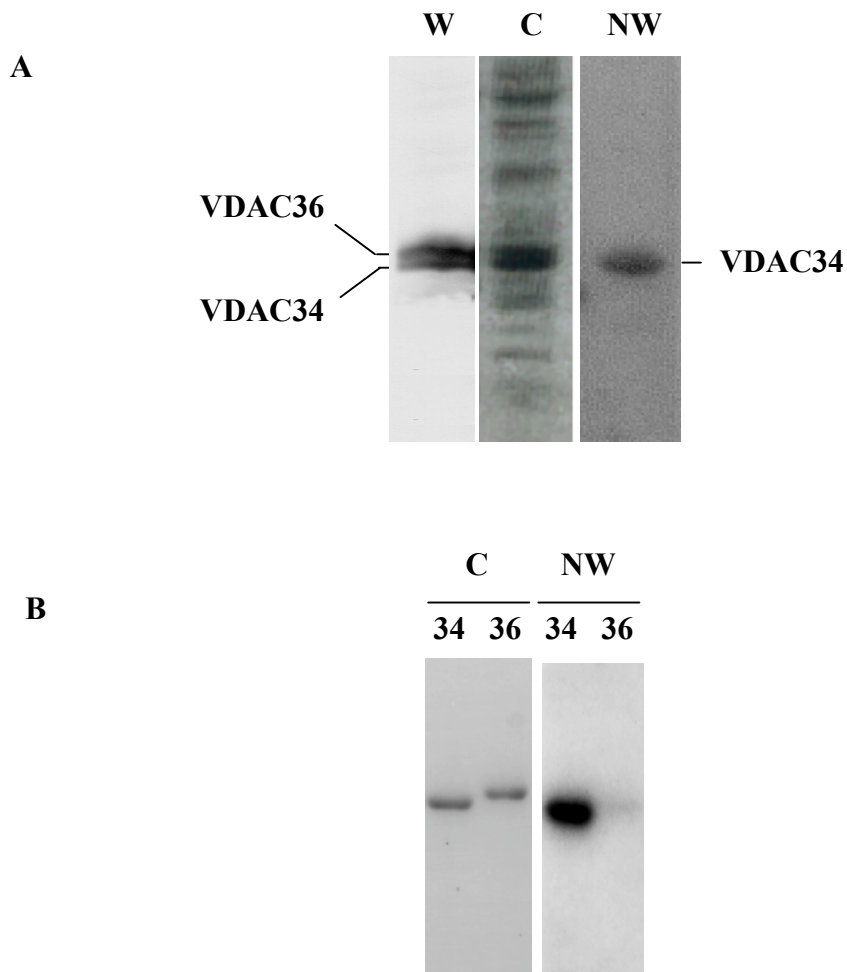


Figure 33

A Expériences de western et de northwestern réalisées sur des protéines de la membrane externe mitochondriale de *S. tuberosum* fractionnées par SDS-PAGE

W : western réalisé avec des anticorps dirigés contre les protéines VDAC de pomme de terre

C : coloration au bleu de coomassie des protéines de la membrane externe mitochondriale de pomme de terre après fractionnement par SDS-PAGE et transfert sur une membrane d'Immobilon-P

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

B Expérience de northwestern réalisée sur les protéines VDAC34 et VDAC36 surexprimées chez *E. coli*, purifiées en condition dénaturante puis fractionnées par SDS-PAGE

C : coloration au bleu de coomassie des protéines purifiées après fractionnement par SDS-PAGE et transfert sur une membrane d'Immobilon-P

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

34 : VDAC34, 36 : VDAC36

1 Préambule

Lorsque la recherche des facteurs membranaires impliqués dans le transport des ARNt au sein des mitochondries de plante a été initiée au laboratoire, aucune donnée permettant d'orienter les recherches n'était disponible. Ainsi, une approche biochimique a été choisie, en particulier, la technique de « Northwestern ». Cette technique permet de rechercher des protéines membranaires mitochondriales de pommes de terre interagissant *in vitro* avec des ARNt. Les travaux de thèse réalisés par Ludovic Delage ont montré par cette technique qu'une protéine de 34 kDa de la membrane externe mitochondriale de pomme de terre interagit avec les ARNt (**Figure 33A**) (Delage et al., 2003). Cette protéine a été purifiée et identifiée par microséquençage de son extrémité N-terminale. Il s'agit d'une porine connue sous le nom de VDAC pour « Voltage Dependent Anion Channel ». Chez la pomme de terre, quatre protéines VDAC ont été identifiées dans les membranes externes mitochondriales (**Figure 34**). Deux protéines VDAC sont retrouvées en majorité, ce sont les protéines VDAC34 et VDAC36 (numéro d'accèsion P42055, P42056 respectivement) car elles ont une masse moléculaire apparente de 34 kDa et 36 kDa respectivement (Heins et al., 1994). Deux autres protéines VDAC ont été identifiées : VDAC30 qui a une masse moléculaire apparente de 30 kDa (numéro d'accèsion CAA63968.1) et VDAC34b, nommée ainsi de part sa forte homologie avec VDAC34 (numéro d'accèsion DQ294272). En effet, les deux protéines sont identiques à 84% (**Tableau 7**). Ces deux protéines sont très faiblement exprimées comparativement aux deux autres protéines VDAC. La séquence identifiée par séquençage de l'extrémité N-terminale correspond à la séquence de VDAC34. Bien que VDAC36, soit comme VDAC34, une protéine majoritaire de la membrane externe mitochondriale, cette protéine ne semble pas interagir avec les ARNt. Pour les deux autres VDAC30 et VDAC34b, aucune interaction n'a été détectée. Cependant, leur très faible quantité ne permet pas d'exclure qu'une telle interaction existe.

Les travaux de thèse de Thalia Salinas ont confirmé ces résultats par la suite (**Figure 33B**). Il a été montré que la protéine VDAC34 surexprimée chez *E. coli* et purifiée interagit plus efficacement avec les ARNt que la protéine VDAC36 alors que ces deux protéines possèdent 75% d'identité de séquence (**Tableau 7**). A ce jour, aucun motif connu de reconnaissance à l'ARN n'a été identifié sur ce type de protéine. De plus, comme mentionné dans l'introduction, cette technique du northwestern couplée à l'utilisation du système

```

VDAC34 1 MGKGPGLYTEIGKKARDLLYKDYQSDHKFSITTYSPGVTSSSGSKKGD LFLADVNTQLKNKNVITDIKVD TNSNLFTT 80
VDAC34b 1 MGKGPGLYSDIGKKTRDLLYRDYQTDHKFTITTYSPGVAITSSGLKKGD LFLADVNTQLKNKNITDIKVD TNSNLLAT 80
VDAC36 1 MVKGPGLYSDIGKKARDLLYRDYVSDHKFTVTTYSTTGVAITASGLKKGELFLADVSTQLKNKNITDVKVD TNSNVYTT 80
VDAC30 1 MSKGPGLFADIGKKARDLLTKDYISDQKLSISTYSTGTGVALTSTAVKKGGLSTGDVGAQYKYKNTLIDVKVD TASNIISTT 80
      1
81 ITVDEAAPGLKTILSFRVPDQRSQKLEVQYLHDYAGICTSVGLTANPIVNFSGVVG TNIIALGTDV SFDTKTGDFTKCNA 160
81 VIVDEAAPGLKTIFSCRIPDQSSAKMELQYLHDYAGICTSVGLTANPIVNFSGV LGINVLALGTDV SFDTKAGAITKCNA 160
81 ITVDEPAPGLKTIFSFVVPDQKSGKVELQYLHEYAGINTSIGLTASPLVNFSGV AGNNTVALGTDLSFD TATGNFTKCNA 160
81 LTLNDIAPSTKTIASLKFPDYSSGKLEVQYHHHAAAFSTAVGLKQSPIVDLSV TLGTPTFAIGAEASYETAEGKLAKYTA 160
      2
161 GLSFTNADLVASLNLNKNKGDNL TASYHYHTVSP-LTSTAVGAEVNH SFSSTNENIITVGTQHRLDPLTSVKARIMNFGKASA 239
161 GLSFTNADLITSLNLNKNKGD SLSASYHYHIVP-LTSTAVGAEVTH SFSSTNENIITVGTQHQLDPLTIVKARVMNFGTATA 239
161 GLSFSSDLIASLALNDKGD TVSASYHYHTVKP-VTNTAVGAE LTHSFSSTNENLTI GTQHLLDPLTIVKARVNSY GKASA 239
161 GISVTKPDSCAA IILGDKGDTIKASYIHHLDELKKSAAVGEITRR-FSTNENTFTVGGSYAVDNL TIVKLLKLNHGNLGA 239

240 LLQHEWRPKSLFTVSGEVDTKSV DKGAKFGLALALKP 276
240 LIQHEWRPKSLFTISGEVDTKAV DKSAKFGLALALKP 276
240 LIQHEWRPKSLFTISGEVDTRA IEKSAKIGLAVALKP 276
240 LLQHELIPKSLLTISSEFDTKA LEKTPKFGVALALKP 276

```

Figure 34

Alignement des séquences des quatre protéines VDAC de *S. tuberosum*

L'emplacement des motifs « GLK » (1) et « VKAKV » (2) sont notés.

	VDAC34	VDAC36	VDAC30	VDAC34b
VDAC34	100			
VADC36	75	100		
VADC30	52	50	100	
VDAC34b	84	77	51	100

Tableau 7

Pourcentage d'identité des protéines VDAC de *S. tuberosum*

d'importation *in vitro* mis au point au laboratoire a permis de montrer qu'au moins une protéine VDAC est impliquée dans le transport des ARNt à travers la membrane mitochondriale externe de pomme de terre (Salinas et al., 2006).

Ainsi au cours de ma thèse, nous nous sommes dans un premier temps attachés à étudier l'interaction des protéines VDAC avec les ARNt et plus généralement avec les acides nucléiques. Les résultats de ces travaux ont fait l'objet d'un manuscrit en cours de rédaction.

2 Validation par gel retard de l'interaction différentielle des protéines VDAC34 et VDAC36 avec les ARNt

2.1 Stratégie d'étude

Dans un premier temps, nous avons validé l'interaction différentielle entre VDAC34 et VDAC36 avec les ARNt en condition non dénaturante. Pour cela, les protéines VDAC après avoir été surexprimées chez *E. coli*, ont été solubilisées en présence de 8 M d'urée et fixées sur une colonne Ni-NTA grâce au tag Histidine présent à leur extrémité C-terminale. Puis les protéines ont été renaturées par des lavages successifs avec des solutions contenant des concentrations décroissantes d'urée (8 M à 0 M) et du β -octyl glucoside (2 % (p/v)), détergent doux non ionique. Cette partie sera plus amplement développée dans le chapitre suivant. Les protéines VDAC ainsi renaturées ont été utilisées pour des expériences de gel retard. Cette technique permet de visualiser l'interaction entre les protéines et les ARNt en condition native. Ainsi, les protéines VDAC34 ou VDAC36 natives sont incubées en concentration croissante (0 à 50 ng) en présence de transcrits radiomarqués (10 fmoles) puis l'ensemble est fractionné par électrophorèse sur un gel natif. L'affinité de l'interaction a aussi été quantifiée pour les deux protéines VDAC par la mesure de la constante de dissociation K_d calculée par la méthode de Scatchard.

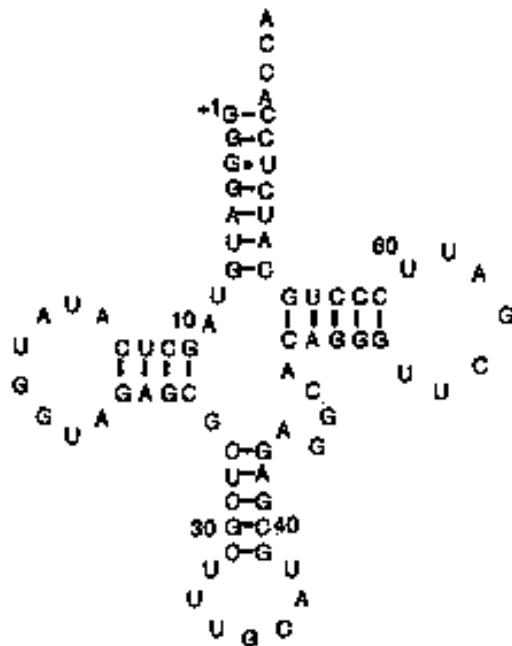


Figure 35

Séquence de l'ARNt^{Ala(UGC)} cytosolique d'*Arabidopsis thaliana*

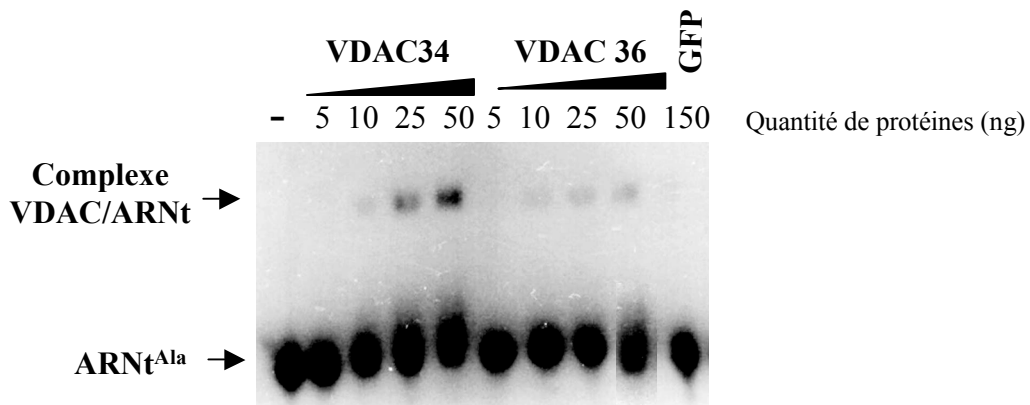


Figure 36

Autoradiographie après l'expérience de retard sur gel réalisée avec des ARNt^{Ala} radiomarqués en présence des protéines VDAC34 ou VDAC36 surexprimées chez *E. coli* et purifiées en condition native

(-): ARNt^{Ala} radiomarqués incubés en présence des tampons utilisés lors de l'expérience de gel retard

GFP : protéine GFP surexprimée chez *E. coli*, purifiée en condition native et incubée en présence d'ARNt^{Ala} radiomarqués

2.2 Substrat utilisé

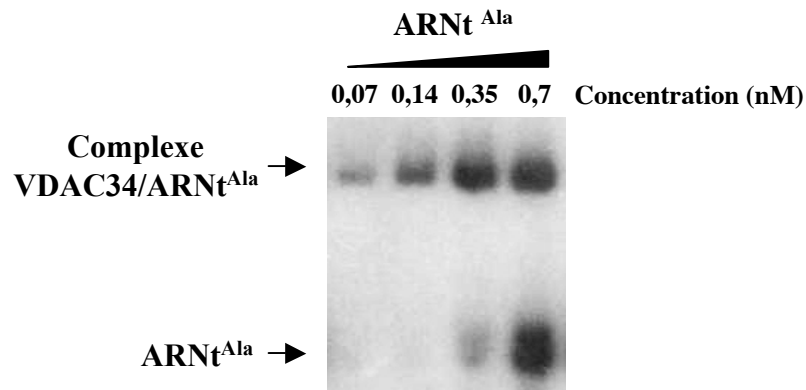
Pour réaliser les expériences de gel retard et de northwestern, le substrat utilisé correspond à un transcrit radiomarqué, celui de l'ARNt^{Ala} cytosolique d'*A. thaliana*, obtenu par transcription *in vitro* (**Figure 35**). Cet ARNt est importé dans les mitochondries de toutes les plantes supérieures étudiées à ce jour et a servi de substrat modèle pour de nombreuses études. De plus, bien que ce transcrit ne possède pas les bases modifiées présentes *in vivo*, il est parfaitement reconnu par l'alanyl-ARNt synthétase de plantes suggérant qu'il adopte une structure similaire à l'ARNt^{Ala} présent *in vivo* (Carneiro et al., 1994).

2.3 Analyse des résultats et discussion

Comme contrôle négatif, la protéine GFP purifiée en condition native a été testée. Cette protéine est connue pour ne pas interagir avec les ARNt (Salinas et al., 2006). Comme attendu, aucun retard sur gel n'est observé pour les pistes correspondant aux protéines GFP incubées avec les transcrits radiomarqués (**figure 36**). Il en est de même pour le contrôle réalisé avec les ARNt radiomarqués incubés en absence de protéines dans les tampons utilisés pour cette expérience.

Pour les pistes du gel correspondant à la protéine VDAC34 incubée avec les ARNt radiomarqués, des bandes correspondant à la formation du complexe VDAC34/ARNt sont visibles. De plus, plus la quantité de protéine VDAC34 est augmentée, plus l'intensité des bandes augmente. La même expérience a été réalisée avec des quantités comparables de protéines VDAC36. La formation des complexes VDAC36/ARNt est visible. Cependant en présence de 50 ng de VDAC34, la quantité d'ARNt retardé est dix fois plus importante qu'en présence d'une quantité équivalente de VDAC36.

A



B

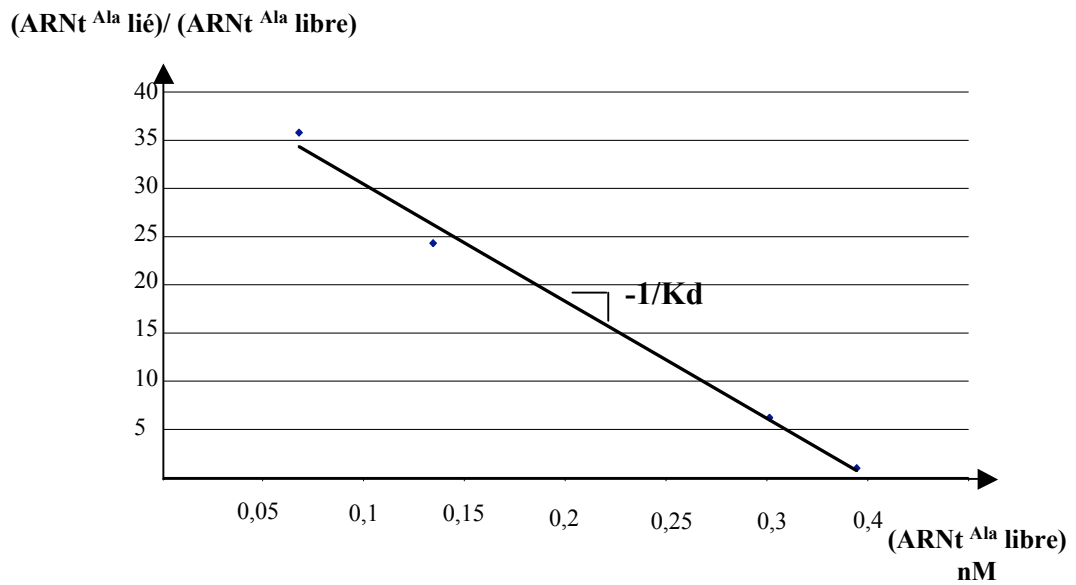


Figure 37

Calcul du K_d de la protéine VDAC34 par gel retard

A Autoradiographie après l'expérience de retard sur gel réalisée avec une gamme croissante d'ARNt^{Ala} radiomarqués en présence de 30 ng de protéine VDAC34 surexprimée chez *E. coli* et purifiée en condition native

B Droite de Scatchard représentant la fonction $(\text{ARNt}^{\text{Ala}} \text{ lié}) / (\text{ARNt}^{\text{Ala}} \text{ libre}) = f(\text{ARNt}^{\text{Ala}} \text{ libre})$

L'inverse de la pente permet de calculer la constante de dissociation K_d.

Afin de quantifier plus précisément l'interaction des protéines VDAC avec les ARNt, leurs constantes de dissociation K_d ont été recherchées. Pour la protéine VDAC34 une valeur de K_d de 8,2 pM a été calculée (**Figure 37**). Cette valeur révèle une interaction de nature forte entre VDAC34 et les ARNt. En effet, l'affinité de la protéine VDAC34 pour les ARNt est mille fois plus grande que celle des aminoacyl-ARNt synthétases pour leurs ARNt homologues (de l'ordre du nM) (Francin et al., 2002). Néanmoins, ce K_d est comparable à ceux trouvés pour les récepteurs qui ont une très grande affinité pour leurs ligands. Par exemple, les récepteurs des glucocorticoïdes humains qui peuvent lier l'ADN (Yu et al., 1995) ou le complexe F1 de l'ATP synthase qui lie l'ATP (Xiao & Penefsky, 1994) ont des K_d de l'ordre du pM. Le K_d calculé pour la protéine VDAC36 révèle que l'affinité de cette protéine pour les ARNt est dix fois moins forte que celle de la protéine VDAC34 pour les ARNt. Toutefois, c'est toujours une interaction forte. L'interaction entre ces protéines et les ARNt semblait, à priori, transitoire. Cependant, les constantes de dissociation montrent que les protéines VDAC et les ARNt interagissent fortement. Il semble donc que cette association ait une signification physiologique non négligeable, impliquant probablement les protéines VDAC dans des fonctions cruciales en liaison avec les ARNt et probablement avec les acides nucléiques.

La technique de gel retard nous a ainsi donné des résultats comparables à ceux obtenus en northwestern. Cependant, cette technique est lourde et son principal problème est d'obtenir des protéines natives. Ainsi pour étudier l'interaction des protéines VDAC avec les ARNt et rechercher le ou les domaines et/ou les acides aminés impliqué(s) dans l'interaction, des mutants des deux protéines VDAC34 et VDAC36 ont été produits et leur interaction avec les ARNt a été analysée par la technique de northwestern.

**Interaction avec les ARNt
(Unité arbitraire)**

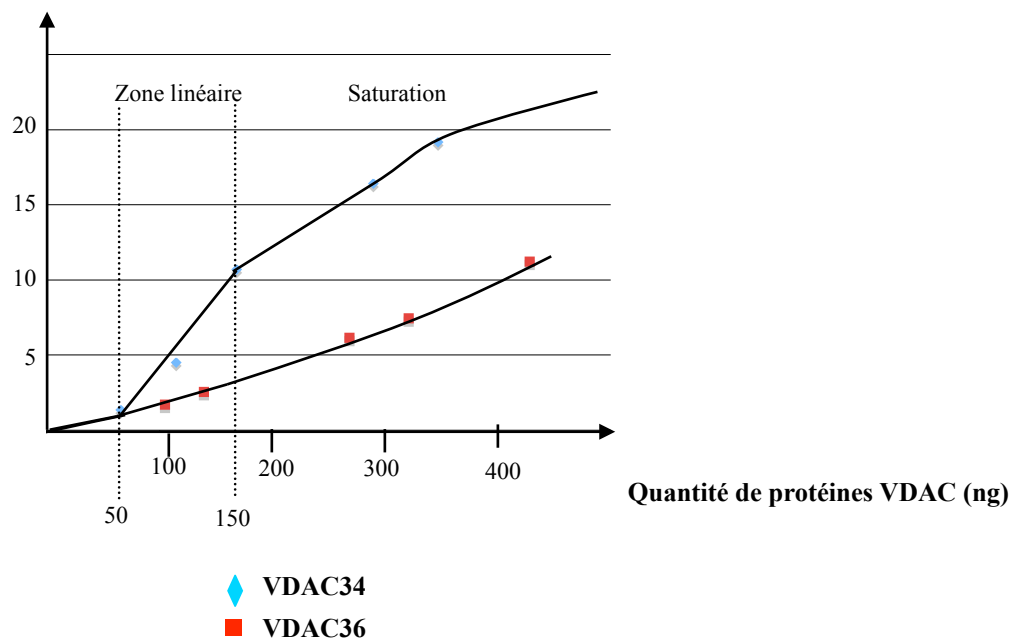


Figure 38

Étude de l'intensité des signaux radioactifs émis par les ARNt radiomarqués liés aux protéines VDAC en fonction de la quantité de protéines VDAC colorées sur membrane d'immobilon-P après transfert des protéines du gel d'électrophorèse

3 Analyse de l'interaction entre les protéines VDAC et les ARNt par northwestern

3.1 Stratégie d'étude

Les deux protéines VDAC majoritaires de la membrane externe, VDAC34 et VDAC36, sont présentes en quantité équivalente sur la membrane externe de pomme de terre. Or, VDAC34 interagit plus efficacement avec les ARNt. Ainsi, deux questions se sont posées :

- Comment la protéine VDAC34 interagit avec les ARNt, alors qu'elle ne possède aucun motif connu de liaison à l'ARN ?
- Pourquoi VDAC34 interagit plus efficacement avec les ARNt alors qu'elle possède 75% d'identité de séquence avec la protéine VDAC36 (**Tableau 7**) ?

Afin d'étudier l'interaction entre les protéines VDAC et les ARNt, nous avons tiré profit de l'interaction différentielle existant entre les protéines VDAC34 et VDAC36 avec les ARNt pour rechercher le ou les domaine(s) et/ou les acides aminés essentiel(s) à l'interaction entre VDAC34 et les ARNt. Pour se faire, des constructions mutées des deux protéines VDAC ont été réalisées par mutagenèse dirigée par PCR et les protéines correspondantes ont été surexprimées chez *E. coli*, purifiées puis testées *in vitro* pour leur interaction avec les ARNt par northwestern. A mon arrivée au laboratoire, 10 constructions avaient été réalisées et les protéines correspondantes ont été utilisées pour deux expériences indépendantes de northwestern. De ces résultats, nous avons dessiné onze nouvelles constructions et réalisé six expériences de northwestern indépendantes pour chaque mutant afin de réaliser une analyse statistique de l'effet de chaque mutation sur l'interaction des protéines VDAC avec les ARNt.

Cette analyse a nécessité de rechercher les quantités de protéines VDAC adéquates pour étudier leur efficacité d'interaction avec les ARNt. En effet, lorsque la quantité de protéine VDAC34 est faible alors le signal obtenu pour l'interaction avec les ARNt n'est pas significatif. Inversement, lorsque la quantité en protéine VDAC34 est saturante, alors le signal obtenu pour l'interaction avec les ARNt n'est plus proportionnel à la quantité de protéines. Nous avons donc recherché une quantité de protéine VDAC34 de telle manière à avoir un signal d'interaction émis par les ARNt radiomarqués liés à la protéine VDAC34 linéaire en

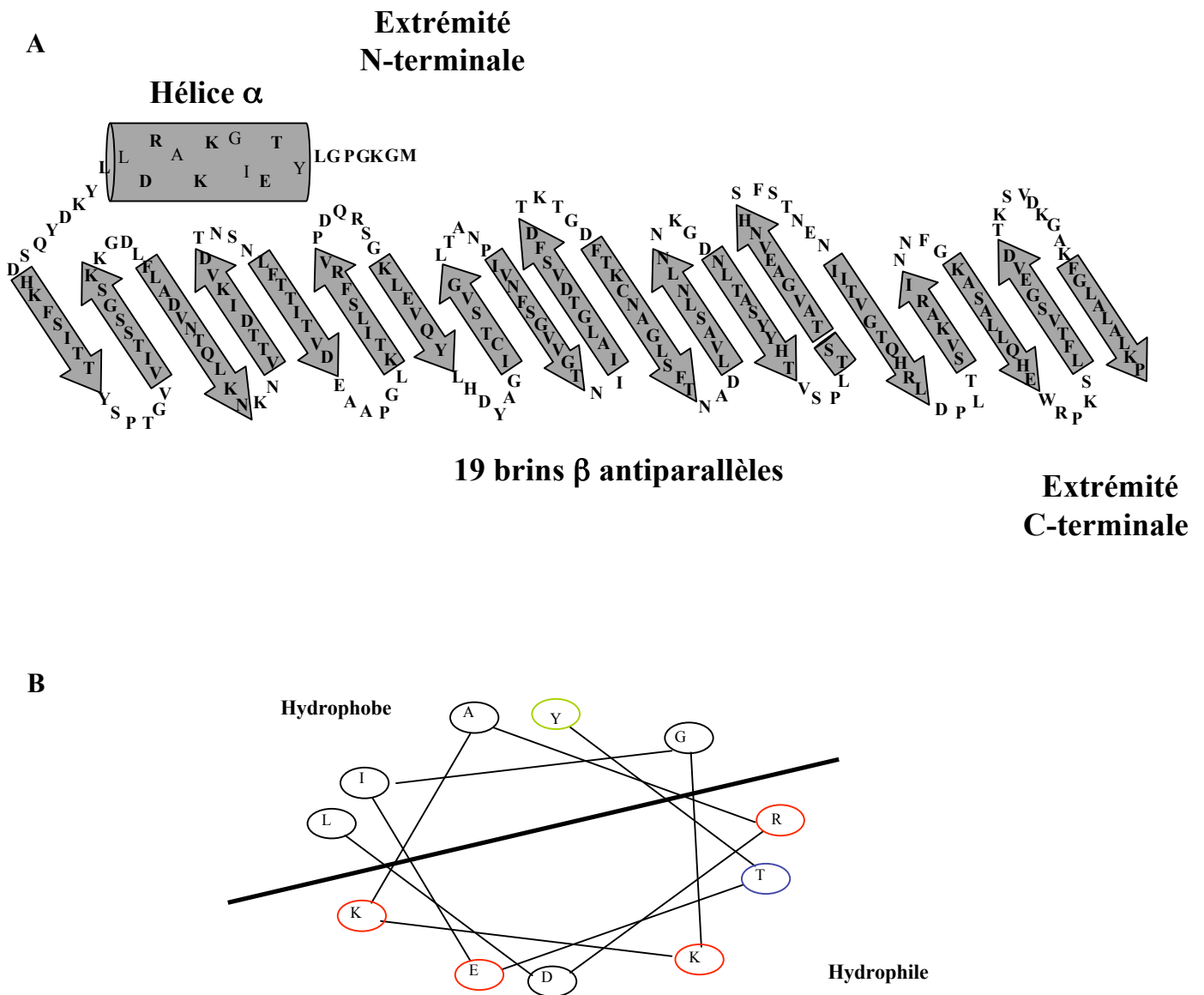


Figure 39

Modélisation de la structure secondaire de la protéine VDAC34 de *S. tuberosum*

A Structure établie grâce à la structure 3D de VDAC1 humaine et aux alignements de séquences des protéines VDAC34 de *S. tuberosum* et VDAC1 humaine (d'après Bayrhuber et al., 2008) en utilisant le logiciel pymol

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

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

○ résidus hydrophobes ○ résidus chargés ○ résidus polaires ○ résidus non polaires

fonction de la quantité de protéine VDAC34 utilisée. Comme le montre la **figure 38**, la zone linéaire est comprise entre 50 et 150 ng de protéines. Pour les quantités inférieures à 50 ng ou supérieures à 150 ng le signal d'interaction émis par les ARNt radiomarqués liés à la protéine VDAC34 n'est plus proportionnel à la quantité de protéines. Pour la protéine VDAC36, ce problème n'existe pas. En effet, comme le signal d'interaction de cette protéine avec les ARNt est faible en northwestern, le signal émis par les ARNt liés à la protéine a toujours été proportionnel à la quantité de protéine VDAC36. Ainsi, afin de comparer l'interaction des deux protéines VDAC avec les ARNt, nous avons travaillé avec une quantité de protéine de 100 ng de telle manière à avoir pour les deux protéines VDAC un signal d'interaction proportionnel à la quantité de protéine.

3.2 Choix des mutations

3.2.1 Structure secondaire des protéines VDAC

Dans le but de déterminer quel(s) est le ou les domaine(s) et/ou les acides aminés essentiels à l'interaction avec les ARNt, il est important d'avoir une représentation de la structure secondaire des protéines VDAC.

A mon arrivée en Master au laboratoire, le modèle de structure secondaire de VDAC34 de pomme de terre utilisé avait été développé à partir du modèle de VDAC de riz proposé par (Al Bitar et al., 2003) en utilisant les programmes de prédiction disponibles sur le site <http://pbil.ibpc.fr/htm/index.php> (Wang & Brown, 2006). Au cours de ma thèse, ce modèle a évolué en fonction des données plus récentes obtenues pour la protéine VDAC1 humaine (Bayrhuber et al., 2008). Ainsi, à partir de la structure de cette protéine et en collaboration avec Claude Sauter de l'IBMC à Strasbourg, un modèle plus précis de la structure secondaire de la protéine VDAC34 de pomme de terre a pu être établi (**Figure 39A**). Dans ce modèle, la protéine VDAC34 est constituée d'une hélice α située à l'extrémité N-terminale suivie de 19 brins β anti-parallèles successifs. Cette hélice est amphiphile, ce qui lui permet d'avoir une face hydrophile et une face hydrophobe (**Figure 39B**). Les 19 brins β sont séparés par 18 boucles dont la taille varie de 2 à 9 acides aminés. Une structure très similaire peut être proposée pour VDAC36.

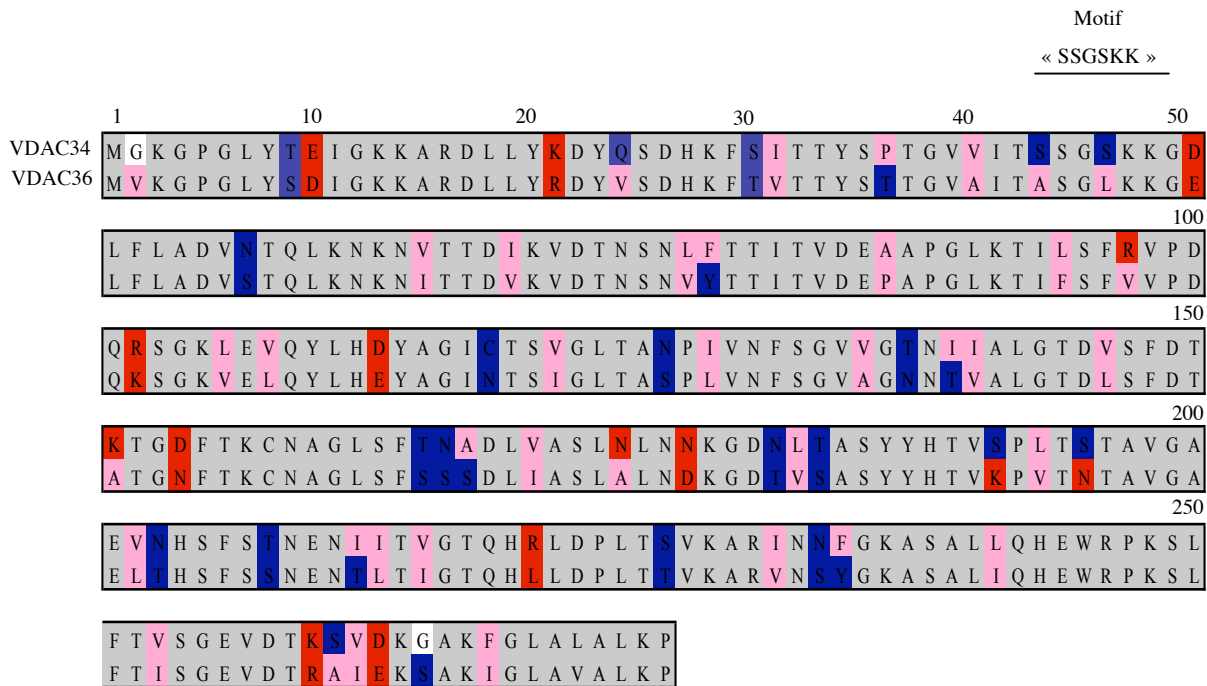


Figure 40

Comparaison des séquences des deux protéines VDAC34 et VDAC36 de *S. tuberosum*

Les acides aminés qui diffèrent entre les deux protéines sont représentés suivant leur propriétés physico-chimiques

- acides aminés identiques □ acides aminés hydrophobes
- acides aminés polaires ■ acides aminés chargés

3.2.2 Les constructions mutantes

Les protéines VDAC34 et VDAC36 interagissent différemment avec les ARNt alors qu'elles partagent 75 % d'identité de séquence. En effet, seuls 67 acides aminés sur 276 sont différents entre les deux protéines, parmi lesquels seuls 16 ont des caractéristiques physico-chimiques différentes répartis sur l'ensemble de la séquence protéique (**Figure 40**). Afin de rechercher le(s) domaine(s) ou les acides aminés importants pour l'interaction avec les ARNt, nous avons réalisé trois types de constructions mutantes :

- des protéines chimères entre les deux VDAC
- des versions délétées de différents domaines de la protéine VDAC34
- des protéines mutées ponctuellement

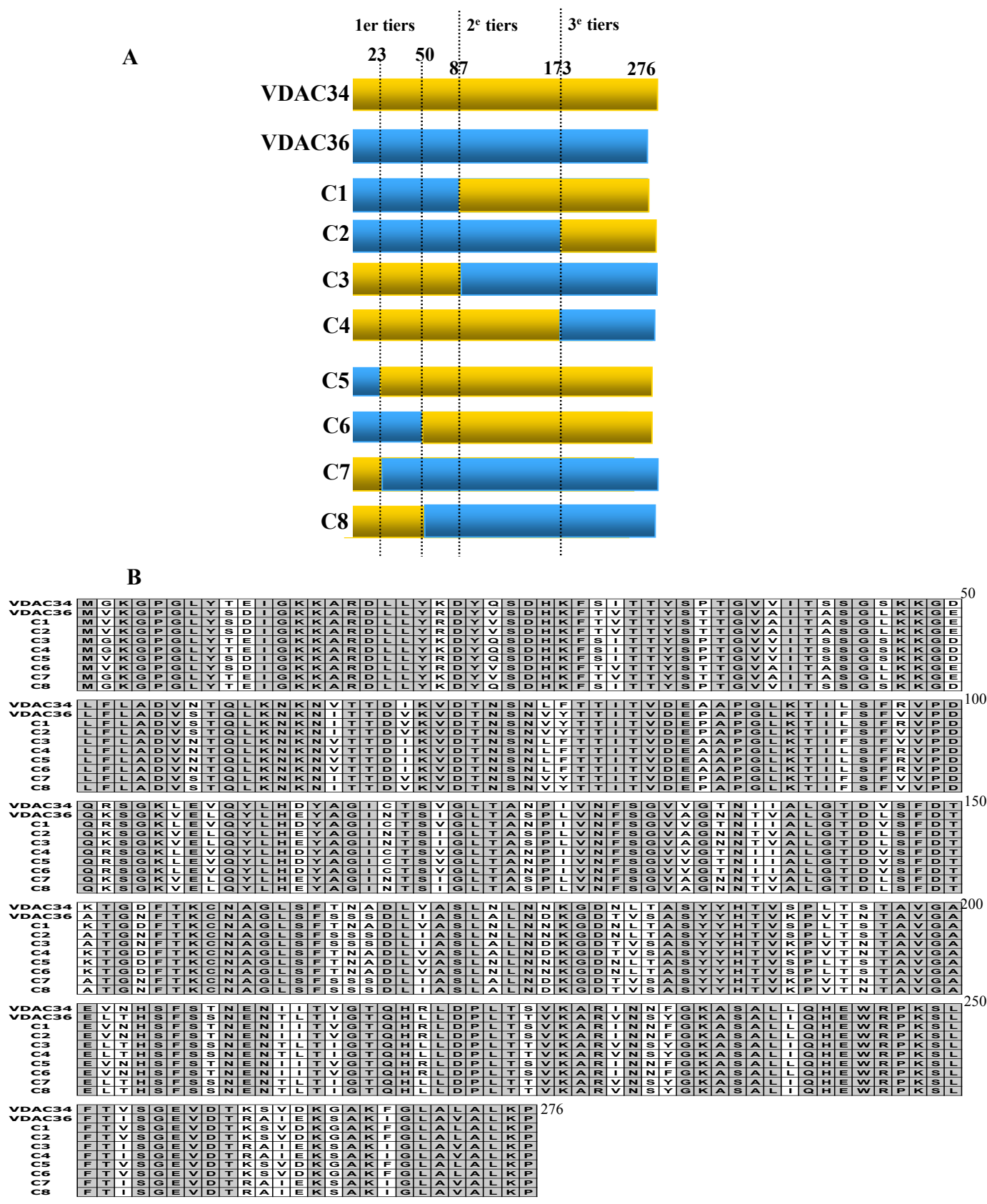


Figure 41
A Schéma des constructions chimériques réalisées à partir des protéines VDAC34 en jaune et VDAC36 en bleu
B Alignement des séquences des constructions chimériques

Protéines chimères

Pour les constructions chimériques, la stratégie a été de remplacer des domaines de VDAC34 par les domaines équivalents de VDAC36 et inversement. Les protéines VDAC34 et VDAC36 ont été arbitrairement divisées en trois parties (**Figure 41**). Le premier tiers va de l'acide aminé 1 à l'acide aminé 87, le deuxième tiers de l'acide aminé 88 à l'acide aminé 173 et le troisième tiers de l'acide aminé 174 à l'acide aminé 276. Sur le premier tiers, 18 acides aminés diffèrent entre VDAC34 et VDAC36, sur le deuxième tiers 21 acides aminés et sur le troisième tiers 28 acides aminés. Quatre constructions ont ainsi été réalisées possédant un ou deux tiers de chaque protéine (C1 à C4). Des résultats préliminaires obtenus au laboratoire avec ces constructions suggéraient que le premier tiers de VDAC34 était essentiel à l'interaction. La région d'interaction a donc été plus finement délimitée. Ainsi, le premier tiers N-terminal de la protéine VDAC34 a été, à nouveau, divisé en trois parties. Les constructions ont donc la structure suivante : les 23 ou 50 premiers acides aminés de VDAC36 suivis de la séquence de VDAC34 (C5 et C6) et inversement (C7 et C8). A ce niveau, il est intéressant de noter, d'après la comparaison de séquences des deux VDAC, que les nombres d'acides aminés qui diffèrent entre ces protéines sont les suivants : 4 acides aminés sur 23, 12 acides aminés sur 50 et 18 acides aminés sur 87.

Mutants de délétion

Les mutants de délétion correspondent à la protéine VDAC34 délétée des parties N-terminale, C-terminale, des deux extrémités ou de séquences internes (**Figure 42**). Dans un premier temps, le premier tiers N-terminal a été étudié. Ainsi, l'hélice α a été délétée chez le mutant D3. Pour la construction D5, la protéine a été délétée de manière à conserver uniquement le premier tiers N-terminal.

Dans un second temps, la structure en tonneau de la protéine a été analysée. En effet, pour que le tonneau se forme, il faut que les extrémités N- et C-terminales soient proches et que la protéine possède un nombre minimum de brins β . Ainsi, pour tenter d'affecter la structure en tonneau de la protéine, la protéine VDAC34 a été délétée de son premier tiers N-terminal (D2), du dernier tiers C-terminal (D7), des deux tiers N- et C-terminaux pour conserver uniquement le tiers central (D8), des deux derniers brins β (D5), et du dernier brin β (D4). Enfin, le 11^e brin β , situé au milieu de la protéine, a été délété de manière à produire, à priori, un tonneau de plus petite taille (D1).

Mutations ponctuelles

Les constructions mutées ponctuellement concernent le premier tiers N-terminal (**Figure 43**).

Sur les 23 premiers acides aminés (**Figure 40**), quatre diffèrent entre les deux protéines VDAC34 et VDAC36. Trois de ces résidus représentent a priori des changements neutres (T en S, E en D, K en R). Par contre le résidu glycine en position 2 sur la protéine VDAC34 est remplacé par un résidu valine hydrophobe sur la protéine VDAC36. Ainsi, afin de tester l'implication de cet acide aminé dans l'interaction de la protéine VDAC34 avec les ARNt, deux mutants ont été produits. Le premier mutant M1 correspond à la protéine VDAC34 où la glycine a été remplacée par une valine. Le deuxième mutant M2 correspond à la protéine VDAC36 dans laquelle la valine a été remplacée par une glycine. Ces constructions sont d'ailleurs à mettre en relation avec la protéine chimère C5 composée des 23 premiers acides aminés de VDAC36 suivis de la séquence de la protéine VDAC34.

L'analyse de la séquence de VDAC34 par un logiciel de prédiction d'interaction potentielle entre acides aminés et ARN a permis de construire trois autres constructions sur ce premier tiers N-terminal. Le logiciel BindN (<http://bioinfo.ggc.org/bindn/>) utilise les caractéristiques des séquences protéiques répertoriées dans la « Protein Data Bank » (indice d'hydrophobicité, poids moléculaire de l'acide aminé, pKa) couplées à des supports vectoriels pour prédire les acides aminés qui peuvent interagir avec les ARN (Wang & Brown, 2006). L'analyse de la séquence de VDAC34 par ce logiciel a mis en évidence plusieurs acides aminés potentiellement importants pour l'interaction de la protéine VDAC34 avec les ARN. Ces acides aminés sont distribués tout le long de la séquence protéique. Toutefois au vu des résultats préliminaires obtenus avec les premières constructions mutantes, l'analyse du premier tiers N-terminal de la protéine VDC34 a été privilégiée, en particulier les acides aminés 23 à 50. Dans cette région, le motif « SSGSKK » (acides 43 à 48) est prédit pour interagir avec les ARN (**Figure 44A**). De plus, une modélisation de la structure tridimensionnelle de la protéine VDAC34 réalisée dans le département par Jean-Michel Grienenberger à partir de la structure de la porine de *Neurospora Crassa* (P07144) suggère que les deux lysines de ce motif sont proches de l'hélice α (**Figure 44B**). Dans la mesure où les lysines sont connues pour interagir avec les ARN, trois types de mutations ont été réalisées au niveau du motif afin d'analyser leur implication dans l'interaction avec les ARNt. Chez le

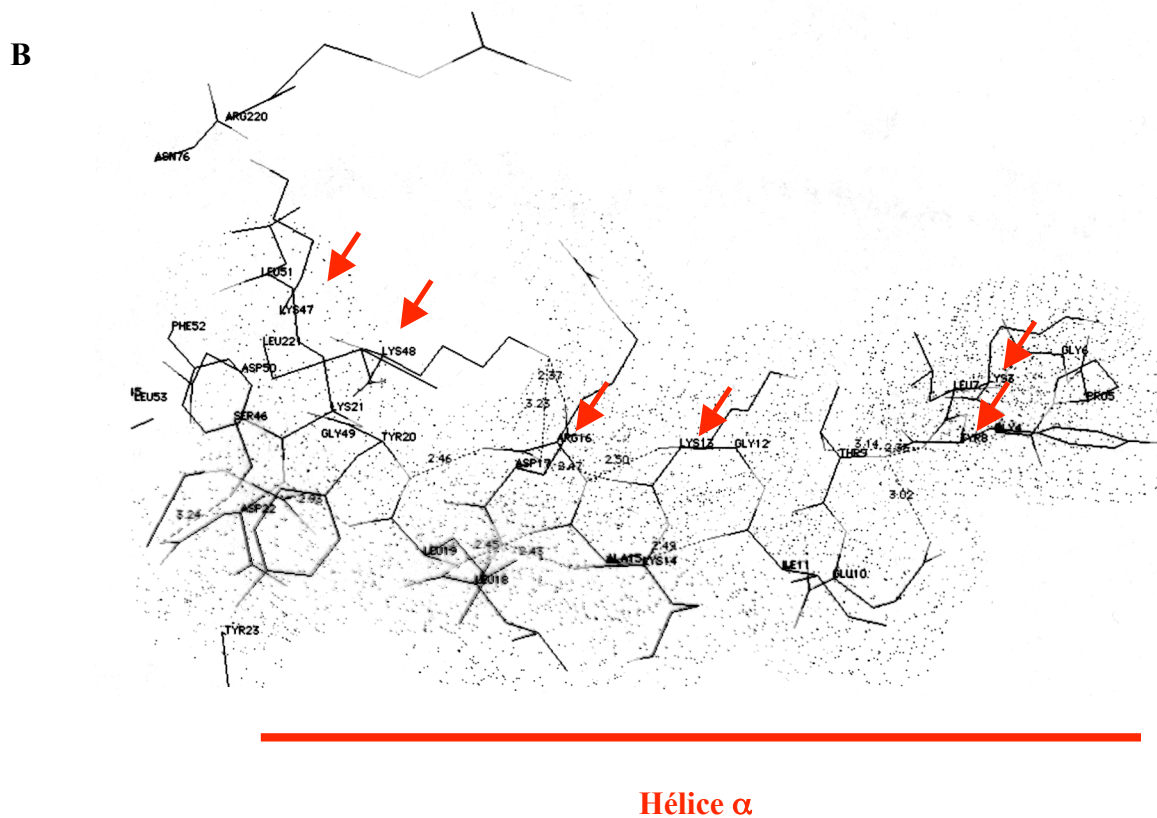
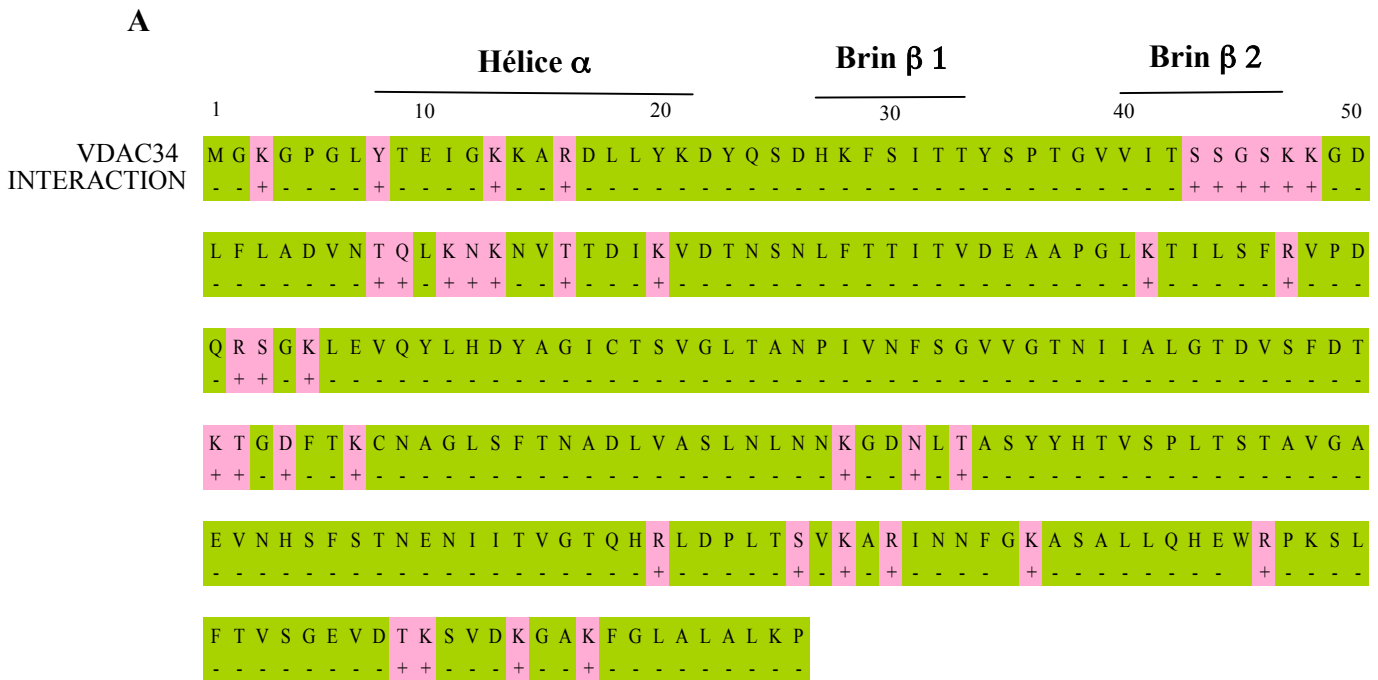


Figure 44

A Prédiction à 95% de spécificité des acides aminés de VDAC34 capables d'interagir avec les ARN, d'après le programme BindN

Les acides aminés potentiellement capables d'interagir avec des ARN sont sur fond rose

B Modélisation 3D du premier tiers N-terminal de VDAC34, d'après la structure de la porine *Neurospora Crassa*

Les flèches rouges indiquent parmi les 50 premiers acides aminés ceux capables d'interagir avec les ARN

mutant M3, les deux lysines sont mutées en alanine, alors qu'elles sont conservées chez le mutant M5 en changeant le reste du motif en alanine. Pour la protéine M4, tous les acides aminés du motif sont mutés en alanine.

L'ensemble de ces constructions devrait permettre d'apporter des renseignements importants quant à la compréhension de l'interaction entre la protéine VDAC34 et les ARNt.

3.4 Analyse par northwestern de l'interaction des différents mutants de VDAC avec les ARNt

3.4.1 Quantification de l'interaction

Afin d'analyser l'interaction des protéines VDAC mutantes avec l'ARNt^{Ala} cytosolique d'*Arabidopsis thaliana*, les constructions ont été réalisées par mutagenèse par PCR selon l'approche décrite dans la partie « Matériel et Méthodes ». Elles ont été clonées dans le vecteur d'expression pQE60 et les protéines ont été surexprimées chez *E. coli*. Toutes les protéines ont été purifiées en condition dénaturante par fixation sur billes de Nickel grâce à leur étiquette de six histidines située à l'extrémité C-terminale. Puis elles ont été fractionnées sur gel de polyacrylamide en quantité comparable (environ 100 ng) et transférées sur membrane d'Immobilon-P. Après renaturation des protéines sur la membrane, celle-ci est incubée en présence de 10^6 cpm de transcrit radiomarqué d'ARNt^{Ala}. Pour chaque expérience indépendante, la même quantité de transcrit est utilisée, et les deux protéines VDAC34 et VDAC36 non mutées ont toujours été analysées et servent de référence. L'efficacité d'interaction entre protéines et ARNt est calculée en faisant le rapport entre la quantité de radioactivité des transcrits qui interagissent avec les protéines et la quantité de protéines transférées sur la membrane. Cette quantification des protéines colorées sur membrane et des signaux radioactifs, est réalisée à l'aide du logiciel MacBas. L'efficacité d'interaction entre VDAC34 et les ARNt est choisie comme valeur de référence (100 %).

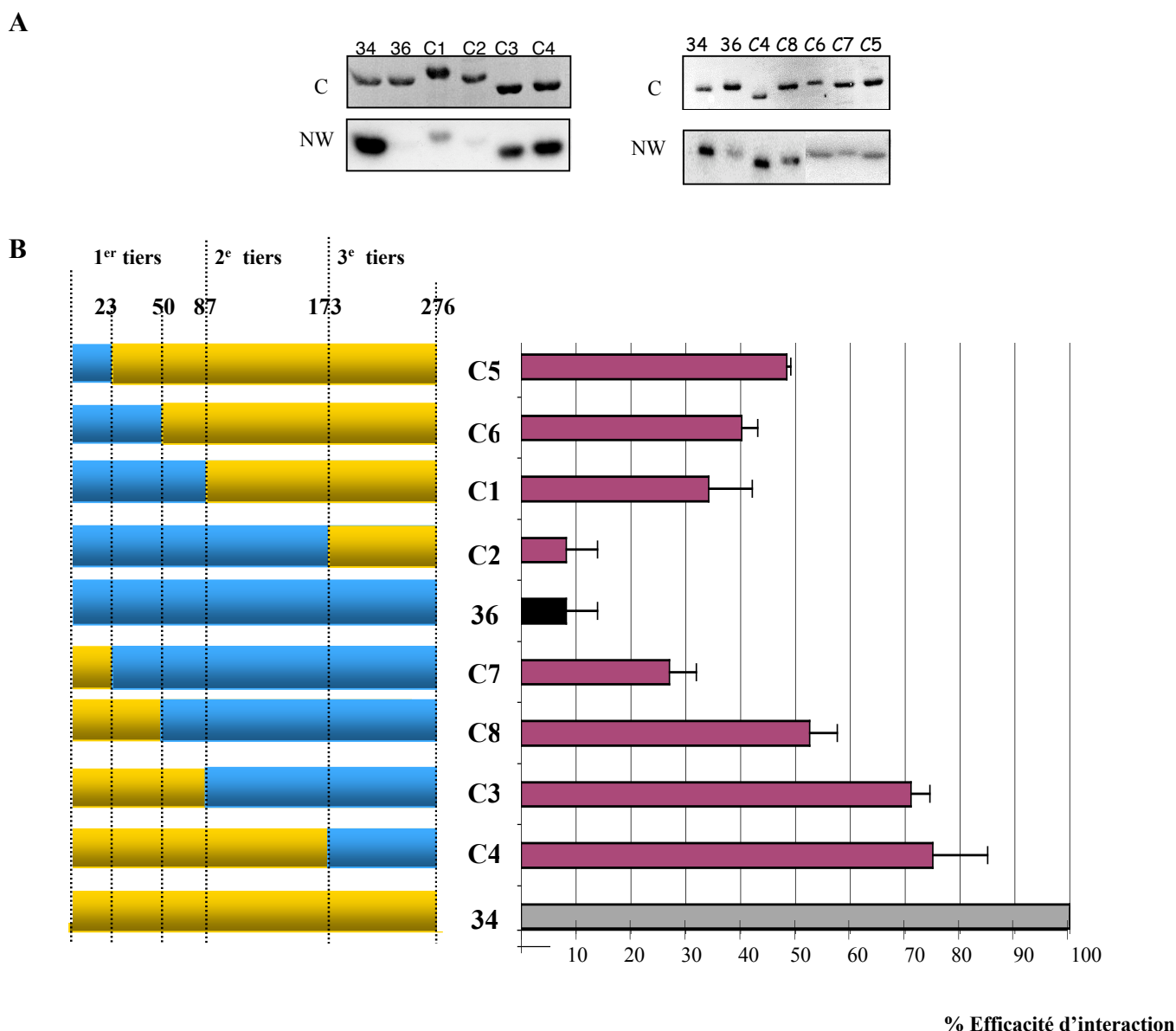


Figure 45

A Exemple d'expérience de northwestern réalisée sur les protéines surexprimées chez *E. coli*, purifiées en condition dénaturante puis fractionnées par SDS-PAGE

C : coloration au bleu de coomassie des protéines purifiées après fractionnement par SDS-PAGE et transfert sur une membrane d'Immobilon-P

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

B Efficacité d'interaction des protéines chimères avec les ARNt radiomarqués

Les histogrammes donnent des valeurs d'interaction moyennes obtenues lors des expériences de northwestern.

L'interaction de VDAC34 avec les ARNt a été prise pour référence, son efficacité d'interaction avec les ARNt est donc de 100%

La barres noire représente VDAC36

La barres grise représente VDAC34

Les barres violettes représentent les protéines chimères

3.4.2 Analyse des résultats et discussion

Les acides aminés importants pour l'interaction de la protéine VDAC34 avec les ARNt sont distribués le long de la séquence protéique (Figure 45)

L'analyse de l'efficacité d'interaction des mutants chimériques avec les ARNt montre que le remplacement progressif de la séquence de la protéine VDAC36 par la séquence de la protéine VDAC34 induit une augmentation de l'efficacité d'interaction qui peut être schématisée comme suit : 36<C7<C8<C3<C4<34. Inversement, le remplacement progressif de la séquence protéique de VDAC34 par celle de VDAC36 induit une diminution de l'efficacité d'interaction schématisé ainsi : 34<C5<C6<C1<C2<36. Il semble donc que l'interaction VDAC34-ARNt ne requiert pas un motif précis de fixation aux ARN mais que les acides aminés importants pour l'interaction avec les ARNt soient répartis tout le long de la séquence.

Néanmoins, la protéine C2 (deux tiers de VDAC36 suivis d'un tiers de VDAC34) a une interaction comparable à celle de VDAC36. De plus, la protéine C4 (deux tiers VDAC34 suivis d'un tiers VDAC36), interagit efficacement avec les ARNt. Ainsi, les acides aminés présents au niveau du dernier tiers C-terminal ne semblent pas requis pour une interaction efficace entre la protéine VDAC34 et les ARNt.

Les constructions C3 et C4 possèdent respectivement un tiers et deux tiers de VDAC34 suivis ensuite respectivement de deux tiers et un tiers de VDAC36. Les histogrammes montrent que les protéines chimères C3 et C4 interagissent fortement avec l'ARNt^{Ala} à raison de 71% et 75%. De plus, le remplacement du premier tiers N-terminal de VDAC36 par celui de VDAC34 chez le mutant C3 (un tiers de VDAC34 suivi de deux tiers de VDAC36) multiplie par 5 l'efficacité d'interaction avec les ARNt. Il semble donc que les acides aminés importants pour l'interaction soient particulièrement présents au niveau du premier tiers N-terminal. L'implication de cette région dans l'interaction avec les ARNt sera détaillée dans les prochains paragraphes.

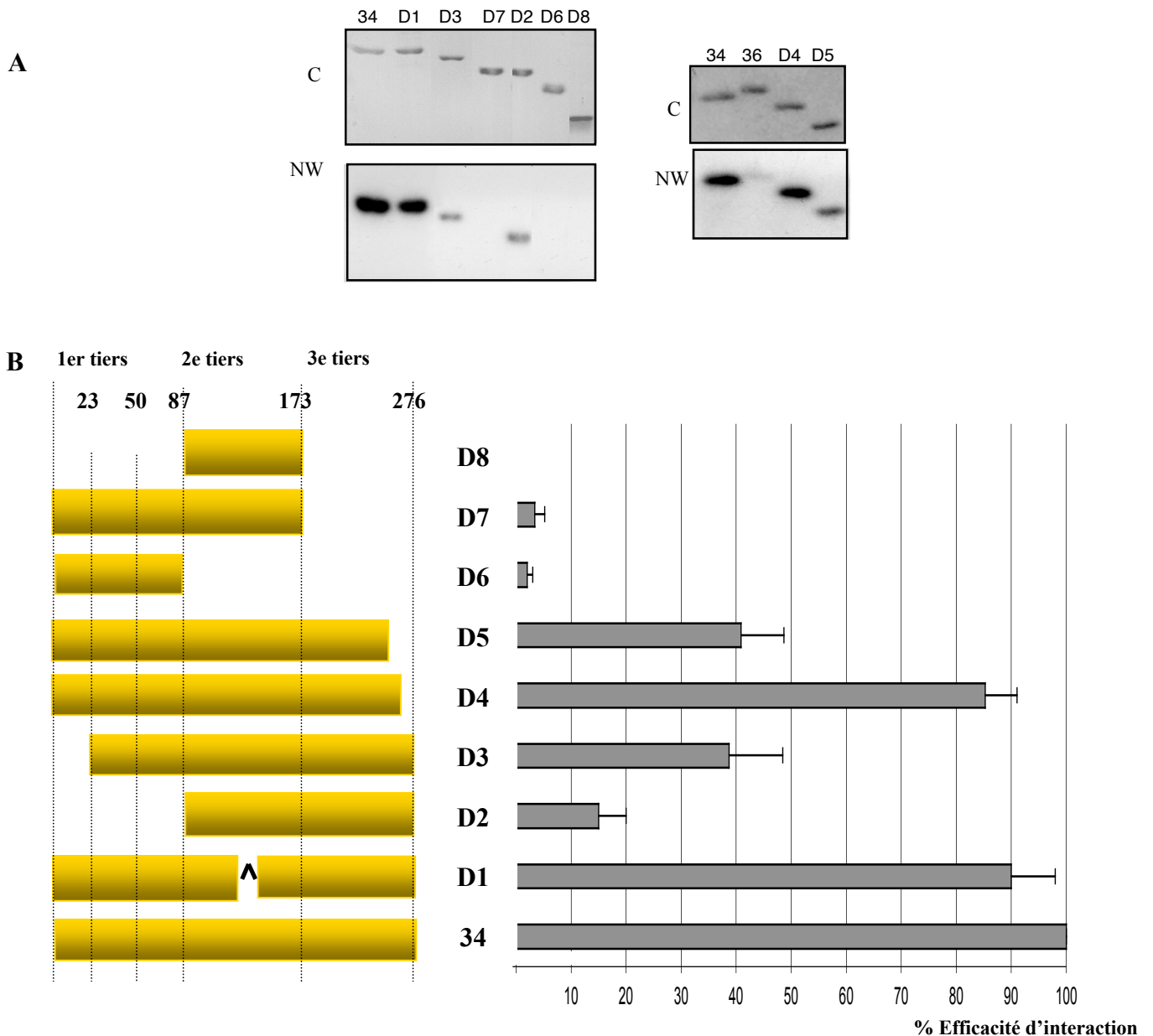


Figure 46

A Exemple d'expérience de northwestern réalisée sur les protéines surexprimées chez *E. coli*, purifiées en condition dénaturante puis fractionnées par SDS-PAGE

C : coloration au bleu de coomassie des protéines purifiées après fractionnement par SDS-PAGE et transfert sur une membrane d'Immobilon-P

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

B Efficacité d'interaction des protéines délétées avec les ARNt radiomarqués

Les histogrammes donnent des valeurs d'interaction moyennes obtenues lors des expériences de northwestern.

L'interaction de VDAC34 avec les ARNt a été prise pour référence, son efficacité d'interaction avec les ARNt est donc de 100%

La structure en tonneau β de la porine est vraisemblablement requise pour une interaction efficace avec les ARNt (Figure 45 et 46)

Les constructions D6 et D8 constituées respectivement uniquement du premier et du second tiers N-terminal, n'interagissent plus avec les ARNt. De plus, la délétion du dernier tiers C-terminal de VDAC34 (D7) empêche l'interaction avec l'ARNt. Cependant l'ajout, sur D6 et D7, des deux derniers et du dernier tiers C-terminaux de VDAC36 restaure complètement ou presque l'interaction avec les ARNt. En effet, les constructions C3 et C4 interagissent à plus de 70% avec les ARNt. Ainsi, il est possible d'émettre l'hypothèse qu'une taille minimale est nécessaire à la protéine VDAC34 pour permettre une interaction efficace avec les ARNt. De plus, il faut noter que dès que l'une des deux extrémités de VDAC34 est délétée de quelques acides aminés (23 en N-terminal pour le mutant D3 et 30 en C-terminal pour le mutant D5), l'interaction avec les ARNt est affectée.

Ces données suggèrent que l'interaction nécessite une protéine de taille complète vraisemblablement pour assurer une conformation correcte à la protéine VDAC. *In vivo*, les extrémités N- et C-terminales de la protéine sont rapprochées du fait de la structure en tonneau, il est donc possible d'imaginer que ce rapprochement soit une condition nécessaire lors de l'étape de renaturation de VDAC34 pour que l'interaction avec les ARNt soit efficace. Cette structure pourrait jouer un rôle important dans la disposition des acides aminés nécessaires pour l'interaction avec les ARNt. Ce qui expliquerait pourquoi l'interaction entre la protéine VDAC34 et les ARNt requiert des acides aminés répartis sur l'ensemble de la protéine. En effet, ces acides aminés pourraient se regrouper grâce à la structure tridimensionnelle de la protéine pour créer un motif tridimensionnel permettant l'interaction avec les ARNt. C'est par exemple le cas pour le site de dimérisation qui implique les acides aminés 27, 29, 50, 51, 257, 259 et 277 de la protéine VDAC1 humaine (Bayrhuber et al., 2008) et pour le site formant le « voltage gating » réalisé par les acides aminés 20, 46, 61, 65, 84 de VDAC de *S. cerevisiae* (Thomas et al., 1993). Ces motifs tridimensionnels rappellent l'interaction entre les aminoacyls-ARNt synthétases et les ARNt. En effet, cette interaction est le fruit d'une combinaison d'acides aminés de l'aaRS qui lie les extrémités distales de la structure en « L » des ARNt (boucle de l'anticodon et bras accepteur) (Giege, 2008).

De manière intéressante, la délétion du 11^e brin β chez le mutant D1 n'a pas d'effet significatif sur l'interaction de la protéine VDAC34 avec les ARNt. Il semble donc que les acides aminés constituant ce brin ne soient pas impliqués dans l'interaction avec les ARNt. Il est à noter que cette délétion ne semble pas affecter la structure mais produirait simplement un tonneau de plus petite taille. Néanmoins, l'orientation des brins β devrait changer à partir du 12^e brin. Il semble donc que cette délétion permette toujours de créer un environnement favorable à l'interaction de VDAC avec les ARNt. Une autre délétion n'a pas d'effet significatif sur l'interaction de VDAC34 avec les ARNt. En effet, le mutant D4, délété du dernier brin β , interagit toujours efficacement avec les ARNt. Il semble donc que les acides aminés de ce brin ne soient pas requis pour l'interaction. Cette délétion devrait produire un tonneau ouvert. Néanmoins, comme le mutant interagit toujours efficacement avec les ARNt, il semble que les extrémités N- et C-terminales soient toujours proches et que la structure de cette protéine crée encore un environnement favorable à l'interaction de VDAC avec les ARNt. La structure de la protéine VDAC34 permettra de visualiser les changements qu'impliquent ces deux délétions et donc de mieux comprendre pourquoi et comment ces mutants interagissent efficacement avec les ARNt. Cette étude a été initiée et est présentée dans le chapitre II des Résultats et Discussion.

Le premier tiers N-terminal est essentiel à l'interaction (Figure 45)

L'analyse des résultats pour les protéines chimères C1 montre que le remplacement du premier tiers N-terminal de la protéine VDAC34 par celui de VDAC36 induit une baisse d'efficacité d'interaction de 66%. A l'inverse pour les protéines chimères C3, le remplacement du premier tiers N-terminal de VDAC36 par celui de VDAC34 induit une augmentation de l'efficacité d'interaction avec les ARNt de 63%. Ainsi le premier tiers N-terminal semble contenir des acides aminés importants pour l'interaction. En effet, le remplacement progressif du premier tiers N-terminal de VDAC34 par celui de VDAC36 entraîne une diminution progressive de l'interaction que l'on peut schématiser ainsi : C5>C6>C1. Inversement, le remplacement progressif du premier tiers N-terminal de VDAC36 par celui de VDAC34 entraîne une augmentation progressive de l'interaction que l'on peut schématiser ainsi : C7<C8<C3.

De manière générale, les mutations réalisées sur ce premier tiers N-terminal ont des effets significatifs sur l'interaction de VDAC avec les ARNt. En effet, les histogrammes montrent pour toutes ces mutations une baisse de plus de 50% de l'efficacité d'interaction des protéines VDAC avec les ARNt. Dans ce premier tiers N-terminal, 18 acides aminés diffèrent sur 87 entre VDAC34 et VDAC36 et sont répartis sur l'ensemble cette région (**Figure 40**). Il est curieux de noter que cette région, en comparaison aux deux autres tiers de VDAC34, présente le moins de différences entre les deux protéines VDAC. Néanmoins, le premier tiers N-terminal de la protéine VDAC34 contient l'hélice α . La position et l'implication de cette hélice dans l'ouverture et la fermeture du pore a toujours été sujet à débat. En effet, certains auteurs pensent qu'elle serait un clapet permettant l'ouverture et la fermeture du pore (De Pinto et al., 2007). Elle pourrait donc jouer un rôle capital dans l'interaction avec les ARNt. Pour tester son importance, la protéine VDAC34 a été délétée de son hélice chez le mutant D3. L'analyse de son efficacité d'interaction montre une baisse de 63% (**Figure 45**). Cette hélice semble donc capitale pour l'interaction avec les ARNt. En effet, lorsqu'on place cette hélice sur la protéine VDAC36 (C7), l'efficacité d'interaction avec les ARNt est multipliée par 2. Cette hélice constitue un élément mobile de la porine et, comme je l'ai mentionné ci-dessus, elle pourrait être un clapet permettant l'ouverture et la fermeture du pore. Ainsi, en interagissant avec les ARNt elle pourrait leur permettre de traverser le pore.

Bien qu'essentiel, il n'est pas suffisant

La protéine mutante D6, constituée uniquement du premier tiers N-terminal, n'interagit pas avec les ARNt (**Figure 46**). De plus, lorsque ce premier tiers est placé sur la protéine VDAC36, pour le mutant C3, l'efficacité d'interaction n'est pas totalement restaurée puisqu'elle est de 71%. L'analyse de ces mutants nous montre que bien que le premier tiers N-terminal de VDAC34 joue un rôle prépondérant dans l'interaction avec les ARNt, il n'est pas suffisant.

Néanmoins, la comparaison des mutants C5, C6 et C1, d'une part, et C7, C8 et C3, d'autre part, montre que, dans ce premier tiers N-terminal, les acides aminés 23 à 50 jouent un rôle crucial dans l'interaction avec les ARNt. Cette région contient la séquence « SSGSKK »

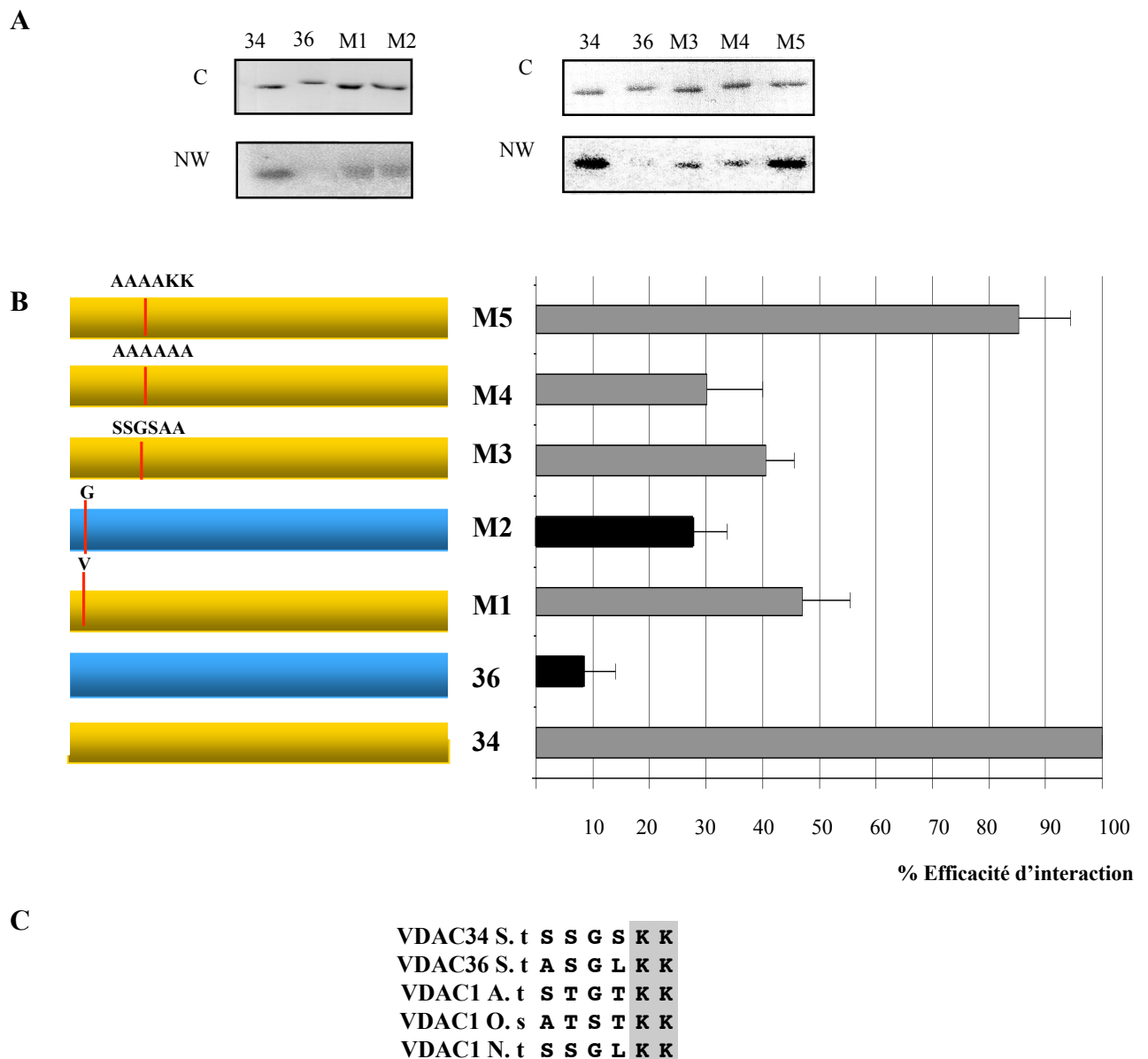


Figure 47

A Exemple d'expérience de northwestern réalisée sur les protéines surexprimées chez *E. coli*, purifiées en condition dénaturante puis fractionnées par SDS-PAGE

C : coloration au bleu de coomassie des protéines purifiées après fractionnement par SDS-PAGE et transfert sur une membrane d'Immobilon-P

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

B Efficacité d'interaction des protéines mutées ponctuellement avec les ARNt radiomarqués

Les histogrammes donnent des valeurs d'interaction moyennes obtenues lors des expériences de northwestern.

L'interaction de VDAC34 avec les ARNt a été prise pour référence, son efficacité d'interaction avec les ARNt est donc de 100%

C Alignement du motif « SSGSKK » de quelques plantes supérieures

S. t : *Solanum tuberosum*, A. t : *Arabidopsis thaliana*, O.s : *Oryza sativa*, N.t : *Nicotiana tabacum*

prédite pour interagir avec les ARN d'après le site BindN (<http://bioinfo.ggc.org/bindn/>). Ce motif a donc été muté chez les protéines M3 à M5.

Les deux lysines du motif « SSGSKK » sont importantes pour l'interaction avec les ARNt (Figure 47)

Les protéines M3 et M4 portent des mutations au niveau du motif « SSGSKK » prédit pour interagir avec les ARN par le logiciel BindN. L'analyse de ces mutants montre que les deux lysines de ce motif sont importantes pour l'interaction de VDAC34 avec les ARNt. En effet, les deux mutants M3 et M4 montrent une réduction de l'interaction de 60%. Par contre, lorsque ces deux lysines sont conservées chez le mutant M5 l'interaction avec les ARNt, de l'ordre de 85%, est toujours aussi efficace. Il semble donc que ces deux lysines jouent un rôle prépondérant dans l'interaction de la protéine VDAC34 avec les ARNt. De manière surprenante, ces deux lysines sont présentes sur la protéine VDAC36 et sont conservées uniquement chez les protéines VDAC de plantes supérieures (**Figure 47**). Dans la mesure où les deux protéines VDAC interagissent avec les ARNt, ces deux acides aminés pourraient donc être des éléments clés pour l'interaction des protéines VDAC de plantes supérieures avec les ARNt et plus généralement avec les acides nucléiques (cf paragraphe 5).

L'acide aminé en 2^e position est crucial pour l'interaction avec les ARNt

Comme le montre l'histogramme présenté sur la **Figure 47**, le remplacement, en position 2, de la glycine en valine sur VDAC34 (construction M1) entraîne une baisse de plus de 50% de l'interaction. A l'opposé le remplacement de la valine par la glycine en position 2 de VDAC36 (construction M2) triple l'interaction de VDAC36 puisque celle-ci passe de 9% à 28%. De plus, les niveaux d'interaction obtenus pour les constructions C5 (48% en moyenne) et C7 (25% en moyenne) sont du même ordre de grandeur que les constructions M1 et M2 respectivement. Ces résultats montrent donc que la glycine en position 2 de VDAC34 joue un rôle non négligeable dans l'interaction avec les ARNt. L'implication de cet acide aminé dans la liaison à l'ARNt n'est pas surprenante. En effet, la mutation de deux glycines d'un motif de liaison aux nucléotides chez deux mutants de la protéine VDAC1 de souris affecte la liaison aux nucléotides (Yehezkel et al., 2007). Ces sites de liaisons aux nucléotides sont d'ailleurs connus pour être riches en lysines, en glycines et en thréonines (Yehezkel et

al., 2006). En effet, ce sont, par exemple, les acides aminés caractéristiques du motif A de liaison à l'ATP (Walker et al., 1982).

4 Etude de l'implication du site de liaison à l'ATP des protéines VDAC dans l'interaction avec les ARNt

4.1 Stratégie d'étude

Les protéines VDAC étaient initialement connues pour le transport de petites molécules telles que l'ATP. Ces protéines possèdent plusieurs sites de liaison aux nucléotides proches du motif A de liaison à l'ATP décrit par Walker et al. : « G(X/G)XGXGKT » (Walker et al., 1982). Ces sites sont répartis tout au long de la protéine. Par exemple, la protéine VDAC de rat possède quatre sites de liaisons à l'ATP : un premier dans la région N-terminale entre les acides aminés 13 à 28, un second au niveau des acides aminés 100 à 120, un troisième au niveau des acides aminés 257 à 274 et enfin un dernier site au niveau des acides aminés 271 à 283 (Yehezkel et al., 2006).

Les acides aminés importants pour l'interaction de la protéine VDAC34 avec l'ARNt sont répartis tout au long de la protéine, tout comme les sites de liaison à l'ATP, ainsi une question qui se posait était de savoir si l'ATP et les ARNt utilisent les mêmes sites de fixation. Pour répondre à cette question, deux expériences de compétition par gel retard ont été réalisées. Des protéines VDAC34 natives ont été incubées avec des ARNt radiomarqués. L'ensemble a ensuite été mis en présence de concentration croissante d'ATP ou d'ARNt non marqués. Ainsi, une compétition entre les ARNt radiomarqués et l'ATP ou les ARNt non marqués induirait un déplacement de l'équilibre VDAC34/ARNt radiomarqués vers la formation des complexes VDAC34/ATP ou VDAC34/ARNt non marqués.

4.2 Analyse des résultats et discussion

Comme le montre la **Figure 48**, pour les pistes du gel correspondant à la protéine VDAC34 incubée avec les ARNt radiomarqués et une gamme croissante d'ARNt, les bandes

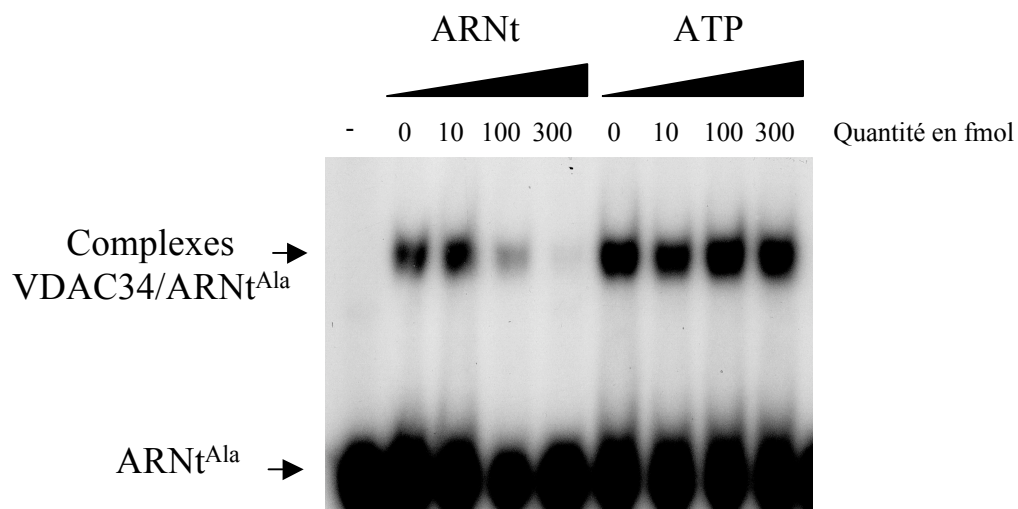


Figure 48

Expérience de compétition de l'interaction VDAC34/ARNt avec des ARNt non marqués et de l'ATP

« - » : contrôle réalisé avec les ARNt^{Ala} radiomarqués incubés dans les tampons utilisés pour l'expérience en absence de la protéine VDAC34

correspondant aux complexes VDAC34/ARNt diminuent progressivement en intensité. Ainsi, l'ARNt non marqué entre en compétition avec l'ARNt radiomarqué et induit une diminution de la formation du complexe VDAC34/ARNt radiomarqué avec un déplacement total de l'équilibre pour 300 fmol d'ARNt non marqués. Par contre, lorsqu'une gamme croissante d'ATP est ajoutée, l'intensité des bandes correspondant au complexe VDAC34/ARNt radiomarqués ne diminue pas. Ainsi, l'ATP ne déplace pas l'équilibre VDAC34/ARNt radiomarqués et n'entre donc pas en compétition avec les ARNt pour la fixation à la protéine VDAC34. Ces expériences montrent ainsi que les protéines VDAC34 possèdent des sites de liaison à l'ATP différents des points de fixation des ARNt.

5 Interaction avec les acides nucléiques

5.1 Choix des acides nucléiques

Dans le département, l'équipe d'A. Dietrich a montré que l'ADN aussi peut être transporté *in vitro* dans des mitochondries de plantes, d'animaux et de levures *via* VDAC (Koulintchenko et al., 2003; Koulintchenko et al., 2006; Weber-Lotfi et al., 2009). De plus, VDAC34 peut interagir avec des ARNt qu'ils soient importés ou non dans les mitochondries végétales (Delage et al., 2003). Ainsi l'interaction des deux protéines VDAC34 et VDAC36 avec différents substrats d'acides nucléiques a été testée. Pour se faire, un ARN quelconque de même taille qu'un ARNt a été produit en réalisant une transcription *in vitro* sur le vecteur pSK digéré de telle manière à avoir 75 nucléotides entre le site d'initiation de la transcription par la polymérase T7 et le dernier nucléotide. Le deuxième substrat étudié est de l'ADN double brin produit par PCR à partir du vecteur contenant la séquence en ADN de l'ARNt^{Ala} cytosolique d'*Arabidopsis thaliana*. Enfin, le dernier substrat testé est de l'ADN simple brin dont la séquence correspond à l'ARNt^{Ala} cytosolique d'*Arabidopsis thaliana*. L'ARNt^{Ala} a été utilisé comme contrôle positif dans nos expériences. L'interaction a ensuite été testée par north/southwestern avec des gammes croissantes équivalentes des deux protéines VDAC puis quantifiée à l'aide du logiciel MacBas.

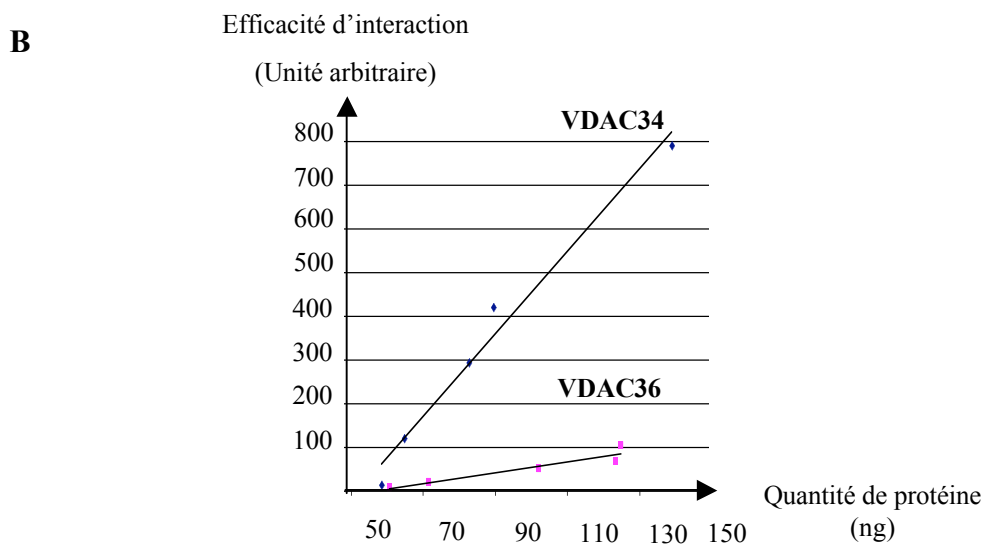
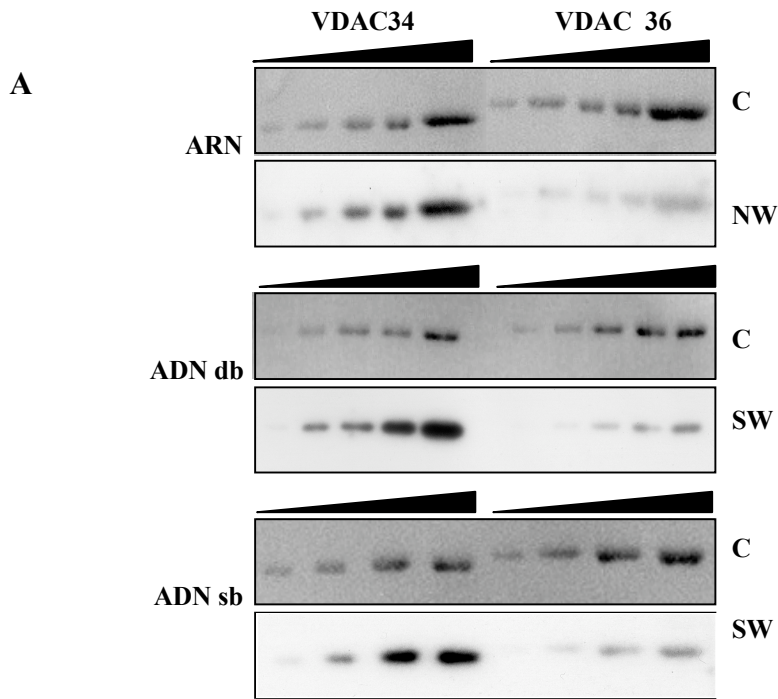


Figure 49

A Expériences de northwestern (NW) et de southwestern (SW) réalisées sur des protéines surexprimées chez *E. coli*, purifiées en condition dénaturante puis fractionnées par SDS-PAGE

Des gammes croissantes des deux protéines VDAC34 et VDAC36 ont été testées pour leur interaction avec un ARN quelconque, un ADN double brin et un ADN simple brin.

C : coloration au bleu de coomassie des protéines purifiées après fractionnement par SDS-PAGE et transfert sur une membrane d'Immobilon-P

NW et SW : Autoradiographie des membranes après les expériences de north/southwestern réalisées avec trois sondes radiomarquées différentes : un ARN quelconque, un ADN double brin et un ADN simple brin.

B Exemple de quantification de l'efficacité d'interaction des protéines VDAC34 et VDAC36 avec l'ADN simple brin

Les droites représentent l'efficacité d'interaction de la protéine VDAC34 et VDAC36 avec l'ADN en fonction de la quantité de protéine

5.2 Analyse des résultats et discussion

Comme pour les résultats obtenus lors de l'interaction différentielle ARNt/VDAC34 et VDAC36, l'analyse de l'interaction entre les deux protéines VDAC34 et VDAC36 et les 3 types d'acides nucléiques montre systématiquement des signaux d'intensité plus forte pour la protéine VDAC34 par rapport à la protéine VDAC36 (**Figure 49A**). La quantification de ces interactions montre des profils similaires d'interaction différentielle entre les deux protéines VDAC34 et VDAC36 et tous les types d'acides nucléiques testés (**Figure 49B**). Ainsi, la protéine VDAC34 interagit dix fois plus que la protéine VDAC36 avec les acides nucléiques qu'ils s'agissent d'ARN ou d'ADN, simple ou double brin.

Au vu des résultats, il semble que VDAC34 soit plus adaptée à l'interaction avec les acides nucléiques. On pourrait donc imaginer qu'elle joue un rôle crucial et différent de VDAC36 au sein des mitochondries. Néanmoins, le Kd de VDAC36 témoigne d'une interaction forte entre cette protéine et les ARNt. Il est donc possible que dans certaines conditions la protéine VDAC36 subisse un changement de conformation permettant de dévoiler des sites de liaison aux acides nucléiques. Comme ces protéines sont capables d'interagir avec différents types d'acides nucléiques, et que chaque organisme possède plusieurs isoformes de VDAC, il est possible que suivant les conditions physiologiques, chaque protéine VDAC lie préférentiellement un type d'acide nucléique. Ces porines assureraient donc des rôles différentiels et complémentaires. De plus, on ne peut exclure qu'elles assurent des rôles différents du transport d'ARNt ou d'ADN. En effet, ces protéines pourraient permettre le passage d'ARN ou d'ADN en faible quantité non détectable avec les outils actuels. Par exemple, des ARN régulateurs pourraient être importés et être impliqués dans le contrôle du métabolisme mitochondrial. Enfin, dans la mesure où certains ARNm sont adressés et traduits préférentiellement à la surface des mitochondries chez la levure et l'homme (Corral-Debrinski et al., 2000 ; Sylvestre et al., 2003a), on ne peut exclure qu'un tel phénomène existe chez les plantes, et que les protéines VDAC pourraient servir de point d'ancrage pour maintenir ou stabiliser des ARNr ou de l'ARN messager par exemple.

6 Conclusion

L'analyse des protéines VDAC mutantes pour leur interaction avec l'ARNt^{Ala} cytosolique d'*A. thaliana* a montré que l'interaction VDAC34-ARNt ne requiert pas un motif précis de fixation aux ARN mais que les acides aminés importants pour l'interaction avec les ARNt sont distribués le long de la protéine. De plus, la structure en tonneau semble vraisemblablement importante. Ainsi, ces acides aminés pourraient par cette structure se regrouper en 3 dimensions pour former un motif d'interaction avec les ARNt comme pour le site de dimérisation de la protéine VDAC1 humaine (Bayrhuber et al., 2008) ou le site formant le « voltage gating » de VDAC de *S. cerevisiae* (Thomas et al., 1993). Pour poursuivre cette étude, d'autres mutants pourraient être envisagés. En effet, la prédiction des acides aminés capables d'interagir avec les ARN ainsi que la modélisation du premier tiers N-terminal de la protéine VDAC34 (**Figure 44**) montrent que la lysine en position 3, la tyrosine en position 8, la lysine en position 13 et l'arginine en position 16 forment, avec les lysines 47 et 48, une interface optimale pour l'interaction avec les ARNt. Ainsi, la mutation de ces acides aminés donnera des informations complémentaires quant à l'interaction de VDAC34 avec les ARNt. De plus, d'autres acides aminés présents dans le reste de la séquence pourraient être mutés. Par exemple, les lysines 61 et 63 sont entourées d'acides aminés capables d'interagir potentiellement avec les ARNt et pourraient constituer des points de fixation pour les ARNt.

Il serait intéressant, d'élargir notre étude aux autres protéines VDAC de la même famille : VDAC30 et VDAC34b. D'autant plus que VDAC30, possédant 52 % d'identité avec VDAC34, est la protéine appartenant à la famille de VDAC de pomme de terre la plus éloignée de VDAC34, alors que VDAC34b avec 85 % d'identité avec VDAC34 est la protéine la plus proche de VDAC34 (**Tableau 7**). Pour l'instant nous ne savons pas si ces protéines peuvent ou non interagir avec les ARNt. Ces travaux permettront ainsi de déterminer s'il existe plusieurs protéines VDAC responsables de l'interaction avec les ARNt chez la pomme de terre. Par la suite, cette même étude sera intéressante chez d'autres plantes et en particulier chez *Arabidopsis thaliana* ou *Chlamydomonas reinhardtii*. Pour étudier le rôle des protéines VDAC dans le transport des ARNt, il serait intéressant d'analyser des mutants de ces protéines. Actuellement, des mutants d'insertion d'ADN-t sont disponibles pour les protéines VDAC1 à 4 d'*Arabidopsis thaliana*. Des essais ont été initiés en

collaboration avec l'équipe de G. Ephritikhine (Institut des Sciences du Végétal, CNRS–UPR 2355, Gif sur Yvette) afin d'étudier l'effet de ses mutants sur le transport des ARNt dans les mitochondries. Chez l'algue verte *C. reinhardtii*, deux gènes codant des protéines VDAC-like, nommées VDACI et VDACII, ont été identifiés. Afin d'étudier le rôle potentiel de ces protéines dans le transport des ARNt, des travaux sont actuellement en cours avec l'équipe de C. Remacle (Université de Liège, Belgique) afin d'inhiber l'expression de ces protéines. Les mutants montrant une expression affaiblie ou nulle sont sélectionnés afin d'analyser leur activité physiologique ainsi que leur contenu en ARNt. Cette étude permettra de déterminer si le transport des ARNt dans les mitochondries est affecté dans ces mutants.

Un autre point qui mérite d'être soulevé est que l'interprétation des résultats se fait en relation avec la structure secondaire prédite de VDAC34. Dans le cadre d'une étude structure/fonction, l'obtention de la structure cristallographique de cette protéine est primordiale pour comprendre pleinement l'interaction des protéines VDAC avec les ARNt. La visualisation du positionnement exact de chaque acide aminé dans l'espace permettra de mieux comprendre comment l'ARNt interagit avec la porine en mettant en évidence par exemple un site de liaison tridimensionnel. Cette structure permettra aussi de comprendre comment l'ARNt peut traverser la porine. En effet, une question qui reste en suspend est de savoir comment l'ARNt, molécule structurée de 25 kDa, traverse un pore de 3 nm de diamètre formé par VDAC. Cette étude a été initiée et est présentée dans le chapitre suivant.

Chapitre II

Essais de cristallisation des protéines VDAC34 et VDAC36 de pomme de terre

1 Préambule

La nature de l'interaction de la protéine VDAC34 avec les ARNt ne pourra être complètement comprise qu'en déterminant la structure tridimensionnelle de cette protéine. Aucune structure de protéine VDAC de plante n'a été résolue à ce jour, et dans la mesure où 30% des génomes code des protéines membranaires (Scheuring & Sturgis, 2005), la résolution de leur structure permettra d'enrichir les connaissances sur les protéines VDAC de plantes et aussi les moyens de cristallisation des protéines membranaires. Ainsi, la cristallisation des protéines VDAC34 et VDAC36 de pomme de terre a été initiée.

Toute étude structurale débute par la purification de la macromolécule, se poursuit par la préparation de cristaux, leur analyse sous rayonnement X et l'exploitation des clichés de diffraction pour aboutir à la structure tridimensionnelle de la molécule. Ainsi, afin de résoudre la structure des protéines VDAC de pomme de terre, trois pré-requis sont nécessaires. Il faut avoir des protéines pures, en condition native et en grande quantité. Cependant, les protéines membranaires posent beaucoup de problèmes pour leur surexpression, leur purification et leur cristallisation.

En effet, la surexpression des protéines membranaires n'a jamais été une chose aisée du fait de leur toxicité dans les cellules (Laage & Langosch, 2001). Par exemple, l'expression de la porine de *Rhodobacter blasticus* chez *E. coli* induit la lyse des cellules sans que la protéine ne soit produite de manière abondante (Bannwarth & Schulz, 2003). Une des hypothèses avancées pour expliquer ce phénomène est que la forte activité canal de la porine perturbe fortement le fonctionnement de la cellule (Vinothkumar et al., 2006). Néanmoins, une manière de contourner ce problème est d'exprimer la protéine membranaire à un niveau très bas. Un autre problème est la protéolyse des protéines membranaires une fois exprimées au sein des cellules. Plusieurs approches peuvent être tentées pour limiter la protéolyse des protéines membranaires : expression à basse température, protéine de fusion, mutagenèse de la protéine pour éliminer des sites de coupure spécifiques, co-expression de chaperons ou expression dans des souches mutantes dépourvues de certaines protéases. Ainsi, pour éviter la protéolyse la protéine OmpF d'*E. coli* a été exprimée dans la souche BL21 d'*E. coli* déficiente en protéase (Bannwarth & Schulz, 2003). Le niveau d'expression des protéines membranaires peut également dépendre de la température de culture des bactéries. Ainsi, bien que la plupart

les protéines soient surexprimées à 37°C de manière courante, le taux de protéine OprM de *Pseudomonas aeruginosa* est triplé lorsque les cellules sont cultivées à 28°C (Mosser et al., 1992).

De plus, il est souvent avantageux de modifier la protéine que l'on veut produire en la fusionnant, la plupart du temps à l'une de ses extrémités, à une autre protéine ou fragment de protéine afin d'accroître sa vitesse de repliement, sa solubilité et/ou de faciliter sa purification. L'une des fusions les plus utilisées est l'addition de 6 histidines qui permet une purification sur colonne de NiNTA même en présence de détergent (Hannig & Makrides, 1998). Par exemple, les protéines TOM40 ont été purifiées à l'aide de cette étiquette et les protéines sont actives dans les bicouches lipidiques (Hill et al., 1998). Néanmoins cette fusion peut provoquer des changements de conformation chez certaines protéines et les rendre inactives. C'est pourquoi des tests sont nécessaires afin de vérifier après purification que la protéine adopte une bonne conformation et est active.

A partir de ces informations, les conditions de surexpression des protéines VDAC de pomme de terre ont été mises au point. Plusieurs souches d'*E.coli* ont été testées pour la surexpression des protéines avant mon arrivée au laboratoire. Il s'agit des souches BL21, M15 et TG2. La souche M15 a permis de surexprimer les protéines VDAC34 et VDAC36 en grande quantité sans que les bactéries ou les protéines ne soient lysées ou dégradées. Le temps et la température de culture des bactéries ont aussi été testés. De manière surprenante, la surexpression des protéines VDAC a toujours été forte quelque soit la condition testée. Les séquences des protéines VDAC ont été additionnées de 6 histidines afin de les fixer sur colonne de NiNTA et de les purifier.

L'expression en quantité importante des protéines VDAC au sein du cytoplasme se traduit par leur agrégation sous forme de corps d'inclusion. Bien que facilitant la purification des protéines, ces corps d'inclusion nécessitent la solubilisation des protéines par dénaturation en présence de détergents puis leur repliement *in vitro*. Les détergents se lient aux faces hydrophobes des protéines leur permettant d'exposer leur face hydrophile et donc d'être soluble dans les solutions aqueuses. De plus, ils permettent aux protéines d'être plus stables et homogènes en solution lors de la production des cristaux. Jusqu'à présent, le choix du détergent nécessite une mise au point souvent ardue, empirique et spécifique pour chaque

protéine. Néanmoins, plusieurs articles montrent que les détergents non ioniques permettent la solubilisation des protéines membranaires (Michel et al., 1991; Hunte & Michel, 2002).

Avant mon arrivée au laboratoire, Thalia Salinas a testé sept détergents non ioniques pour leur capacité à solubiliser la protéine VDAC34 surexprimée chez *E. coli* : le β -octyl glucoside, le LDAO, la digitonine, le dodécyl-maltoside, le Triton X-100, le Tween 20 et le Nonidet P40. Parmi ces détergents, deux ont permis de solubiliser les protéines VDAC. Il s'agit du β -octyl glucoside, détergent doux et le Triton X-100, détergent fort. De plus, elle avait fait un premier essai de purification des protéines VDAC sur une colonne d'hydroxylapatite à partir de protéines surexprimées chez *E. coli*. Cependant, des protéines contaminantes ont co-purifiées avec VDAC34. Ainsi, une deuxième étape de purification a été réalisée sur une colonne de Ni-NTA en tirant parti du fait que la protéine VDAC34 surexprimée possède une queue poly-histidine. Elle a également profité de cette étape pour changer de détergent et passer du Triton X-100 au β -octyl glucoside, détergent plus doux. Finalement, elle a pu obtenir environ 2,5 μ g de VDAC34 pour 500 mL de culture bactérienne. Malheureusement, les essais de cristallogénèse nécessitent au minimum 1 mg de protéines à une concentration minimale de 1 mg/mL. Nous avons donc mis au point un autre protocole afin d'améliorer le rendement de purification.

La cristallisation des protéines membranaires est beaucoup plus difficile et complexe que celle des protéines solubles. En effet, les protéines membranaires sont des systèmes non solubles dans les solutions habituellement utilisées pour la cristallisation des protéines solubles. De nombreux programmes de recherche se sont intéressés à ce sujet et des articles concernant la cristallisation des protéines membranaires ont été publiés récemment (Bayrhuber et al., 2008; Ujwal et al., 2008; Caffrey, 2009; Caffrey & Cherezov, 2009). Ainsi, une fois les protéines VDAC de pomme de terre purifiées, leur activité a été testée par gel retard (cf chapitre I Résultats et discussion) puis en collaboration avec Claude Sauter (UPR 9002, IBMC, Strasbourg), des essais de concentration, de diffusion dynamique de la lumière et de cristallisation des deux protéines VDAC34 et VDAC36 de pomme de terre ont été réalisés.

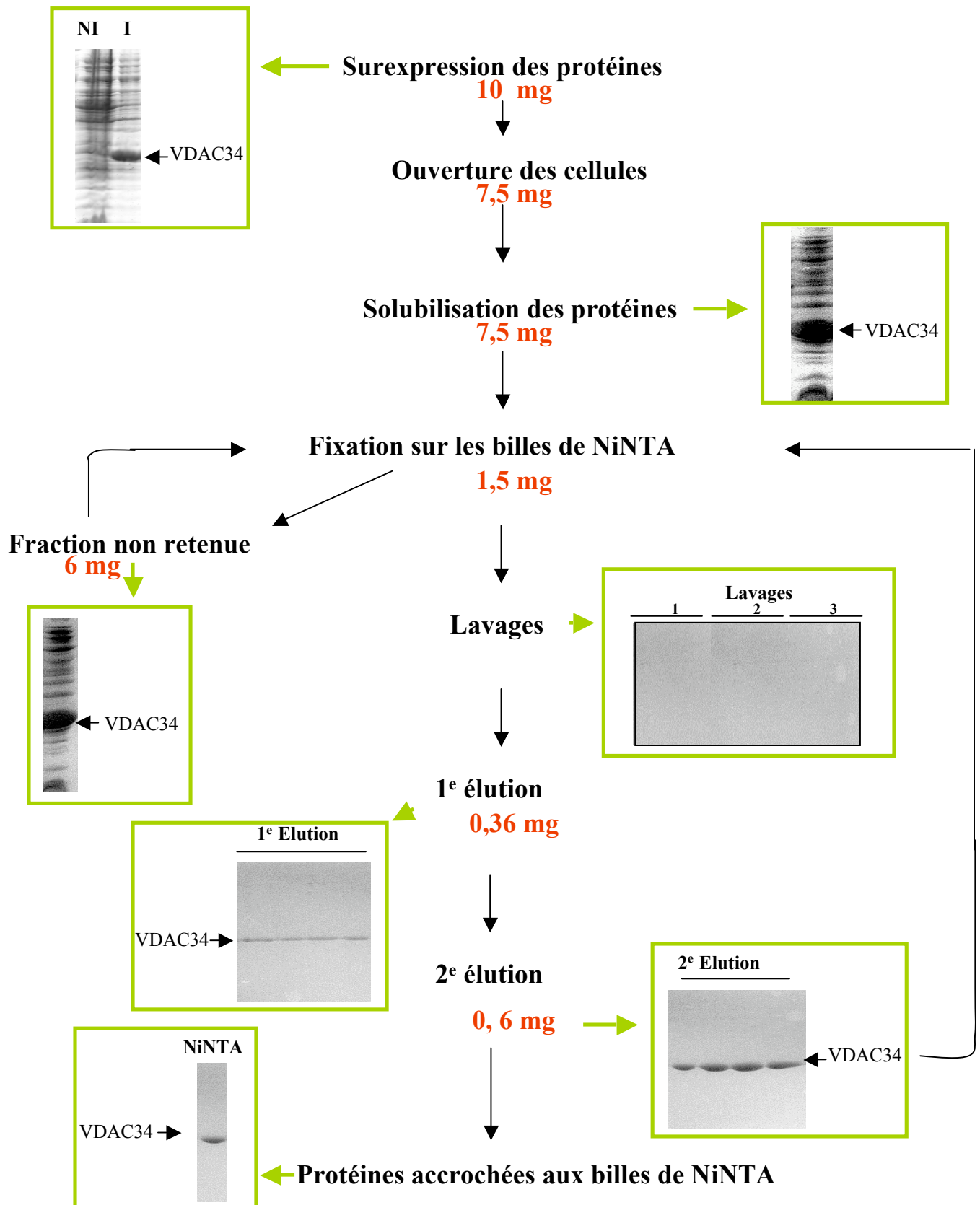


Figure 50 :

Bilan de la purification en condition native de la protéine VDAC34 de *S. tuberosum*

NI : l'expression des protéines VDAC n'a pas été induite à l'IPTG

I : l'expression des protéines VDAC a été induite à l'IPTG

2 Obtention des protéines VDAC34 et VDAC36 pures et natives

2.1 Purification en condition native

Après surexpression dans les cellules d'*E. coli* (**Figure 50**), les deux protéines VDAC34 et VDAC36 ont été purifiées en condition native. Pour obtenir de grande quantité de protéines VDAC en condition native, il s'agit de récupérer un maximum de protéines surexprimées au sein des bactéries. Ainsi, les bactéries ont d'abord été lysées avec du lysozyme, puis incubées avec du Triton X-100 0,2%. Ces étapes ont permis d'obtenir 7,5 mg de chacune des deux protéines à partir de 500 mL de culture bactérienne.

Les protéines ont été ensuite solubilisées dans de l'urée 8M. Après cette étape, les solutions sont centrifugées afin de séparer les protéines solubles des agrégats. Les échantillons ont montré une absence de culot après centrifugation pour les deux protéines VDAC. Ainsi toutes les protéines ont été solubilisées lors de cette étape.

Les protéines solubilisées sont ensuite fixées sur des billes de NiNTA une nuit et les colonnes sont coulées. La fraction non retenue est récupérée. Cette fraction contenait 6 mg de protéines. Afin d'obtenir des protéines natives, la stratégie a été de purifier les protéines en condition dénaturante puis à les renaturer. En effet, les protéines, accrochées à la colonne, ont été lavées par plusieurs tampons contenant des concentrations décroissantes en urée (8 à 0M) et du β -octyl glucoside (2% (p/v)). Le choix de ce détergent s'explique par le fait qu'il soit doux, qu'il solubilise les protéines VDAC de pomme de terre et surtout que c'est un détergent glycosidique connu pour stabiliser les protéines membranaires (Arnold & Linke, 2007). Ces étapes permettent de renaturer les protéines VDAC. Les protéines ont ensuite été éluées à l'aide d'une solution contenant de l'imidazole à 250 mM et du β -octyl glucoside à 0,2%. Cette étape a permis de récupérer 0,36 mg de protéines pures et natives. Une seconde élution a été réalisée à l'aide d'une solution contenant de l'imidazole 250 mM et de l'urée 8M qui a permis de récupérer 0,6 mg de protéines.

Le rendement de purification de cette colonne est de 4,8%. Ainsi, les protéines récupérées lors de la deuxième élution ainsi que la fraction non retenue sur la colonne ont été utilisées pour une deuxième purification. Ces étapes de purification ont été répétées trois fois

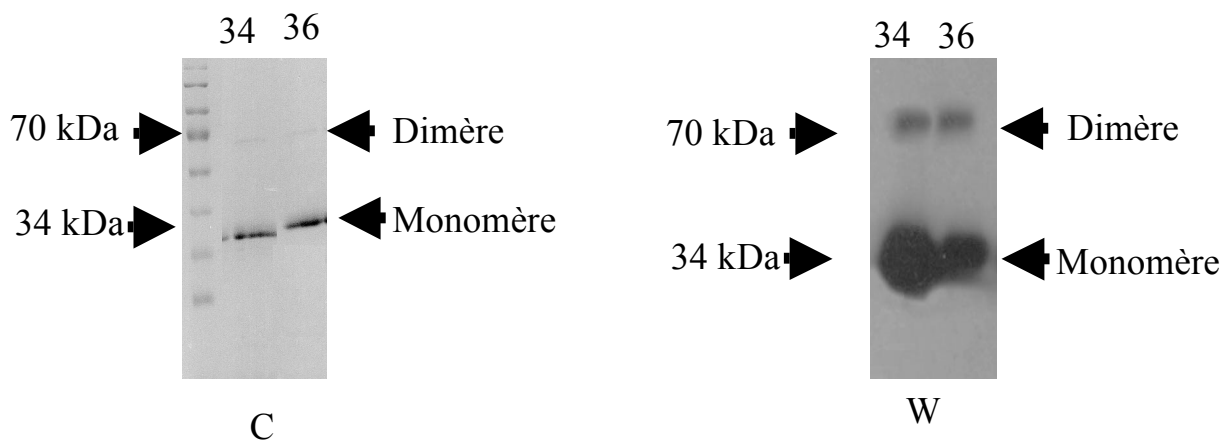


Figure 51 :

Analyse des protéines surexprimées chez *E. coli*, purifiées en condition native puis fractionnées par SDS-PAGE

C: Coloration du gel à l'argent

W: western blot réalisé avec des anticorps dirigés contre les protéines VDAC de pomme de terre

34 : VDAC34, 36 : VDAC36

pour chacune des deux protéines VDAC34 et VDAC36. Ainsi à partir de 500 mL de culture bactérienne nous avons obtenu 1 mg de chacune des deux protéines VDAC de pomme de terre à 0,09 mg/mL.

2.2 Concentration des protéines

Afin de réaliser des essais de cristallisation il faut de façon optimale avoir une concentration de 1 mg/mL en protéine. Le principal problème pour les protéines VDAC est qu'au-dessus d'une certaine concentration, les protéines précipitent.

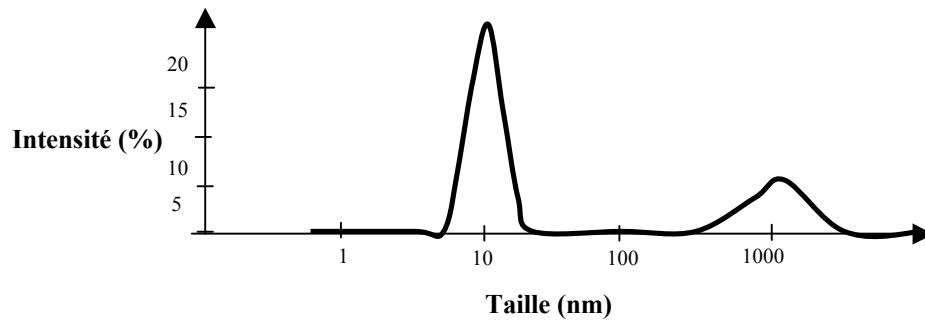
Pour concentrer les protéines VDAC, nous avons opté pour le kit Amicon (Millipore) basé sur la filtration des solutions par centrifugation. Les tests réalisés sur les deux protéines VDAC ont permis de les concentrer jusqu'à 0,5 mg/mL avant qu'elles ne précipitent.

Cette concentration est beaucoup plus faible que celles utilisées pour cristalliser les protéines VDAC. En effet, plus d'un an et demi après nos essais, les structures des protéines VDAC1 de souris et humaine ont été publiées (Bayrhuber et al., 2008; Ujwal et al., 2008). Ces protéines étaient à des concentrations comprises entre 5 et 15 mg/mL. Les protéines VDAC de plantes semblent avoir un comportement différent des autres protéines puisqu'elles précipitent au-delà de 0,5 mg/mL. Les détergents utilisés pour les protéines VDAC de mammifères sont pour la protéine de souris le DMPC et le CHAPSO, et pour la protéine humaine le LDAO. Ces détergents pourraient stabiliser les protéines VDAC de plantes et leur permettre d'être plus concentrées. Ainsi, une alternative pour concentrer les protéines VDAC de pomme de terre serait donc de tester ces détergents.

2.3 Contrôle de pureté des échantillons

Pour produire des cristaux, il faut des échantillons très purs afin de permettre l'empilement régulier des protéines. Ainsi, la pureté des échantillons a été vérifiée par coloration à l'argent. Etant mille fois plus sensible que le bleu de Coomassie, le nitrate d'argent permet de détecter jusqu'à 0,1 ng de protéines. Ainsi les deux protéines VDAC34 et VDAC36 ont été fractionnées sur un gel dénaturant puis colorées à l'argent. La coloration a

Avant ultracentrifugation



Après ultracentrifugation

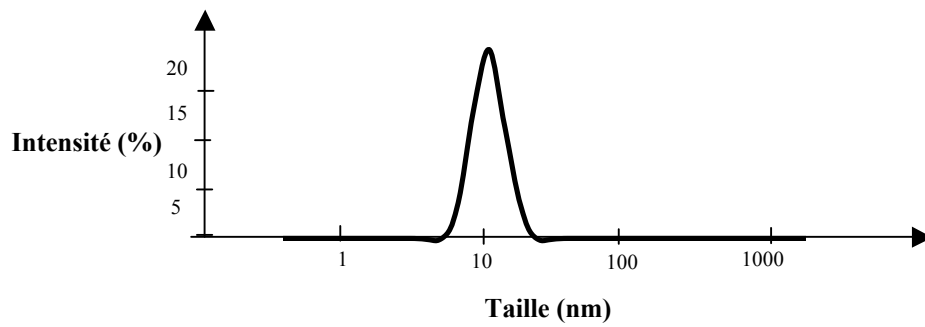


Figure 52 :

Diagrammes obtenus lors des expériences de DLS pour la protéine VDAC34 de pomme de terre

révélé que les protéines étaient pures à 99% (**Figure 51**). De plus, lors de la coloration, sont apparues deux fines bandes à environ 70 kDa. Ces bandes semblent correspondre à un dimère de protéines. Ce résultat a été confirmé. Un western blot réalisé sur une membrane contenant les protéines VDAC34 et VDAC36 natives montre la présence des formes monomériques et dimériques. Ces résultats corroborent ceux trouvés dans la littérature. En effet, il a été décrit que les protéines VDAC de pomme de terre peuvent former des monomères et des dimères (Hoogenboom et al., 2007).

2.4 Analyse de la monodispersité des protéines VDAC purifiées

Pour envisager des essais de cristallisation, les molécules doivent être d'une part monodisperses, c'est-à-dire qu'elles doivent exister en solution sous forme d'un oligomère simple (monomère, dimère) et d'autre part la solution doit être homogène, c'est-à-dire qu'une seule population de molécules doit exister en solution. La technique de diffusion dynamique de lumière («Diffusion Light Scattering» ou DLS) a été choisie pour avoir des informations sur l'homogénéité et la dispersion de la solution de particules. Les expériences réalisées en DLS montrent pour les deux protéines VDAC34 et VDAC36 la présence de plusieurs pics à différentes tailles. En effet, un premier pic est obtenu à 10 nm. Ce diamètre correspond à une particule de 70 kDa compatible avec un monomère de protéine VDAC entouré d'une bouée de détergent. De plus, un pic à 1000 nm est visible. Il semble correspondre à des agrégats de protéines VDAC. Pour les essais de cristallisation, les agrégats doivent être éliminés afin de permettre la nucléation des cristaux de protéines. Ainsi, des ultracentrifugations à 100 000 g ont été réalisées afin d'éliminer les complexes de grandes tailles et de récupérer les protéines non complexées. Les tests, réalisés après ultracentrifugation, montrent que les solutions sont homogènes. En effet, pour les deux protéines VDAC, un seul pic à 10 nm est obtenu. La présence de ce seul pic montre qu'une seule population de protéines existe en solution (**Figure 52**). Et comme auparavant la taille de ce pic est compatible avec un monomère de protéines entouré d'une bouée de détergent. Ces tests ont été répétés un an plus tard sur les mêmes échantillons et les résultats obtenus ont été similaires démontrant que les protéines VDAC sont très stables en solution.

β -octyl-glucoside (0,7%)

Docécyl-maltoside (0,01%)

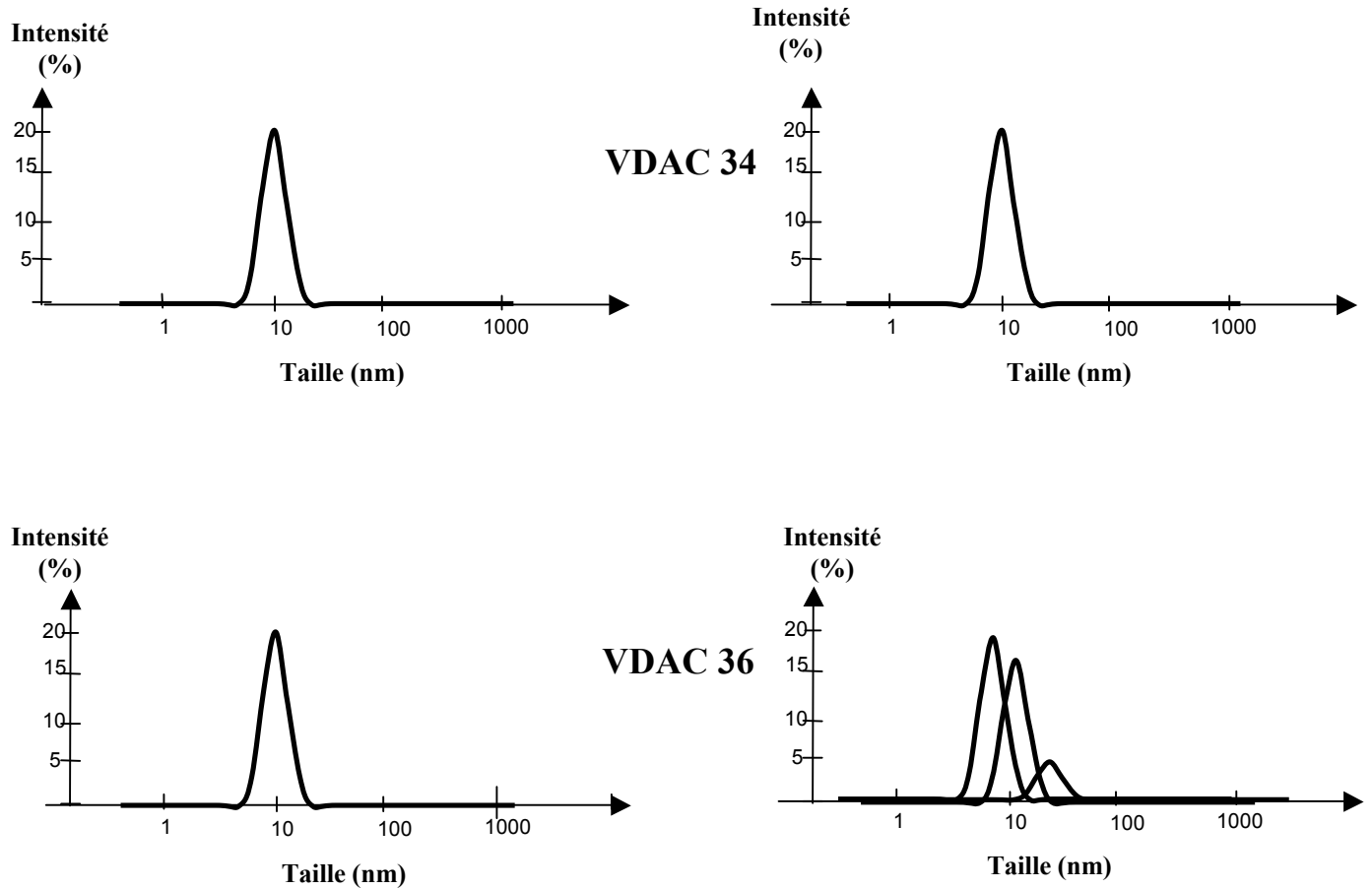


Figure 53 :

Effet du détergent sur les protéines VDAC de *S. tuberosum*

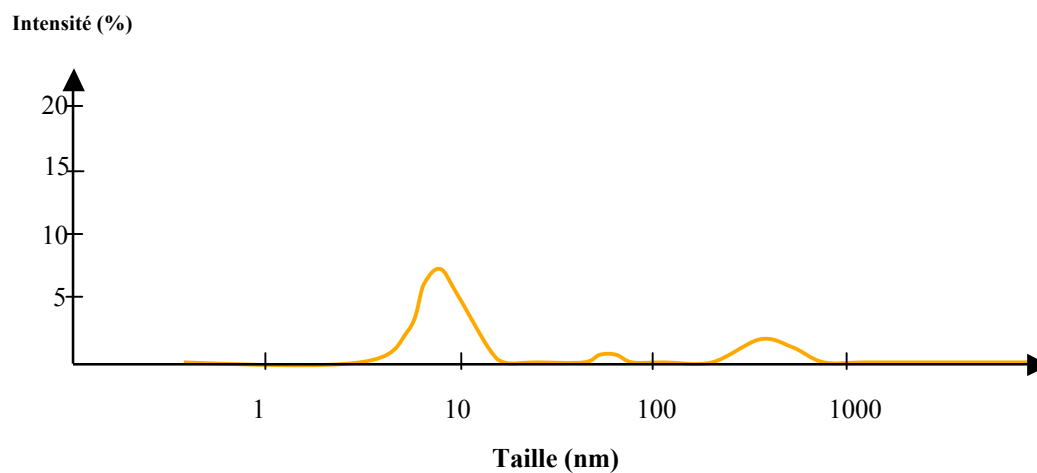
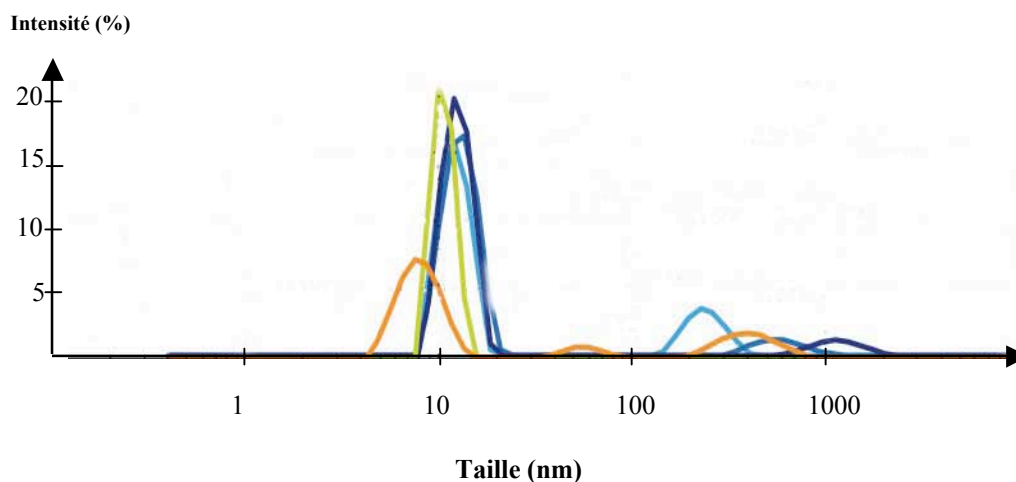
Les deux protéines VDAC34 et VDAC36 ont été mises en présence de β -octyl-glucoside (0,7 %) ou de docécyl-maltoside (0,01 %). Elles ont ensuite été soumises à une expérience de DLS.

2.5 Essai des détergents pour la cristallisation des protéines VDAC de pomme de terre

La cristallisation des protéines membranaires nécessitent l'utilisation de détergent. Ces composés solubilisent les protéines et leur permettent d'être plus stables et homogènes en solution favorisant ainsi leur empilement lors de la production des cristaux

Pour les essais de cristallisation, le comportement des protéines VDAC dans les détergents a été testé. Un détergent couramment utilisé pour la cristallisation des protéines membranaires a été choisi dans un premier temps : le dodécyl-maltoside. Ce détergent a en plus l'avantage d'être moins coûteux que le β -octyl-glucoside utilisé lors de la purification des protéines. Les protéines VDAC ont subi une dialyse afin d'échanger le β -octyl-glucoside (2%) contre le dodécyl-maltoside (0,01%), puis leur comportement a été analysé par DLS. Comme le montre la **figure 53**, un seul pic est obtenu pour les protéines VDAC34 montrant que les protéines sont homogènes en solution en présence de dodécyl-maltoside. Par contre, pour les protéines VDAC36, plusieurs pics correspondant à différentes populations sont visibles. L'échantillon est donc devenu hétérogène en présence de dodécyl-maltoside.

Nous avons alors décidé de conserver le β -octyl-glucoside comme détergent mais d'essayer de l'utiliser à une concentration inférieure à celle utilisée lors de la purification (2%) des protéines afin de réduire les coûts de cristallisation. Ce détergent a d'ailleurs été utilisé pour la cristallisation des porines OmpLA (Blaauw et al., 1995), OmpT (Vandeputte-Rutten et al., 2001) et Omp32 (Zeth et al., 2000) d'*Escherichia coli* et ScrY de *Salmonella typhimurium* (Forst et al., 1998). Les tests réalisés en présence de β -octyl-glucoside à 0,7% ont montré que les deux protéines VDAC sont homogènes (**Figure 53**). En effet, un seul pic est obtenu à 10 nm. Comme précédemment, cette taille est compatible avec un monomère entouré d'une bouée de détergent. Ainsi, une population homogène et monodisperse existe en solution en présence de ce détergent pour les deux protéines VDAC. Au vu de ces résultats nous avons décidé de travailler avec le β -octyl-glucoside.

A**B****Figure 54 :****A Diagramme obtenu par l'expérience de DLS pour l'ARNt^{Ala} avant ajout de VDAC34****B Diagrammes obtenus par l'expérience de DLS pour la protéine VDAC34 seule, l'ARNt^{Ala} seul, et les deux macromolécules ensemble.**

Superposition des spectres de DLS obtenus pour plusieurs expériences indépendantes réalisées avec les protéines VDAC34 seules (en vert), les ARNt^{Ala} seuls (en orange) et les ARNt^{Ala} additionnés de 1,5 μg, 3 μg, et 4,5 μg de protéines VDAC34 (respectivement en dégradé de bleu du plus clair au plus foncé).

3 Tests d'activité des protéines VDAC

3.1 Etude de l'interaction des protéines VDAC avec les ARNt par la technique de gel retard

Les protéines purifiées ont été testées pour leur interaction avec les ARNt par des expériences de gel retard afin de contrôler qu'elles sont correctement repliées (cf Chapitre I Résultats et discussion). Le différentiel d'interaction initialement obtenu entre les deux protéines VDAC34 et VDAC36 avec l'ARNt^{Ala} cytosolique *d'Arabidopsis thaliana* par la technique de northwestern est également visible. De plus, la protéine VDAC34 interagit dix fois plus que la protéine VDAC36 avec les ARNt. Ainsi, les deux protéines VDAC34 et VDAC36 semblent correctement repliées et prêtes pour des essais de cristallisation.

3.2 Analyse de l'interaction des protéines VDAC avec les ARNt par diffusion dynamique de la lumière

Afin de valider l'interaction de la protéine VDAC34 avec l'ARNt^{Ala} en condition native, des tests ont été effectués par la technique de diffusion dynamique de la lumière. Cette technique permet, en plus de déterminer la taille d'une particule ou d'un complexe, de visualiser en temps réel la formation d'un complexe. Ainsi, la protéine VDAC34 native seule, de l'ARNt^{Ala} issu de transcription *in vitro* seul, et enfin ces deux macromolécules mises ensemble en solution ont été analysés.

Dans un premier temps, la protéine VDAC34 purifiée en condition native, présente en solution dans 0,7% de β -octyl-glucoside a été testée. Cette protéine est à une concentration de 0,5 mg/mL. Comme le montre la **figure 54B**, nous obtenons comme précédemment un pic à 10 nm correspondant à des particules de 70 kDa compatibles avec un monomère de protéine entouré d'une "bouée" de détergent.

Dans un second temps, 1 mg d'ARNt^{Ala} a été produit à partir de transcription *in vitro*. Lors de son fractionnement sur gel de polyacrylamide 15%, plusieurs populations de grande taille ont été mises en évidence. Les ARNt ont alors été élués du gel et mis à précipiter. Ainsi,

420 µg d'ARNt à 6 mg/mL ont pu être soumis à une analyse DLS. Ces ARNt sont placés extemporanément dans 10 mM MgCl₂ et ont été dénaturés par chauffage à 70°C puis renaturés par refroidissement progressif. Les premiers spectres obtenus montrent qu'en plus des ARNt, plusieurs populations existent en solution, en particulier des agrégats (à 80 et 700 nm). Ainsi, pour s'affranchir de ces complexes, des ultracentrifugations à 400 000 g ont permis de récupérer le surnageant composé des molécules d'ARNt non complexés. L'analyse par DLS de ces ARNt a montré l'existence d'un pic majoritaire à 8 nm pour 80% des molécules (**Figure 54A**). Ce pic correspond aux ARNt libres en solution. Les 20% des particules d'ARNt restant forment des agrégats de grande taille.

Lorsque, la protéine VDAC34 a été ajoutée à la solution d'ARNt en quantité équivalente, le pic des ARNt à 8 nm est déplacé vers 15 nm (**Figure 54B**). Ce dernier pic correspond à une particule de plus grande taille que les ARNt compatible avec un complexe VDAC34/ARNt. De plus, les pics correspondant aux agrégats d'ARNt diminuent en intensité. Il semble donc que les protéines VDAC34 déplacent un équilibre d'agrégats d'ARNt vers les complexes VDAC34/ARNt. Néanmoins, il est possible que le signal des complexes VDAC34/ARNt finisse par masquer la contribution des agrégats. Enfin, l'intensité du signal a doublé. Cette intensité correspond à la quantité de particules présentes en solution. Cette augmentation de l'intensité s'explique par l'ajout des protéines VDAC34 aux ARNt en quantité équivalente. Cette expérience montre ainsi en temps réel que les protéines VDAC34 sont dynamiques en solution et correctement repliées.

Ces tests sont en cours de réalisation avec les protéines VDAC36.

4 Essais de cristallisation des protéines VDAC de pomme de terre

La production de cristaux des protéines membranaires constitue une étape limitante majeure quant à l'analyse structurale. Le criblage des conditions permettant la cristallisation des protéines est un processus long dans la détermination de la structure moléculaire des protéines membranaires. Cela implique de réaliser des criblages sur un grand nombre d'agents cristallisants jusqu'à l'obtention de conditions idéales permettant la cristallisation de la protéine d'intérêt. La recherche de ces conditions de cristallisation a toujours été ardue, empirique et spécifique de chaque protéine membranaire.

4.1 Technique de la diffusion de vapeur

Dans une première approche, la technique de diffusion de vapeur a été choisie pour cribler les conditions de cristallisation des protéines VDAC de pomme de terre. En effet, un kit commercial conçu pour les protéines membranaires (MbClass II, Qiagen) a été testé. Ce kit permet de cribler 96 conditions de cristallisation réunies dans une plaque (cf **annexe 1 à 3**). Ainsi 11 agents cristallisants ont été testés à des pH compris entre 3,3 et 9,5. Cette plaque a été placée à 4°C et observée régulièrement pour la formation de cristaux.

Pour ce premier criblage, nous avons pu mettre en évidence la production de cristaux pour plusieurs conditions. Cependant, les cristaux soumis aux rayons X se sont révélés être des cristaux de sels. Au vu de ses résultats, nous avons affiné la recherche des conditions de cristallisation en éliminant les conditions testées par ce criblage.

4.2 Technique de diffusion contre capillaire

Une seconde approche a alors été envisagée. La technique de diffusion contre capillaire a été utilisée pour des conditions conçues spécialement pour les protéines membranaires (Capillary Counterdiffusion Kits®, Triana science and technology). Les deux protéines VDAC34 et VDAC36 à 0,5 mg/mL en solution dans du β -octyl glucoside 0,7% ont été placées dans 12 conditions réparties en deux types d'agent cristallisant et six pH (cf **annexe 4**). Le premier agent cristallisant est le malonate de sodium à 3 M, il a été testé pour les pH 4 à 9. Le deuxième est une solution renfermant trois PEG différents (15% PEG 400, 10% PEG 4000, 5% PEG 8000) et du sulfate de lithium à 0.2 M. Cette solution a également été testée pour les pH 4 à 9. Il est intéressant de noter que ces agents ont été utilisés pour la cristallisation des protéines membranaires telles que les porines Omp32 d'*E. coli* (Zeth et al., 2000) et ScrY de *Salmonella typhimurium* (Forst et al., 1998). Ces capillaires ont été placés à 4°C en avril 2008 puis régulièrement observés pour la formation de cristaux.

L'observation des capillaires a montré au bout d'un mois la présence de séparations de phase accompagnées d'éléments qui scintillent dans les capillaires plongés dans les solutions de malonate de sodium 3M. Ces séparations de phase s'expliquent par le fait que le β -octyl glucoside placé à faible température voit sa solubilité diminuer. Ces séparations de phase

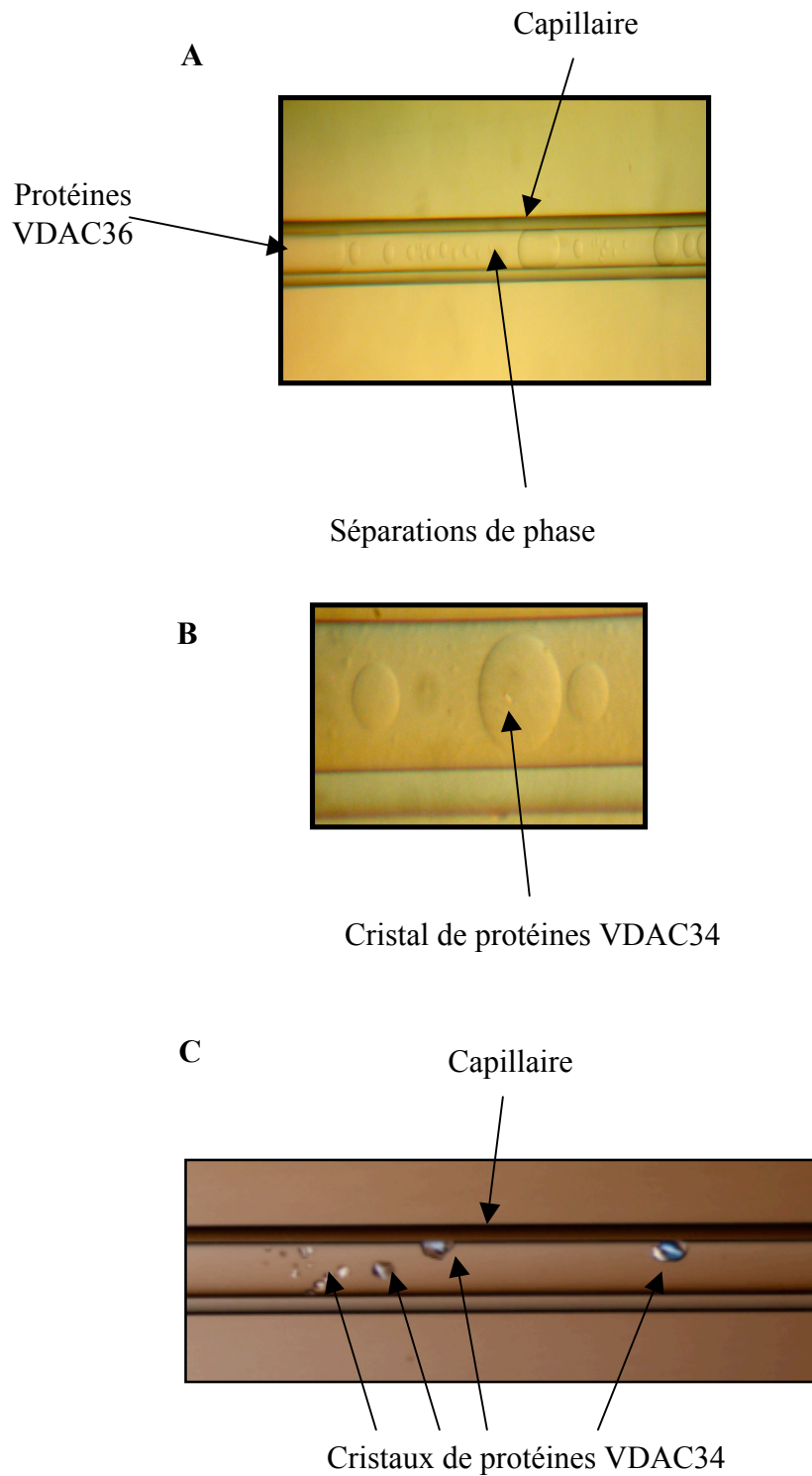


Figure 55 :

Photographies de capillaires utilisés pour la technique de diffusion contre capillaire

A Séparation de phases obtenues après un mois d'incubation des protéines VDAC36 contenu dans le capillaire plongé dans du malonate de sodium 3 M pH 6

B Séparations de phases avec un cristal obtenu après deux mois d'incubation des protéines VDAC36 à 4°C pour la condition malonate de sodium 3 M pH 7

C Cristaux obtenus après deux mois d'incubation des protéines VDAC34 à 4°C pour la condition 15% PEG 400, 10% PEG 4000, 5% PEG 8000 et sulfate de lithium à 0.2 M pH 6

favorisent la nucléation des cristaux et sont d'ailleurs utilisées pour la cristallisation des protéines membranaires (Arnold & Linke, 2007). Les capillaires plongés dans une solution de 15% PEG 400, 10% PEG 4000, 5% PEG 8000 et de sulfate de lithium à 0.2 M n'ont montré aucun changement.

Deux mois plus tard, le capillaire contenant les protéines VDAC36 plongé dans la solution de malonate de sodium 3 M pH 6 présentait des séparations de phase. De plus, plusieurs cristaux ont été produits pour les conditions suivantes : solutions de malonate de sodium 3 M pH 6 et 7 et solution de PEG/sulfate de lithium pH 6 pour VDAC34, solution de malonate de sodium 3 M pH 7 pour VDA36 (**Figure 55**). Ces cristaux bien que de petites tailles ont été soumis à des tirs au synchrotron. Les résultats obtenus ont confirmé que c'étaient des cristaux de protéines. Malheureusement les tâches obtenues ne diffractent pas suffisamment pour être analysables. La technique du capillaire ne permet pas aux cristaux de pousser indéfiniment puisqu'ils sont limités par la taille du capillaire (0,5 μm). Les conditions testées doivent donc être reprises dans la technique de diffusion de vapeur afin d'obtenir des cristaux de grande taille.

Les conditions de cristallisation, publiées en octobre 2008, qui ont donné les meilleurs cristaux sont pour la protéine VDAC1 de souris 18–20% 2-méthyl-2,4-pentanediol (MPD) dans 10% PEG 400 à pH 8.5 et pour la protéine VDAC1 humaine 30% PEG 400 à pH 7.5 et 0.2 M chlorure de magnésium (Bayrhuber et al., 2008; Ujwal et al., 2008). Le PEG est l'agent cristallisant commun pour les protéines VDAC de mammifères et de pomme de terre. Ces essais sont donc encourageants et pourraient permettre après optimisation de produire des cristaux de grande taille qui diffractent et dont la tâche de diffraction est exploitable. Des tests peuvent être envisagés en plaçant les protéines VDAC de pomme de terre dans du MPD ou du chlorure de magnésium. Une autre alternative serait d'ajouter du glycérol à 20%. En effet, il a été rapporté que cet ajout permet d'augmenter la taille des cristaux (Hinnah et al., 2002).

Une autre possibilité serait de placer les protéines VDAC au sein de lipides dans un ratio 2/3 et d'ajouter les agents cristallisants (Caffrey, 2003). En effet, cette technique permet de cristalliser des protéines membranaires en formant spontanément une phase lipidique autour des protéines favorisant la production de cristaux (Caffrey, 2009; Caffrey & Cherezov, 2009). Bien qu'à l'heure actuelle le mécanisme reste inconnu, cette technique semble prometteuse pour la cristallisation des protéines membranaires.

5 Conclusion

Nos expériences ont permis de produire assez des deux protéines VDAC de pomme de terre pour des essais de cristallisation. Les tests effectués par gel retard et DLS ont permis de valider que les protéines étaient stables et homogènes en solution en présence de β -octylglucoside. Le criblage réalisé par la technique de diffusion contre capillaire a permis de définir plusieurs conditions permettant l'obtention de cristaux de protéines. Ces conditions vont être reprises pour la technique de diffusion de vapeur afin de produire des cristaux de grande quantité. Une fois la production de cristaux de grande taille et l'obtention de taches de diffraction exploitable, la structure de ces protéines pourra être résolue et la position de chaque acide aminé pourra être visualisée en 3D. Ainsi, l'interaction entre les protéines VDAC de pomme de terre et les ARNt pourra être mieux comprise.

Les tests de DLS réalisés en mettant en présence la protéine VDAC34 et l'ARNt^{Ala} issus de transcription *in vitro* sont les premiers du genre. Aucune publication ne traite de ce type d'expérience. En effet, le fait que les transcrits d'ARNt s'agrègent facilement en solution remet en question notre conception du comportement de ces macromolécules en solution. Pour s'affranchir de ces agrégats, des ultracentrifugations ont permis de récupérer les molécules d'ARNt non complexés. Cette solution d'ARNt laisse envisager des essais de co-cristallisation des protéines VDAC avec les ARNt. En effet, dans la littérature beaucoup de protéines ont vu leur cristallisation favorisée en présence de leur substrat. Par exemple, les aminoacyl-ARNt synthétases sont cristallisées beaucoup plus vite lorsqu'elles sont en présence de leurs ARNt homologues, probablement parce qu'elles sont stabilisées (Yaremchuk et al., 1995). Ainsi, dans l'optique de mieux comprendre l'interaction de VDAC avec les ARNt, cette co-cristallisation va être initiée.

Chapitre III

Recherche de partenaires de VDAC potentiellement impliqués dans le transport des ARNt dans les mitochondries de plantes

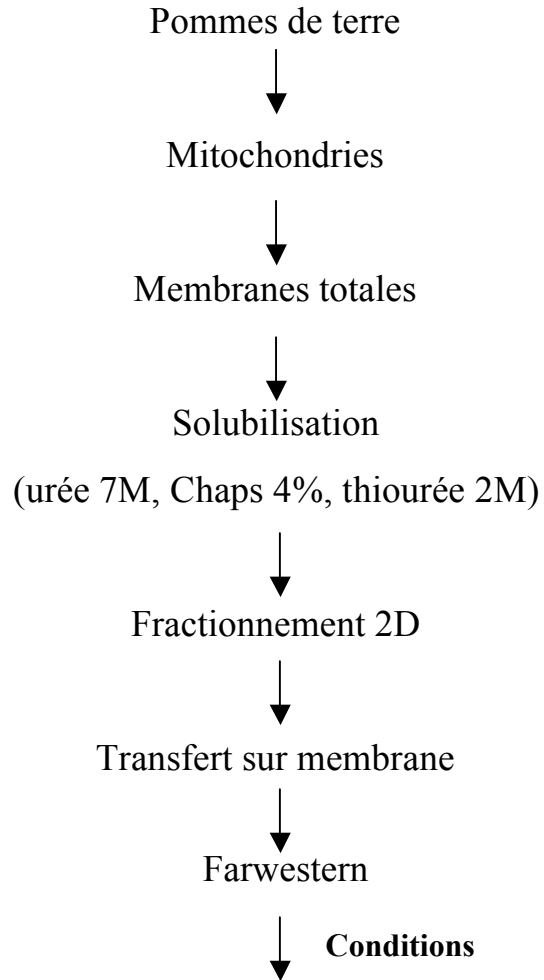
1 Préambule

Les ARNt sont des molécules de 25 kDa chargés négativement. Pour atteindre la mitochondrie, ils doivent traverser la double membrane mitochondriale, et ceci contre le gradient électrochimique de la membrane interne. A ce jour, les travaux publiés portant sur l'étude des mécanismes impliqués dans l'importation des ARNt au sein des mitochondries ont permis de proposer trois modèles très différents chez la levure, les protozoaires et les plantes (cf paragraphe II.2.3 Introduction).

Le premier modèle repose sur l'adressage de l'ARNt^{Lys(CUU)} dans les mitochondries de *S. cerevisiae* (Tarassov et al., 2007). Ce processus est ATP-dépendant et nécessite l'intégrité du potentiel membranaire mitochondrial. L'ARNt^{Lys} est tout d'abord aminoacylé par la lysyl-ARNt synthétase cytosolique. Il est ensuite reconnu par l'énolase, une enzyme glycolytique qui le dirige vers la surface de la mitochondrie. A ce niveau l'énolase rentre dans le complexe glycolytique et l'ARNt est pris en charge par le précurseur de la lysyl-ARNt synthétase mitochondriale qui est synthétisé à la périphérie des mitochondries (Entelis et al., 2006). Cette protéine précurseur va entraîner l'ARNt dans la mitochondrie *via* le complexe d'importation des protéines (Tarassov et al., 1995a).

Le second modèle correspond à un mécanisme de transport direct des ARNt dans les mitochondries de *Leishmania* (Adhya, 2007). Il ne ferait intervenir aucun facteur cytosolique. Les ARNt destinés à être importés sont tout d'abord reconnus et fixés par le récepteur TAB (« Tubulin antisense binding ») au niveau de la membrane externe. Après le passage à travers la membrane externe, les ARNt sont pris en charge par un deuxième complexe au niveau de la membrane interne appelé RIC (« RNA Import Complex ») composé de 11 sous-unités majeures, dont 4 présentent des homologues avec les sous-unités des complexes respiratoires (Chatterjee et al., 2006; Goswami & Adhya, 2006). Ce modèle n'a pu être proposé que par le laboratoire de S. Adhya et des résultats contradictoires, ou donnant sujet à controverse ont été obtenus par d'autres équipes travaillant sur le mécanisme d'importation chez *Leishmania* ou *Trypanosoma* (Paris et al., 2009).

Les données concernant la machinerie d'importation des ARNt au sein des mitochondries végétales est encore très parcellaire. Cependant, la sensibilité de l'importation



	1	2	3	4
Incubation avec VDAC native	-	+	-	+
Western réalisé avec du Sérum pré-immun	+	+	-	-
Western réalisé avec des anticorps dirigés contre VDAC	-	-	+	+

Figure 56

Schéma de l'expérience de farwestern réalisée sur les membranes totales de mitochondries de pomme de terre

des ARNt aux traitements des mitochondries par des protéases, suggère qu'il existe un ou des récepteurs, au niveau de la membrane externe, impliqués dans l'importation des ARNt (Delage et al., 2003). Les premières données suggèrent que la fixation des ARNt à la surface mitochondriale se fasse par un complexe protéique qui pourrait comprendre au moins deux protéines du complexe TOM, TOM20 et TOM40 puisque des anticorps dirigés contre ces protéines inhibent l'importation *in vitro* des ARNt dans les mitochondries (Salinas et al., 2006). Le passage des ARNt à travers la membrane externe se ferait ensuite par le pore formé par la protéine VDAC (Salinas et al., 2006). Le passage à travers la membrane interne reste pour l'instant inconnu. Cependant, bien que les machineries d'importation des protéines et celle des ARNt dans la mitochondrie utilisent des facteurs communs, des expériences de compétition *in vitro* ont montré qu'en absence de facteur cytosolique les deux voies de transport sont bien distinctes.

Pour continuer la caractérisation des facteurs impliqués dans le transport des ARNt, nous avons décidé de rechercher les partenaires protéiques des protéines VDAC potentiellement impliqués dans le transport des ARNt au sein des mitochondries de plantes. Pour se faire, nous avons utilisé la technique du farwestern sur des protéines des membranes mitochondriales, qui permet de mettre en évidence des interactions entre deux protéines. Cette approche a été réalisée en collaboration avec P. Hammann, responsable de la plateforme « Protéomique » de l'Esplanade à Strasbourg (IBMP, IBMC, GMGM).

2 Méthodologie

La technique de farwestern a été réalisée en plusieurs étapes (**Figure 56**). Tout d'abord, 10 µg de protéines des membranes mitochondriales de pomme de terre ont été fractionnées sur un gel à deux dimensions. Les protéines ont ainsi été séparées en fonction de leur charge et de leur poids moléculaire. Ces protéines ont ensuite été transférées sur une membrane d'Immobilon-P, renaturées puis incubées en présence de 200 ng de protéine VDAC34 native. Un western a ensuite été réalisé sur la membrane à l'aide d'anticorps dirigés contre les protéines VDAC. La révélation du western permet de mettre en évidence les protéines VDAC ainsi que leurs partenaires auxquelles elles se sont fixées.

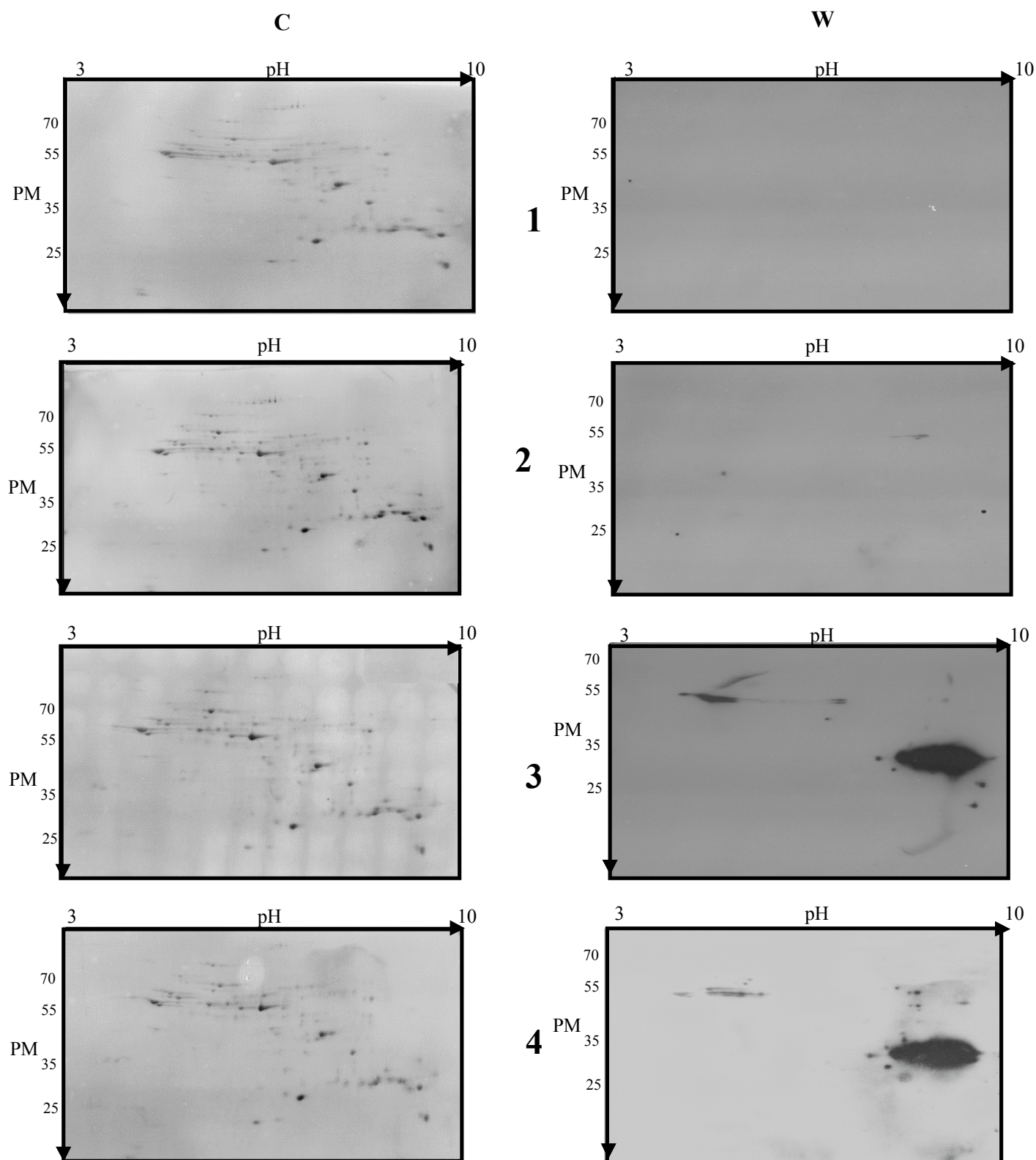


Figure 57

Coloration au bleu de coomassie des membranes totales de mitochondries de pomme de terre fractionnées sur des gels 2D (C) et Autoradiographie (W) des membranes pour les conditions 1 à 4 après l'expérience de farwesten réalisée avec de la VDAC34 native

Plusieurs contrôles sont nécessaires afin d'interpréter les résultats obtenus. Pour se faire, trois autres membranes ont été préparées en parallèle. Deux de ces membranes ont été incubées ou non avec de la protéine VDAC34 native puis les western, effectués sur ces membranes, ont été réalisés à l'aide de sérum pré-immun provenant du lapin ayant servi à la production d'anticorps dirigés contre les protéines VDAC. La dernière membrane a été incubée en absence de protéine VDAC34 et le western a été réalisé à l'aide d'anticorps dirigés contre les protéines VDAC. Pour analyser les résultats, il s'agit de comparer les différentes images obtenues, après révélation des western, pour les quatre expériences de farwestern menées en parallèle.

3 Analyse des résultats et discussion

3.1 Analyse des paramètres fournis par la spectrométrie de masse

Par souci de simplification, les conditions utilisées sont numérotées 1 à 4 (**Figure 56**). Pour les conditions 1 à 3, les spots obtenus correspondent aux protéines VDAC et à des fixations aspécifiques, ainsi ces spots ne sont pas pris en compte (**Figure 57**). Après soustraction de ces associations aspécifiques de l'image obtenue pour la condition 4, treize protéines interagissant avec les protéines VDAC ont été repérées (**Figure 58**). Les protéines correspondant à ces spots ont été carottées d'un gel bidimensionnel mis à migrer en parallèle des autres gels utilisés pour les farwestern. Après extraction, les protéines ont alors été soumises à une analyse par spectrométrie de masse. Afin de vérifier la reproductibilité de la technique, les gels 2D ont été réitérés deux fois de manière indépendante.

L'analyse de ces protéines a permis l'identification de 11 d'entre elles (**Tableau 8**). Ces 11 identifications représentent en fait 8 protéines différentes, car plusieurs spots contiennent la même protéine. Les protéines 1 et 11 n'ont pu être identifiées probablement à cause de la mauvaise qualité du spectre des masses obtenu pour les peptides issus de la fragmentation des protéines.

Le génome mitochondrial de la pomme de terre n'est pas séquencé. Ainsi, les peptides obtenus par digestion des protéines ont été analysés contre la banque d'EST de pomme de terre et la banque de données généraliste NCBI de manière à identifier les protéines

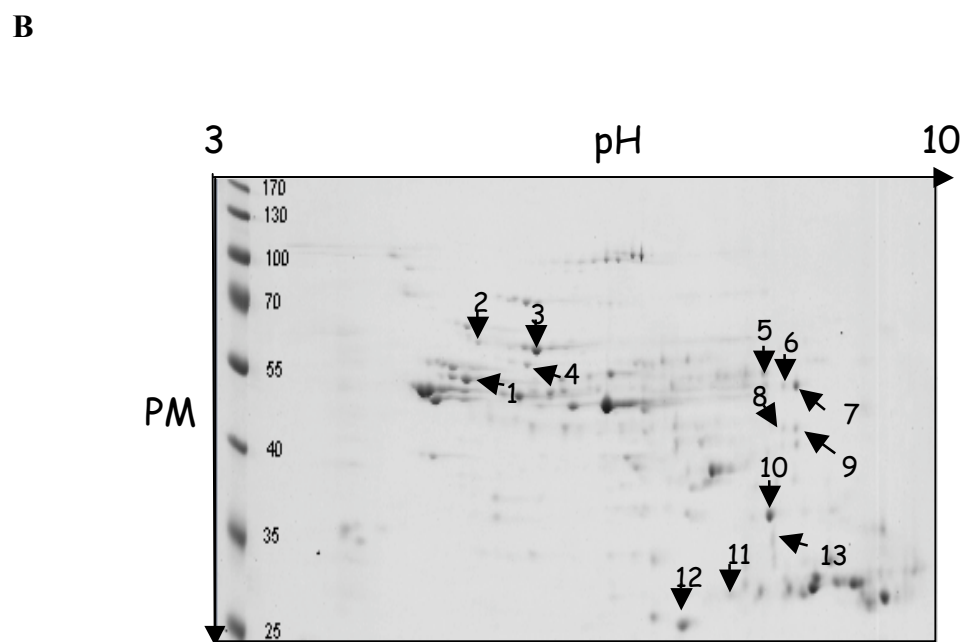
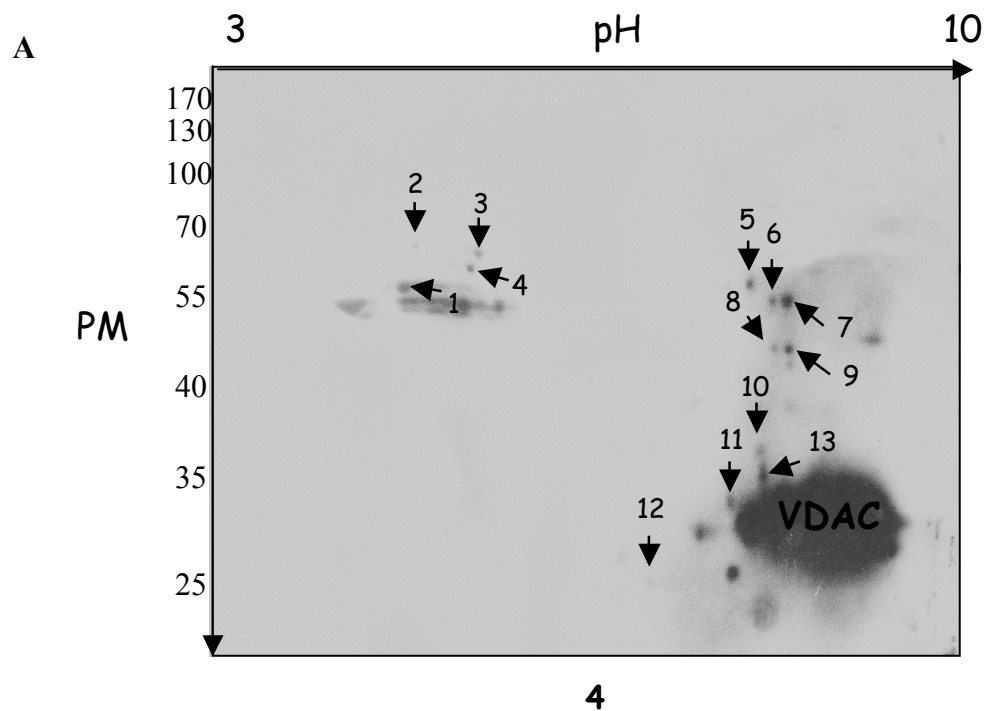


Figure 58

A Autoradiographie de la membrane obtenue pour la condition 4

Les flèches indiquent les protéines qui interagissent avec VDAC34

B Gel 2D utilisé pour le carottage des protéines

Les flèches indiquent les protéines extraites soumises à une analyse par spectrométrie de masse

homologues. Sur les huit protéines de pomme de terre interagissant avec la protéine VDAC34 identifiées par spectrométrie de masse, trois sont répertoriées dans les banques de données. Les cinq autres ont été identifiées par homologie de séquence avec des protéines d'*Arabidopsis thaliana*, de *Lotus corniculatus* et de *Glycine max*. Ces organismes appartiennent tous au règne végétal, ils sont donc proches en terme d'évolution de la pomme de terre. Ainsi, les homologies entre les protéines sont fortes.

L'étude de ces protéines nécessite l'analyse de plusieurs paramètres fournis par la spectrométrie de masse. Le **tableau 8** montre que les résultats sont significatifs puisque l'indice de confiance est supérieur à 95%. Il est à noter que l'identification d'une protéine est obtenue avec un niveau de confiance acceptable lorsque deux paramètres sont réunis. Tout d'abord, il faut au minimum 4 ou 5 peptides issus de la digestion d'une protéine qui s'alignent avec des peptides issus de la digestion *in silico* d'une protéine de la banque de données. De plus, il faut que le pourcentage de recouvrement soit supérieur ou égal à 20%. Pour les protéines identifiées, l'identification est sûre puisque dans tous les cas plus de 16 peptides s'alignent sur la séquence protéique et le pourcentage de recouvrement est supérieur à 26% (**tableau 8**).

Le deuxième paramètre auquel il faut être attentif est le score. Il faut savoir que la valeur à partir de laquelle un score est significatif varie en fonction de la base de données interrogée. Pour la base de données NCBI, le score, pour être significatif avec 95% de confiance, doit être supérieur à 79. Pour les protéines identifiées, le score est dans tous les cas supérieur à 124 sauf pour la protéine homologue à l'alanine glyoxylate aminotransferase d'*Arabidopsis thaliana*. Ainsi le score est significatif pour toutes les protéines sauf cette dernière que nous n'allons pas prendre en compte (**tableau 8**).

Un autre critère pour valider l'identification des protéines est la concordance des masses moléculaires théoriques et expérimentales des peptides. Pour les protéines identifiées, l'identité entre les masses des peptides produits par la digestion des protéines et les masses des peptides théoriques issus de la digestion *in silico* des protéines présentes dans les banques est parfaite (cf **Annexes 7 à 13**). Les alignements des séquences des protéines et des peptides obtenus après digestion trypsique sont présentés dans les **Annexes 5 et 6**.

Nom	Identification N° d'accension	O	Peptide in vitro/ Peptides <i>in silico</i>	C	Score Mascot	% R
1	Signal insuffisant					
2-10	Précurseur de la malate déshydrogénase de 62 kDa P37221	S. t	16/35	>95%	137	26
3	Homologue à sous-unité 1 de la succinate déshydrogénase TC74988	A. t	34/42	>95%	341	44
4	Précurseur de la malate déshydrogénase de 59 kDa P37225	S. t	28/35	>95%	305	46
5	Homologue au précurseur de l'aldéhyde déshydrogénase 1 TC75224	L. c	28/45	>95%	304	46
6-7	Sous-unité de 55 kDa de la NADH déshydrogénase CAA58823	S. t	20/33	>95%	247	43
8-9	Homologue à l'alanine glyoxylate aminotransférase TC77261	A. t	16/31	>95%	74	64
11	Signal insuffisant					
12	Homologue à une sous-unité de l'ATP synthase TC75489	G. m	13/26	>95%	128	30
13	Homologue à TOM40-1 TC75750	A. t	19/40	>95%	124	36

Tableau 8

Identification des protéines par spectrométrie de masse MALDI-TOF

Avec O : organisme, C : indice de confiance, R : recouvrement, A. t : *Arabidopsis thaliana*, S. t : *Solanum tuberosum*, L. t : *Lotus corniculatus*, G. m : *Glycine max*

3.2 Analyse des protéines identifiées par spectrométrie de masse et discussion

3.2.1 Analyse globale

Parmi les protéines identifiées, trois sont des précurseurs de protéines mitochondriales. Il s'agit des précurseurs de deux isoformes de la malate déshydrogénase de 59 et 62 kDa (N° d'accèsion P37225 et P37221 respectivement) et d'une protéine (TC75224) homologue au précurseur de l'aldéhyde déshydrogénase 1 de *Lotus corniculatus* (N° d'accèsion AAO72532). Les autres protéines sont une protéine (TC74988) homologue à la sous-unité 1 de la succinate déshydrogénase d'*Arabidopsis thaliana* (082663), la sous-unité de 55 kDa de la NADH déshydrogénase (CAA58823), une protéine (TC75489) homologue à une sous-unité de l'ATP synthase de *Glycine max* (N° d'accèsion S48643), et une protéine (TC75750) homologue à la porine TOM40-1 d'*Arabidopsis thaliana* (N° d'accèsion Q9LHE5).

Les protéines VDAC peuvent assurer des fonctions extrêmement variées et donc avoir de multiples partenaires. Ainsi, à partir des données disponibles au laboratoire et de la littérature, nous avons privilégié l'analyse de certaines protéines suivant leur implication potentielle dans le transport des ARNt dans les mitochondries. Il s'agit des précurseurs des deux isoformes de la malate déshydrogénase, de la protéine homologue au précurseur de l'aldéhyde déshydrogénase 1 de *Lotus corniculatus*, de la protéine homologue à la protéine TOM40-1 d'*Arabidopsis thaliana* et de la protéine homologue à une sous-unité de l'ATP synthase de *Glycine max*.

3.2.2 Les protéines potentiellement impliquées dans le mécanisme d'importation des ARNt au sein des mitochondries végétales

3.2.2.1 Les précurseurs des protéines mitochondriales

Comme écrit ci-dessus, trois précurseurs de protéines mitochondriales ont été identifiées comme interagissant avec VDAC. Il s'agit des précurseurs de deux isoformes de la malate déshydrogénase (59 et 62 kDa) et d'une protéine homologue au précurseur de l'aldéhyde déshydrogénase 1 de *Lotus corniculatus*. L'interaction des précurseurs protéiques avec VDAC permet d'imaginer que ces protéines puissent intervenir dans le mécanisme d'importation des ARNt. En effet, chez la levure *S. cerevisiae*, le précurseur de la lysyl-ARNt

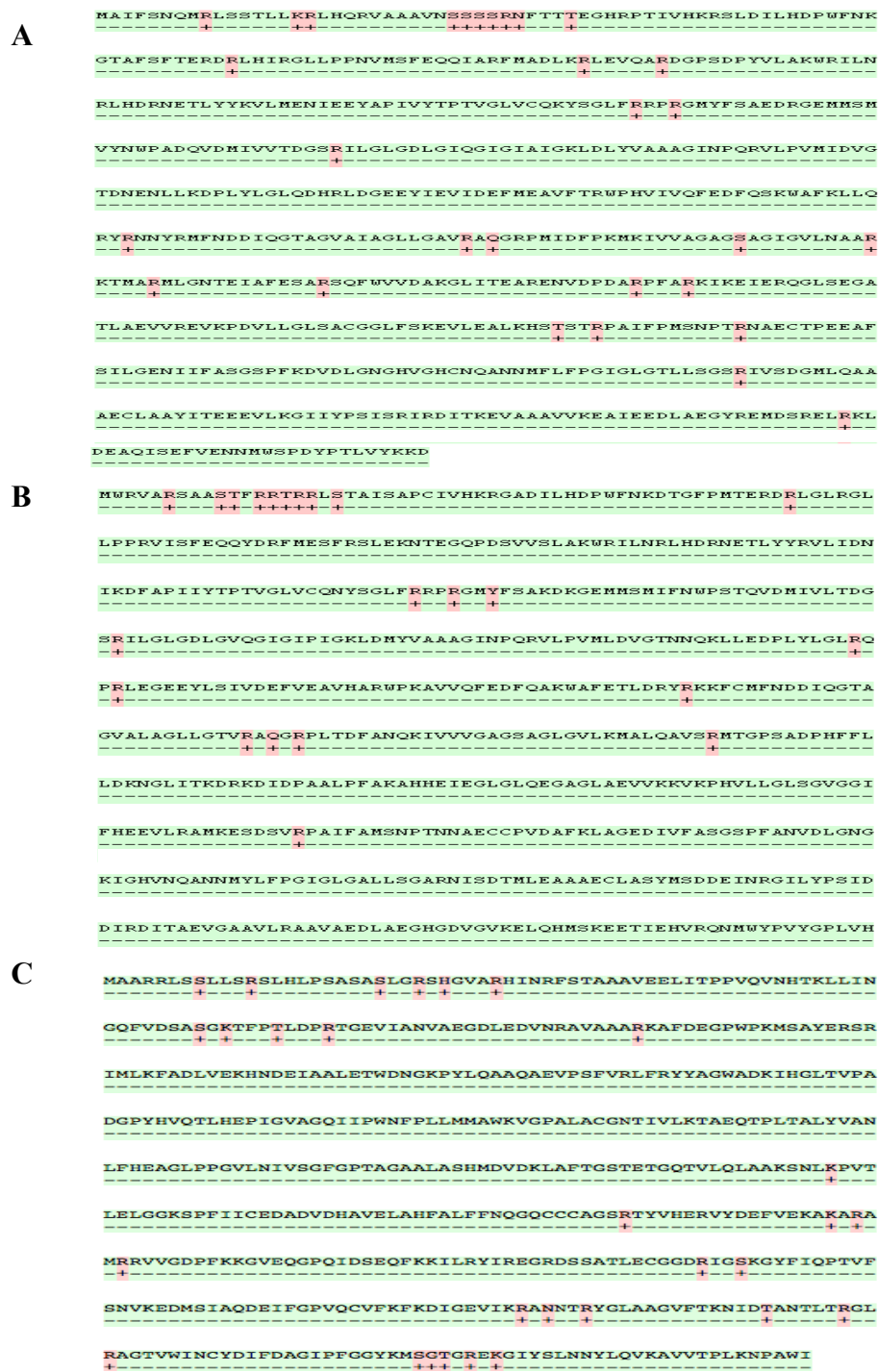


Figure 59

Prédiction à 95% de spécificité des acides aminés capables d'interagir avec les ARN sur les séquences des précurseurs de la malate déshydrogénase de 62 kDa (A), de 59kDa (B) de *Solanum tuberosum*, et de la protéine de *Solanum tuberosum* homologue au précurseur de l'aldéhyde déshydrogénase 1 de *Lotus corniculatus* (C), d'après le programme BindN

Les acides aminés potentiellement capables d'interagir avec des ARN sont sur fond rose

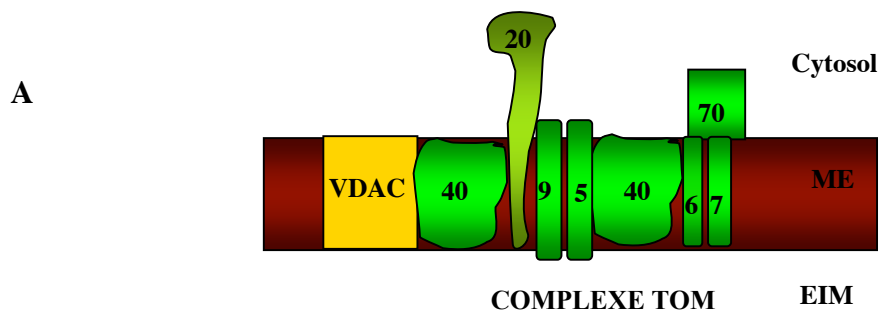
synthétase prend en charge l'ARNt au niveau de la surface mitochondriale et permet sa translocation à travers les membranes mitochondriales (Tarasov et al., 1995b).

Ainsi, les séquences de ces précurseurs protéiques ont été analysées par le logiciel BindN (<http://bioinfo.ggc.org/bindn/>) afin de prédire les acides aminés qui pourraient interagir avec les ARN (**Figure 59**). Les deux précurseurs des deux isoformes de la malate déshydrogénase présentent un motif putatif de liaison à l'ARN au niveau de leur séquence d'adressage mitochondriale à l'extrémité N-terminale ainsi que des acides aminés potentiellement importants répartis le long de la séquence. Ces séquences d'adressage sont généralement riches en résidus chargés positivement et pourraient donc permettre une interaction avec les ARNt. Pour la protéine homologue au précurseur de l'aldéhyde déshydrogénase 1 de *Lotus corniculatus*, aucun motif putatif de liaison à l'ARN n'est mis évidence. Cependant certains acides aminés sont prédits pour interagir avec les ARN. Ces protéines pourraient donc interagir avec les ARNt.

Contrairement à la levure, les systèmes d'importation des ARNt et des protéines sont différents chez les plantes. Ainsi les précurseurs des protéines mitochondriales pourraient amener les ARNt au récepteur de la membrane externe constitué au moins des protéines TOM20 et TOM40 (Salinas et al., 2006). A ce niveau, les précurseurs seraient transloqués à travers les membranes mitochondriales *via* le système d'importation des protéines et les ARNt *via* VDAC (Salinas et al., 2006).

3.2.2.2 La protéine homologue à TOM40-1 d'*Arabidopsis thaliana*

Une autre protéine identifiée comme interagissant avec la protéine VDAC est une protéine homologue à la protéine TOM40-1 d'*Arabidopsis thaliana*. Chez les plantes, les protéines TOM40 semblent impliquées avec les protéines TOM20 dans la fixation des ARNt à la surface des mitochondries de pomme de terre (Salinas et al., 2006). Cependant, des expériences de gel retard et de northwestern réalisées au laboratoire suggèrent que les protéines TOM20 de pomme de terre ne semblent pas lier directement les ARNt (Salinas et al., 2006). Les protéines TOM40 pourraient donc avoir un rôle direct dans la fixation des ARNt à la surface des mitochondries de pomme de terre. La séquence de cette protéine a été soumise au logiciel de prédiction d'interaction des acides aminés avec les ARN BindN



B

```

MATLVPPAATDSPAGSKPTVTEPEKVDYFNLPCPIPYEEIHREALMSLKPELFEGMRFD
-----++--++-----

TRGLNQRFSLSHSVFMGPTELPTQSTDVVKIPTAHYEFGANFIDPKMMLFGRVMTDGRVN
+-----+-----

ARLRCELSENLAMKANGQLTGEPHMSHGVMNFDYKCKDYRTQFQLGNGALFGASYIQSVT
+-----+-----+-----

PHLSLGGEVFWAGQHRKSGIGYAARYNTDKMVATGQVASTGMVALGYVQKVS DKVSLASD
-----++--+-+-----+-----

FMYNMSRDVTASVG YDYILRQCRLRGKIDSN GCAA AFLEERLNMGLNFILSAEIDHKKK
-----++--+-+-----+-----

DYKFGFGLTVGE
-----

```

Figure 60

A Schéma du complexe TOM et des protéines VDAC au sein de la membrane externe mitochondriale des plantes

B Prédiction à 95% de spécificité des acides aminés capables d'interagir avec les ARN sur la séquence de la protéine de *S. tuberosum* homologue à la protéine TOM40-1 d'*Arabidopsis thaliana*, d'après le programme BindN

Les acides aminés potentiellement capables d'interagir avec des ARN sont encadrés en rose

(**Figure 60**). Cette analyse a permis de mettre en évidence plusieurs acides aminés potentiellement capables d'interagir avec les ARNt. Ainsi, on pourrait imaginer qu'après fixation au récepteur, les ARNt pourraient être transférés à la protéine VDAC grâce à leur interaction avec TOM40-1.

Néanmoins, l'expérience de northwestern, réalisée par L. Delage, avec les protéines de la membrane externe mitochondriale de pomme de terre avait révélé que seule VDAC interagissait avec les ARNt (Delage et al., 2003). Bien que ces données semblent a priori contradictoires, plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer cela. Dans l'expérience de northwestern, les protéines sont d'abord dénaturées lors de leur fractionnement puis renaturées après leur transfert sur membrane. Il est possible que les conditions utilisées dans notre protocole ne permettent pas une renaturation correcte de la protéine TOM40-1 et de ce fait, l'interaction avec l'ARNt est impossible. D'autre part, lors de l'analyse par northwestern, la quantité de protéine TOM40-1 présente dans l'extrait de membrane externe est très faible, ainsi aucune interaction avec les ARNt ne sera visible par cette approche.

3.2.2.3 La protéine homologue à une sous-unité de l'ATP synthase de *Glycine max*

L'une des protéines identifiées comme interagissant avec la protéine VDAC est une protéine homologue à une sous-unité de l'ATP synthase de *Glycine max*. Cette sous-unité de *Glycine max* est homologue à la sous-unité δ de l'ATP synthase de bovin (N° d'accion CAA34885) (Smith et al., 1994). L'ATP synthase est constituée de deux parties (**Figure 61**) : F1 et F0. F0 est constitué des sous-unités a et b et permet le passage des protons à travers le complexe. F1 est constitué des sous-unités α , β , γ , δ , ϵ et permet la production d'ATP.

L'interaction de cette protéine avec VDAC suggère que ces protéines soient relativement proches. Or l'ATP synthase est localisée dans la membrane interne et la sous-unité δ est située du côté matriciel. Ainsi, si ces deux protéines interagissent, il semble que la sous-unité δ ait une autre localisation que celle du complexe V. En effet, il a été décrit que cette sous-unité peut-être localisée en dehors du complexe V (Monticello & Brusilow, 1994).

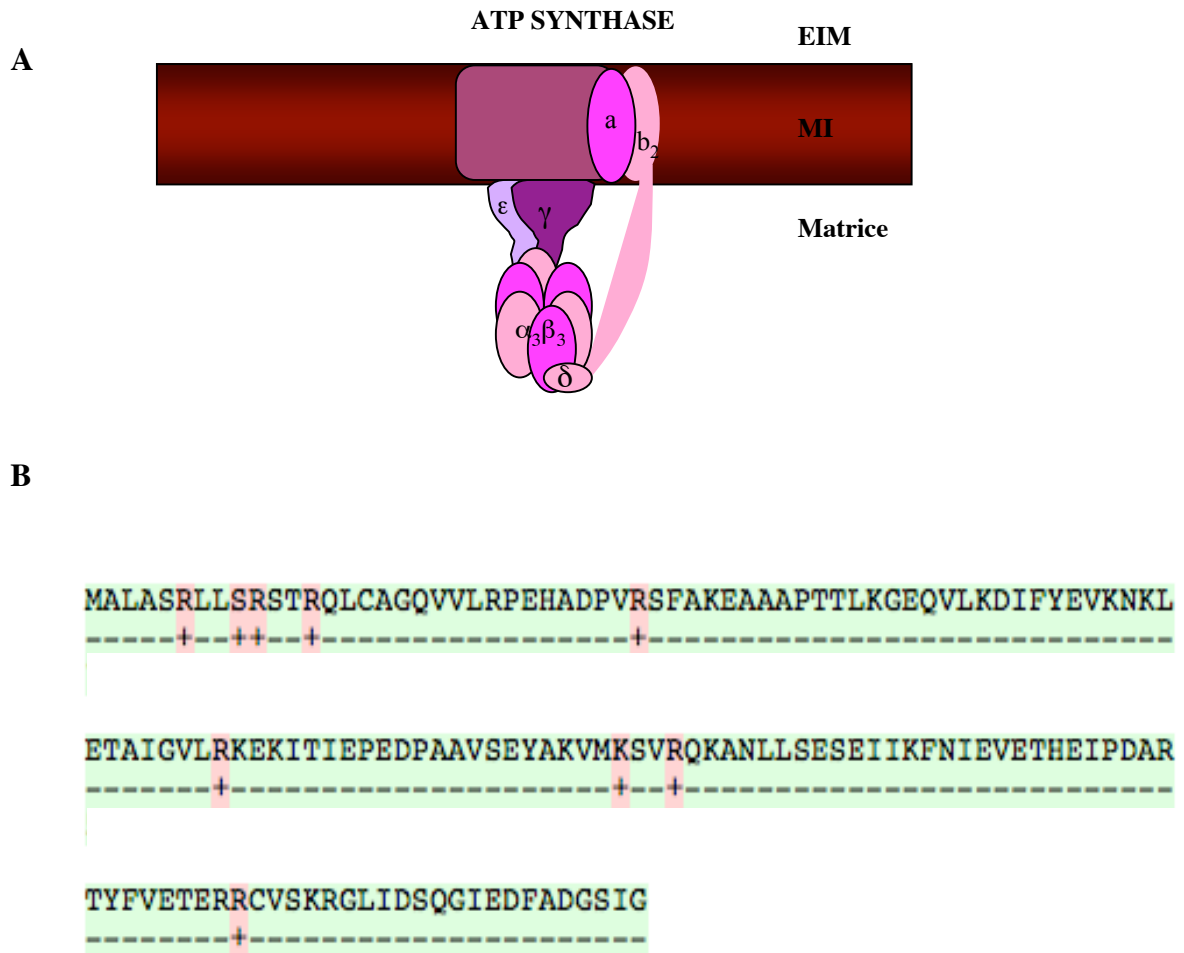


Figure 61

A Schéma de l'ATP synthase dans la membrane interne mitochondriale

B Prédiction à 95% de spécificité des acides aminés capables d'interagir avec les ARN sur la séquence de la protéine de *Solanum tuberosum* homologue une sous-unité de l'ATP synthase de *Glycine max*, d'après le programme BindN

Les acides aminés potentiellement capables d'interagir avec des ARN sont encadrés en rose

La séquence de cette protéine a été soumise au logiciel BindN qui prédit les acides aminés pouvant potentiellement interagir avec les ARN. Cette analyse a mis en évidence plusieurs acides aminés répartis le long de la séquence capables d'interagir avec les ARN (**Figure 61**). Ainsi, la protéine pourrait interagir avec les ARN. Cette sous-unité est impliquée dans le maintien de la liaison entre F0 et F1, dans la régulation de F0 en activant le transport des protons et dans la transmission d'énergie entre F0 et F1. Elle est donc cruciale pour la synthèse d'ATP et pourrait fournir avec d'autres protéines l'énergie nécessaire aux transport d'ARNt. De manière intéressante, il avait été démontré au laboratoire que la sous-unité γ de l'ATP synthase pouvait interagir avec les ARNt. Cette sous-unité est impliquée dans le transport des protons. Ainsi, on pourrait imaginer que ces deux sous-unités forment avec d'autres protéines un complexe permettant de fournir l'énergie nécessaire au transport des ARNt.

En effet, des expériences d'importation *in vitro* réalisées au laboratoire avaient montré que la fixation des ARNt au niveau de la surface mitochondriale était ATP dépendante. Le rôle de cet ATP reste à cette heure inconnu, mais nous pouvons supposer que la fixation et le passage à travers les membranes mitochondriales des ARNt nécessitent une dénaturation au moins partielle de sa structure en «L» qui nécessiterait l'hydrolyse de l'ATP. Ceci pourrait donc se faire par l'action d'un complexe renfermant cette sous-unité de l'ATP synthase.

Ces résultats sont confortés par ceux obtenus chez *Leishmania*. En effet, des protéines homologues aux sous-unités du complexe III et du complexe V de la chaîne respiratoire sont impliquées dans l'importation des ARNt au sein des mitochondries. En particulier, RIC1 a été identifié comme l'homologue de la sous-unité α de l'ATP synthase (Goswami & Adhya, 2006). Cette protéine, nommée par la suite RIC1/F1 α , est capable d'être active au niveau du complexe RIC mais également au niveau du complexe V. Elle permet la production d'ATP nécessaire au transport des ARNt dans la matrice mitochondriale.

Ainsi, l'implication des deux sous-unités de l'ATP synthase dans le transport des ARNt est tout à fait plausible.

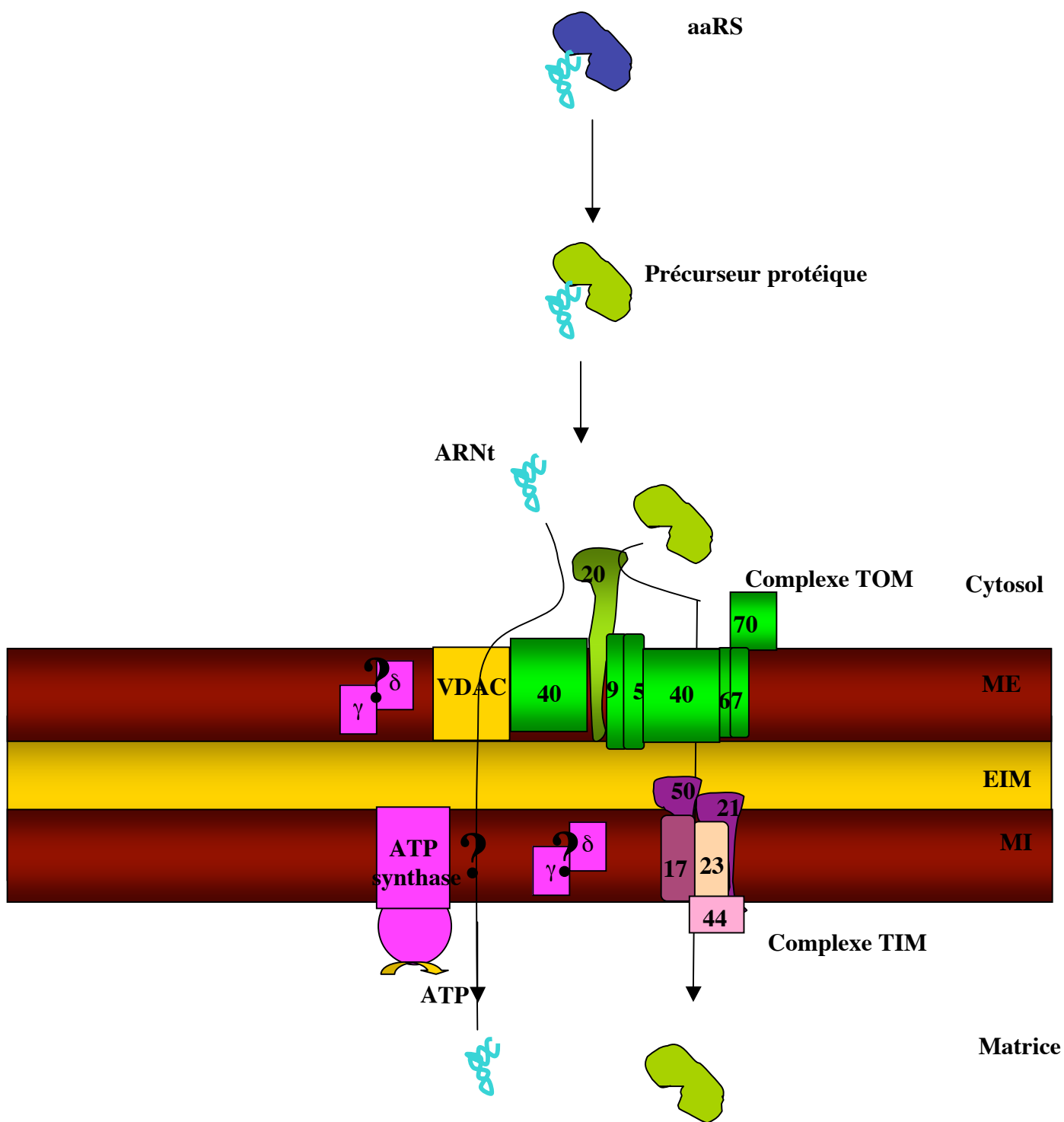


Figure 62

Modèle d'importation des ARNt dans les mitochondries de plantes

aaRS: aminoacyl-ARNt synthétase

4 Modèle proposé

Au vu des résultats présentés ci-dessus, un modèle peut être proposé pour le mécanisme d'importation des ARNt à travers les membranes mitochondriales végétales (**Figure 62**).

Les ARNt cytosoliques sont synthétisés dans le noyau, exportés dans le cytosol puis adressés vers la mitochondrie. La théorie du « channeling » stipule que les ARNt ne sont jamais libres dans la cellule mais toujours associés à une protéine (Negrutskii & Deutscher, 1991; Negrutskii & El'skaia, 2001). Cette étape pourrait être responsable de la spécificité de l'importation des ARNt. Les aminoacyl-ARNt-synthétases sont des candidates principales pour exercer la sélectivité car d'une part ce sont les seules protéines capables de différencier entre différents ARNt et d'autre part il a été montré *in vivo* qu'il existe une corrélation entre aminoacylation et importation. Néanmoins on ne peut exclure que d'autres protéines interviennent dans ce mécanisme. En effet, bien que les trois ARNt^{Gly} cytosoliques sont reconnus par la même glycyl-ARNt synthétase, ils sont différenciellement importés dans les mitochondries de pomme de terre (Brubacher-Kauffmann et al., 1999). Ainsi, on pourrait imaginer que les précurseurs des protéines mitochondriales amènent les ARNt au récepteur de la membrane externe constitué au moins des protéines TOM20 et TOM40. À ce niveau, les précurseurs protéiques seraient transloqués à travers les deux membranes mitochondriales *via* le système d'importation des protéines constitué des complexes TOM et TIM et les ARNt seraient transférés grâce à TOM40-1 à la protéine VDAC qui leur permettra de traverser la membrane externe. Le passage à travers la membrane interne est à l'heure actuelle encore inconnu. Les sous-unités δ et γ de l'ATP synthase pourraient fournir avec d'autres protéines l'énergie nécessaire à la translocation des ARNt à travers les deux membranes mitochondriales.

5 Conclusion

La recherche de partenaires de la protéine VDAC dans le mécanisme d'importation des ARNt a mis en évidence plusieurs candidats. Les protéines VDAC étant impliquées dans de nombreux processus cellulaires, nous avons retenu notre attention sur 5 protéines pouvant potentiellement intervenir dans le mécanisme d'importation des ARNt au sein des mitochondries de pomme de terre : les précurseurs des protéines mitochondriales, la protéine homologue à la protéine TOM40-1 d'*Arabidopsis thaliana* et la protéine homologue à une sous-unité de l'ATP synthase de *Glycine max*. Ces protéines possèdent des acides aminés pouvant potentiellement interagir avec les ARN. Ainsi, ces protéines pourraient être impliqués dans le transport des ARNt.

Des expériences de split ubiquitine ont été entreprises pour confirmer l'interaction entre les protéines VDAC et TOM40-1. De plus, des études d'interaction entre les protéines TOM40-1 surexprimées et les ARNt seront à réaliser par northwestern et gel retard afin de vérifier si ces protéines sont capables ou non d'interagir avec les ARNt. L'interaction des autres protéines avec VDAC devra être validée par des approches de type split ubiquitine dans un premier temps. Si l'interaction est confirmée, une analyse par northwestern et gel retard de l'interaction des protéines surexprimées et purifiées avec les ARNt pourra être entreprise. Enfin, le rôle de ces protéines dans le mécanisme d'importation *in vivo* des ARNt pourraient être validée par l'inhibition de l'expression de ces protéines ou de leur activité.

Bien que cette technique nous a permis d'identifier les partenaires de VDAC, elle présente cependant certaines limitations (Ong & Pandey, 2001; Lopez, 2007):

- la résolution des gels qui souvent ne permet pas de détecter et/ou d'identifier toutes les protéines présentes dans un échantillon (Gygi & Aebersold, 2000).
- la limite de détection des protéines est de 1ng : ainsi les protéines minoritaires ne seront pas visibles sur un gel 2D.
- la visualisation des protéines de points isoélectriques (pI) et de poids moléculaires (PM) extrêmes : les gels que nous avons utilisés permettent de séparer les protéines entre des pI de 3-11 et des PM 20-170 kDa. De ce fait, il est difficile de détecter les protéines n'ayant pas ces caractéristiques.

Ainsi, d'autres partenaires de VDAC pourraient exister et ne pas être mis en évidence par cette technique. Pour les identifier, l'approche de type split ubiquitin peut être envisagée en utilisant la protéine VDAC comme appât dirigée contre une banque de protéine.

Chapitre IV

Etude de la sélectivité dans le transport des ARNt dans les mitochondries végétales

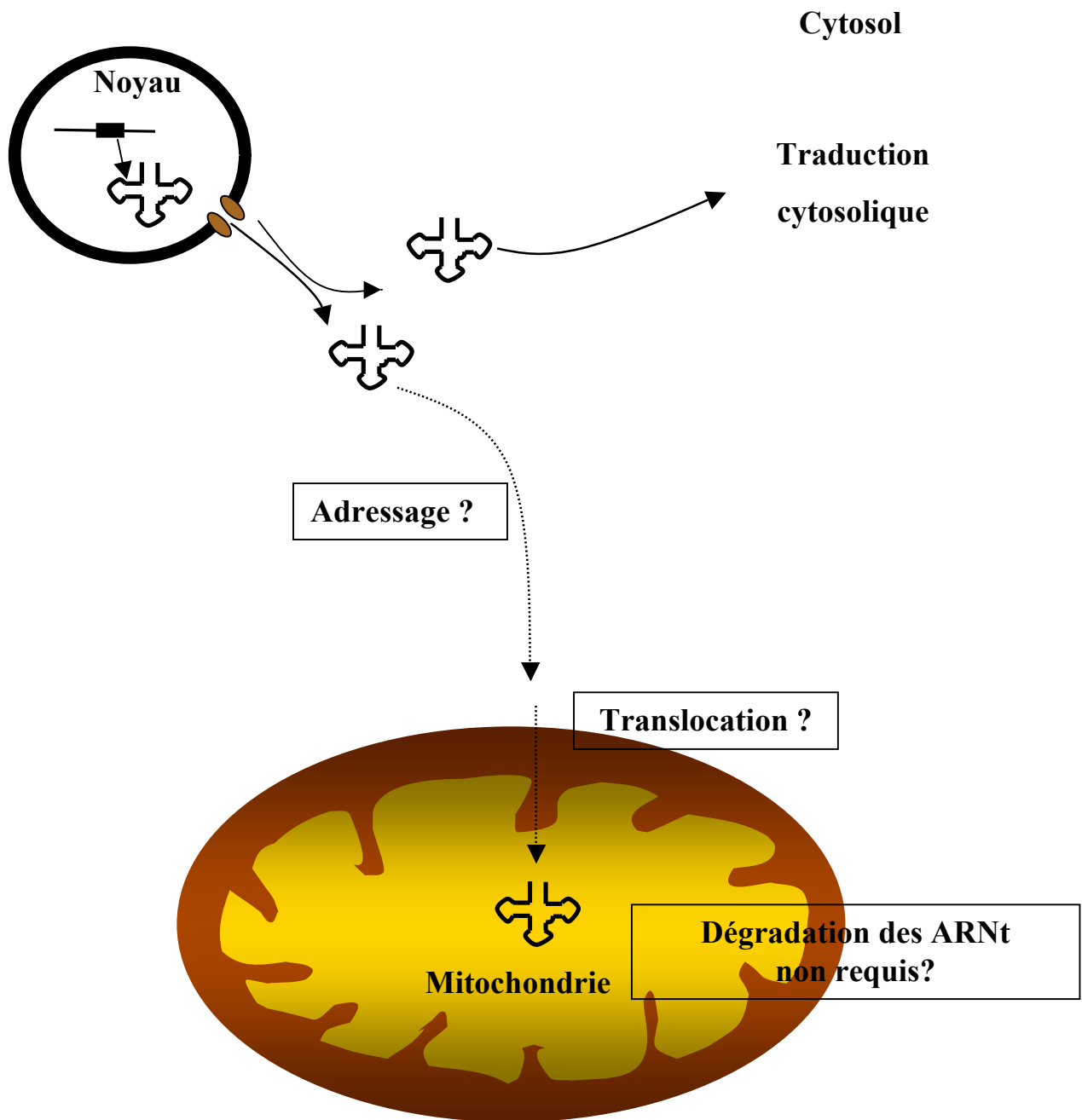


Figure 63 :
Problématique de la spécificité d'importation des ARNt au sein des mitochondries

1 Préambule

Les mécanismes d'importation des ARNt dans les mitochondries sont hautement spécifiques. Ceci suppose qu'il existe un mécanisme permettant de discriminer l'ARNt importé de celui qui ne l'est pas. De plus, pour les ARNt qui sont retrouvés au sein de l'organelle, leur niveau de présence peut être variable. Il semble donc qu'il existe des mécanismes de régulation permettant d'ajuster le taux d'ARNt importés au sein des mitochondries. Chez la levure *S. cerevisiae*, seul 2-3% de l'ARNt^{Lys(CUU)} cytosolique est importé au sein des mitochondries (Entelis et al., 1996). Cet ARNt devient pourtant essentiel pour la synthèse protéique en décodant le codon rare AAG lors de stress thermique. En effet, à 37°C la première base de l'anticodon de l'ARNt^{Lys(UUU)}, codé par le génome mitochondrial, n'est pas modifiée. Ainsi, cet ARNt ne peut plus décoder le codon AAG. Trois composants du système d'ubiquitination vont alors interagir avec l'ARNt^{Lys(CUU)} cytosolique pour moduler son transport au sein des mitochondries et permettre le décodage du codon AAG. Ce lien fonctionnel entre l'importation de l'ARNt^{Lys(CUU)} et l'ubiquitination montre pour la première fois que l'importation des ARNt au sein des mitochondries est soumise à un mécanisme de régulation (Brandina et al., 2007).

Actuellement, hormis quelques expériences de transgène avec des gènes d'ARNt mutés mettant en évidence des déterminants ou des anti-déterminants (cf paragraphe II.3 de l'Introduction) aucune autre donnée n'existe pour expliquer comment se fait la spécificité d'importation.

La sélectivité de l'importation des ARNt dans les mitochondries peut se faire à plusieurs niveaux (qui ne sont pas exclusifs) (**Figure 63**) : lors de l'adressage à la surface des mitochondries, lors de la translocation à travers chacune des deux membranes, ou par le biais d'une dégradation préférentielle à l'intérieur de la mitochondrie.

En effet, une première possibilité pour la sélection des ARNt importés est qu'elle se fasse au moment de leur acheminement jusqu'à la surface mitochondriale. La théorie du « channeling » stipule que les ARNt ne sont pas libres dans le cytosol mais qu'ils seraient toujours associés à d'autres molécules (Negrutskii & Deutscher, 1991; Negrutskii & El'skaia, 2001). Parmi les différentes protéines interagissant avec les ARNt au cours de la traduction

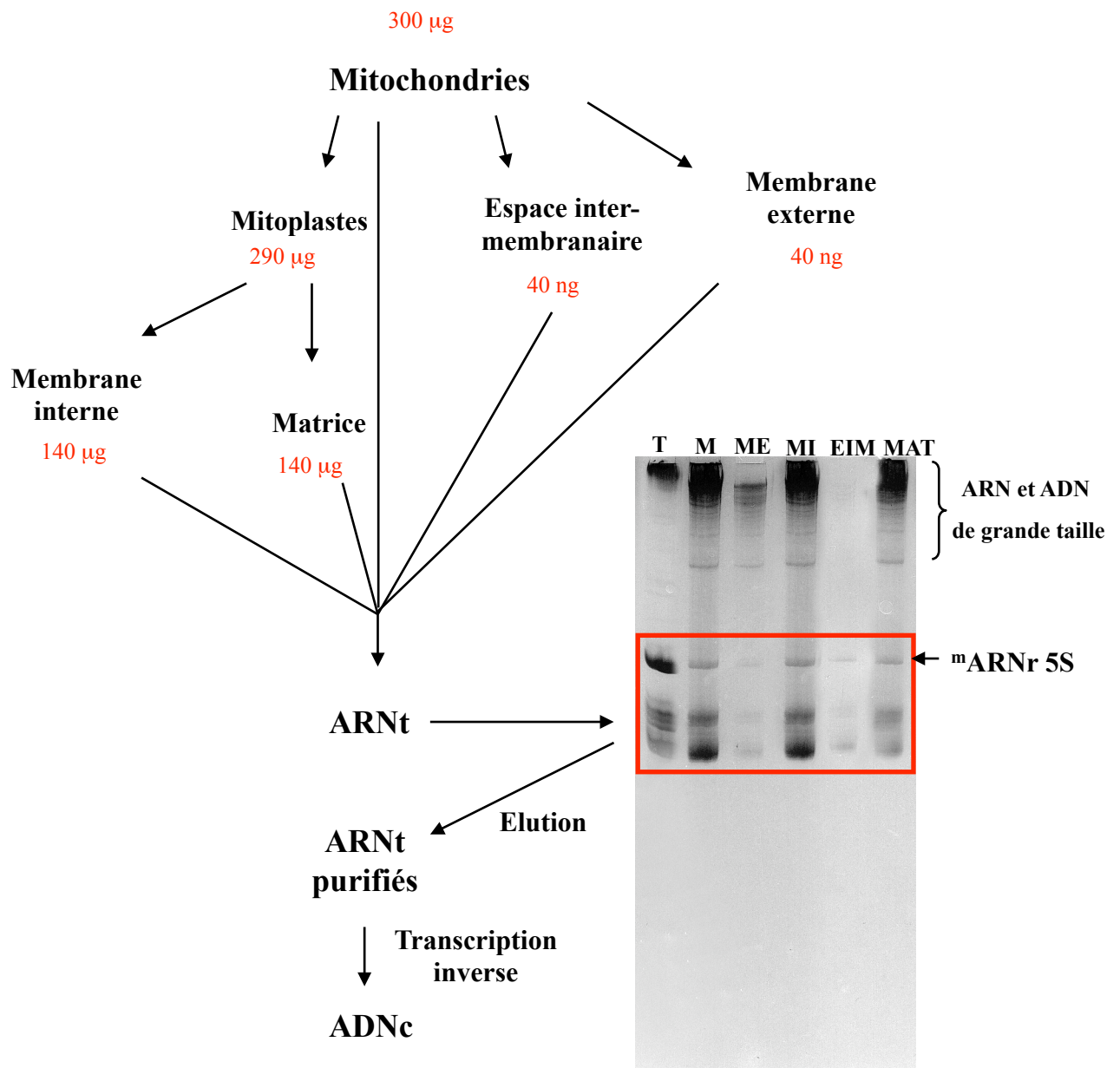


Figure 64

Schéma de l'approche développée pour quantifier les ARNt présents dans les sous-compartiments mitochondriaux.

Les quantités d'ARNt extraits de chaque sous-compartiment est noté en rouge.

Avec T : total, M : mitochondrie, ME : membrane externe, MI : membrane interne, EIM : espace inter-membranaire, MAT : matrice

cytosolique, les aminoacyl-ARNt synthétases sont les seules à reconnaître spécifiquement les différents ARNt isoaccepteurs. Ce sont donc de bons candidats pour acheminer les ARNt depuis le noyau jusqu'à la mitochondrie et exercer une sélectivité au niveau de l'importation. D'autant plus, qu'une reconnaissance par l' aminoacyl-ARNt synthétase appropriée semble nécessaire pour l'importation *in vivo* chez les végétaux (Delage et al., 2003). Néanmoins, on ne peut pas exclure la participation d'autres protéines comme cela a été démontré pour l'énolase chez *S. cerevisiae* (Entelis et al., 2006) ou le facteur d'élongation EF-1 α chez les *T. brucei* (Bouzaidi-Tiali et al., 2007).

Les membranes mitochondriales pourraient être un moyen d'exercer la sélectivité lors du mécanisme d'importation des ARNt. A ce niveau la protéine VDAC est impliquée dans le transport des ARNt et de l'ADN (Koulintchenko et al., 2003; Salinas et al., 2006; Weber-Lotfi et al., 2009). Néanmoins, cette protéine peut interagir avec des ARNt qu'ils soient importés ou non (Delage et al., 2003) et avec n'importe quel type d'acide nucléique (cf paragraphe I.5 des Résultats et Discussion). Ainsi, cette protéine n'est pas directement impliquée dans la sélectivité de l'importation des ARNt dans les mitochondries végétales. Il est donc possible que d'autres protéines interviennent à ce niveau pour sélectionner les ARNt importés.

La dernière possibilité pour expliquer la sélectivité du mécanisme d'importation des ARNt au sein des mitochondries serait que l'ensemble des ARNt cytosoliques puissent entrer dans la mitochondrie. En effet, comme les ARNt ayant la même séquence sont importés dans les mitochondries de certaines plantes et pas dans d'autres, il est possible qu'il existe une régulation à l'intérieur de l'organelle de telle sorte à, d'une part, utiliser les ARNt cytosoliques nécessaires à la machinerie traductionnelle mitochondriale et, d'autre part, à dégrader les ARNt cytosoliques non utilisés.

A partir de ces hypothèses, nous avons recherché à quel niveau se faisait la sélectivité lors du transport des ARNt au sein des mitochondries végétales. Afin de répondre à cette question, une nouvelle approche a été développée (**figure 64**). En effet, les mitochondries de tubercules de pomme de terre ont été fractionnées de telle manière à préparer des extraits de membranes externe et interne, de matrice et d'espace inter-membranaire. Ensuite, les ARNt présents dans ces sous-compartiments ont été extraits et purifiés pour être quantifiés. Pour se

Présent	Absent
ARNt^{Ala}	ARNt^{Gly (GCC)}
ARNt^{Gly(CCC)}	ARNt^{Met-e}
ARNt^{Gly(UCC)}	ARNt^{Phe}
ARNt^{Val(CAC)}	ARNt^{Pro}
ARNt^{Thr}	cARNt^{Tyr}
mARNt^{Tyr}	cARNr 5S
mARNr 5S	

Figure 65

Choix des ARNt et ARNr étudiés par PCR quantitative

faire les ARNt ont été rétro-transcrits et les ADNc produits ont été utilisés pour des expériences de PCR quantitative.

2 Mise au point des conditions pour la quantification des ARNt par PCR quantitative

2.1 Préparation des extraits mitochondriaux

Les extraits mitochondriaux sont préparés à partir des mitochondries de pomme de terre. Ces protocoles sont classiquement utilisés au laboratoire et permettent d'avoir des extraits hautement purifiés. Le principal problème auquel nous nous sommes confrontés est la préparation de membrane externe. En effet, notre travail a été limité par les 40 ng d'ARNt extrait à partir des 20 µg équivalent protéine de membranes externes obtenues. Il faut savoir que ces 20 µg équivalent protéine de membranes externe ont été extraits à partir de 100 mg équivalent protéine de mitochondries de pomme de terre (**Figure 64**).

Il est à noter que l'extrait de membrane interne renferme une petite proportion de membrane externe localisée au niveau des points d'ancrage entre les deux membranes. Ainsi, nous allons comparer les quantifications obtenues pour ces deux extraits afin de vérifier qu'il n'y ait pas de biais pour l'analyse de l'extrait de membrane interne.

Afin d'éliminer tout contaminant de chaque extrait nous avons fractionné les ARNt sur gel (**figure 64**), puis nous les avons élués. La qualité des ARNt est vérifiée à chaque étape sur gel et par mesure spectrophotométrique.

2.2 Choix des ARNt analysés

Pour cette étude nous avons décidé d'analyser onze ARNt. Le choix de ces ARNt a été réalisé suivant leur présence ou leur absence dans les mitochondries de pomme de terre d'après l'analyse des northern blot réalisés au laboratoire. Ainsi, comme le montre la **Figure 65**, nous avons choisi 5 ARNt cytosoliques présents dans les mitochondries de pomme de

Matrice	Amorce sens	Amorce anti-sens
ARN ^t ^{Ala}	GGGGATGTAGCTCATATGG	CCTGGTGGAGATGCAGGG
ARN ^t ^{Gly(CCC)}	GCGCATCTGGTGTAGTGGTATC	GCGCATCCAGGGTCGAACCCT
ARN ^t ^{Gly(GCC)}	GCACCAGTGGTCTAGTGGTAG	GCACCAGCCGGAATCGAACCCG
ARN ^t ^{Gly(UCC)}	GCGTCTGTAGTCCAACGGTTA	TGCGTCTGCCGGAGTCGAA
ARN ^t ^{Met-e}	GGGGTGGTGGCGCAGTTGGCTA	GGGGTGGTGGCGCAGTTGGCTA
ARN ^t ^{Phe}	GCGGGGATAGCTCAGTTGGGA	TGCGGTCAGCGTGGATCGAAC
ARN ^t ^{Pro}	CGAGGTGTAGCGCAGTCTGG	CAAGGTGACAGGATTCGAACCT
ARN ^t ^{Thr}	GCTTTCATAGCTCAGTTGGTTA	TGCTTTCATTGAGAGTTGAACT
^c ARN ^t ^{Tyr}	GGCTGGATGGCCTAAGCTTGG	GGCTGGAATCGAGTCAACCATC
^m ARN ^t ^{Tyr}	CCCTCTCCGTCCTAAGCTTGG	CCCTCTCACGGCTCACCAG
ARN ^t ^{Val(CAC)}	GTCTGGGTGGTGTAGTCGGTT	TGTCTGAGCCCGGGTTTCGAAC
^c ARN ^r 5S	GACTCTCGGCAACGGATATC	GCAATTCACACCAAGTATCGC
^m ARN ^r 5S	ACCGGGCACTACGGTGAGAC	CATATGGCGCAAGACGATTC

Tableau 9

Couples d'amorces spécifiques des ARNt testés par PCR quantitative

terre (ARNt^{Ala}, ARNt^{Gly(UCC)}, ARNt^{Gly(CCC)}, ARNt^{Val(CAC)} et ARNt^{Thr}), 5 ARNt cytosoliques qui ne sont pas retrouvés dans les mitochondries de pomme de terre (ARNt^{Gly(GCC)}, ARNt^{Mete}, ARNt^{Phe}, ARNt^{Pro} et _cARNt^{Tyr}), un ARNt codé par le génome mitochondrial et exprimé dans les mitochondries (_mARNt^{Tyr}) et les ARN ribosomiques 5S cytosolique et mitochondrial (_cARNr 5S et _mARNr 5S).

2.3 Choix des amorces

Dans la mise au point de la réaction PCR quantitative, le choix des amorces est crucial. Elles vont avoir un double rôle : en s'hybridant à l'ADN matrice, elles délimitent la région d'ADN à amplifier et avec leur extrémité 3' OH libre servir d'amorce pour l'ADN polymérase. Pour faciliter le choix des séquences des deux amorces, des logiciels d'analyse de séquences permettent de vérifier les points suivants :

- des températures de fusion comparables. Les oligonucléotides amorces doivent s'hybrider à l'ADN matrice dans les mêmes conditions de température
- les séquences des deux amorces du même couple doivent présenter le maximum de divergences et plus particulièrement à l'extrémité 3', afin d'éviter leur hybridation
- les séquences ne doivent pas contenir de séquences répétées inversées afin d'éviter les repliements intramoléculaires.

Dans un premier temps, nous avons utilisé le site « Universal Probe Library » de Roche Applied Science (<https://www.roche-applied-science.com/sis/rtqcr/upl/ezhome.html>) conçu pour la conception d'amorces pour la PCR quantitative. Ce site permet de déterminer les séquences des amorces à utiliser pour l'amplification d'une séquence donnée en minimisant les effets de structure et les amplifications aspécifiques. Cependant ce logiciel n'est pas adapté aux petites séquences nucléotidiques comme les ARNt et produisait des amorces qui s'hybridaient entre elles. Ainsi, nous avons dessiné les amorces à partir des séquences des ARNt.

Une fois les amorces dessinées (**Tableau 9**), les expériences préliminaires consistaient à tester pour chaque ARNt le couple d'amorce dessiné. Chaque couple devait ne pas produire de dimères d'amorces c'est-à-dire que les deux amorces ne devaient pas s'hybrider entre elles. De plus, il devait produire une courbe de fusion correcte traduisant une hybridation spécifique

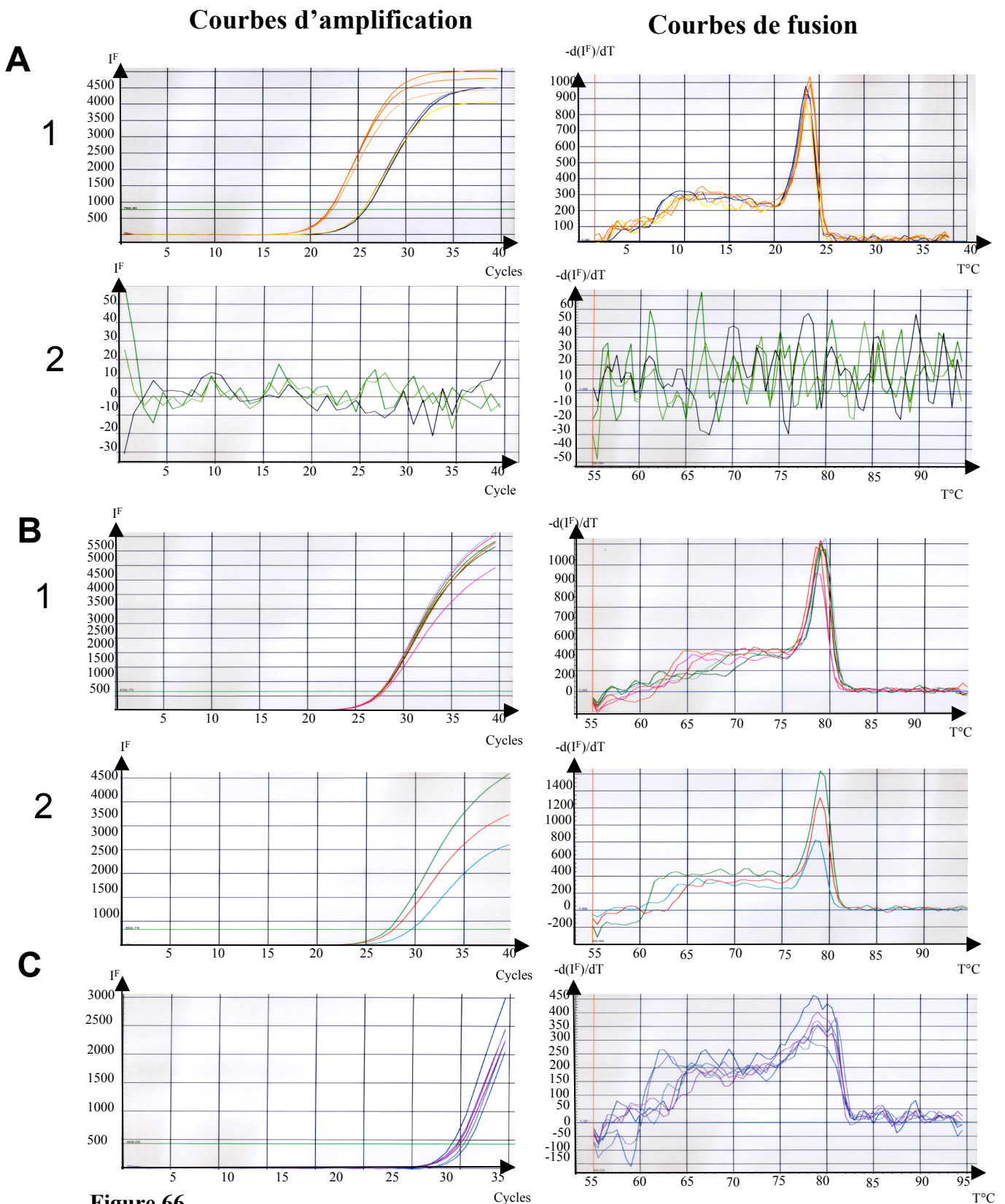


Figure 66

Test des amorces par qPCR sur l'extrait d'ARNt total

A : ARNt^{Gly(CCC)} , 1= test avec extrait et amorces, 2=test sans extrait

B : ARNt^{Ala} , 1= test avec extrait et amorces, 2=test sans extrait

C ARNt^{Met-e} , test avec extrait et amorces

des amorces à l'ADNc. Enfin, il devait permettre une amplification correcte de l'ADNc au cours de la PCR. Cette amplification devait être reproductible entre les trois triplicats techniques réalisés sur chaque plaque de qPCR.

Comme le montre la **Figure 66A₁**, les amorces testées pour l'ARNt^{Gly(CCC)} permettent une amplification correcte. De plus, la courbe de fusion montre que les amorces sont spécifiques. Ces amorces ont été soumises sans matrice à une amplification par PCR quantitative (**Figure 66A₂**). Nous pouvons voir l'absence d'amplification et de courbe de fusion. En effet, les signaux obtenus correspondent aux bruits de fond. Le même résultat a été obtenu pour les amorces des ARNt^{Gly(GCC)}, ARNt^{Gly(UCC)}, ARNt^{Val(CAC)}, et les ARNr 5S cytosolique et mitochondrial.

Les amorces dessinées pour l'ARNt^{Ala} produisent une courbe de fusion correcte montrant qu'elles sont spécifiques. De plus, elles permettent une amplification correcte de l'ADNc. Cependant, en absence de matrice, nous pouvons voir une amplification et une courbe de fusion (**Figure 66B₂**). Ceci montre que les amorces s'hybrident produisant des dimères d'amorces. Il en est de même pour les ARNt^{Thr}, ARNt^{Pro}, ^mARNt^{Tyr} et ^cARNt^{Tyr}.

Enfin, pour l'ARNt^{Met-e}, les amorces ne sont pas spécifiques. En effet comme le montre la **figure 66C** nous n'obtenons pas une courbe de fusion correcte. Il en est de même pour l'ARNt^{Phe}.

Les ARNt sont constitués d'uniquement 75 nucléotides, aussi les possibilités pour dessiner des amorces sont relativement limitées. Ainsi, les expériences de mise au point pour la PCR quantitative nous ont conduits à étudier quatre ARNt. Nous avons étudié les ARNt^{Val(CAC)} et ARNt^{Gly(UCC)} importés et présents dans les mitochondries, l'ARNt^{Gly(CCC)} qui est importé dans les mitochondries mais beaucoup moins que les deux premiers et l'ARNt^{Gly(GCC)} qui n'est pas importé dans les mitochondries (Brubacher-Kauffmann et al., 1999). D'ailleurs cette étude permettra de mieux comprendre comment les trois ARNt^{Gly} cytosoliques, qui sont reconnus par la même aminoacyl-ARNt-synthétase, ne sont pas retrouvés de façon équivalente dans les mitochondries. Enfin, nous avons étudié les ARNr 5S cytosolique et mitochondrial qui nous serviront à estimer la contamination de nos extraits.

ARNt	Amorce sens	Amorce anti-sens	Efficacité
ARNt ^{Gly(CCC)}	GCGCATCTGGTGTAGTGGTATC	GCGCATCCAGGGTCTGAACCCT	1,78
ARNt ^{Gly(GCC)}	GCACCAGTGGTCTAGTGGTAG	GCACCAGCCGGAATCGAACCCG	2,17
ARNt ^{Gly(UCC)}	GCGTCTGTAGTCCAACGGTTA	TGCGTCTGCCGGAGTCGAA	1,86
ARNt ^{Val(CAC)}	GTCTGGGTGGTGTAGTCGGTT	TGTCTGAGCCCGGGTTCGAAC	2,01
_c ARNr 5S	GACTCTCGGCAACGGATATC	GCAATTCACACCAAGTATCGC	1,98
_m ARNr 5S	ACCGGGCACTACGGTGAGAC	CATATGGCGCAAGACGATTC	2,02

Tableau 10

Efficacité des couples d'amorces utilisés pour la PCR quantitative

ARNt	Ct(tot)
ARNt ^{Gly(CCC)}	23,59
ARNt ^{Gly(GCC)}	23,84
ARNt ^{Gly(UCC)}	15,06
ARNt ^{Val(CAC)}	19,45
_c ARNr 5S	20,54
_m ARNr 5S	20,66

Tableau 11

Ct obtenu pour l'extrait total pour les ARNt et les ARNr étudiés par PCR quantitative

2.4 Efficacité de la PCR

Il est important de connaître l'efficacité E de la PCR. En effet, ce paramètre entre directement dans le calcul des quantités d'ADN présent dans les échantillons. Pour calculer l'efficacité des amorces choisies, on effectue une PCR en temps réel sur des échantillons de dilution croissante pour obtenir une courbe étalon correspondant au couple d'amorce utilisé. Les C_t obtenus pour chaque dilution sont placés sur un graphique et l'équation de la régression linéaire passant par ces points donne l'efficacité. Les efficacités mesurées par cette méthode varient entre 1,78 et 2,17 selon le couple d'amorce utilisé (**Tableau 10**). Aucune variation significative n'a été observée d'une expérience à l'autre.

2.5 Correction des données en fonction du niveau d'expression des gènes

Les analyses par PCR quantitative nécessitent de définir une référence permettant la normalisation des résultats obtenus afin de s'affranchir des variations pouvant être observées entre les différentes préparations d'ARNt. Des extraits d'ARNt totaux ont été préparés à partir de tubercules de pomme de terre. Ils vont servir de référence pour les expériences. Afin de limiter au maximum les corrections des données obtenues pour les différents ARNt testés, les quantités initiales d'ARNt utilisées ont été ajustées de telle sorte que pour chaque expérience, 10 ng d'ARN soit présente dans les différents échantillons.

Afin de mettre en évidence les pools d'ARNt présents dans chaque compartiment mitochondrial, il est nécessaire de rapporter la quantité de cet ARN présent dans les fractions mitochondriales à son niveau d'expression dans la fraction totale. En effet, plus un ARN est exprimé dans la cellule et plus il sera retrouvé en quantité importante dans les fractions mitochondriales. Nous avons donc déterminé, pour chaque ARNt analysé, le rapport entre la quantité initiale d'ARN présente dans les différents compartiments mitochondriaux ($N_0(x)$) et la quantité initiale d'ARNt présente dans la fraction totale ($N_0(\text{tot})$) par l'intermédiaire de la formule suivante :

$$\frac{N_0(x)}{N_0(\text{tot})} = E^{(C_t(\text{tot})-C_t(x))}$$

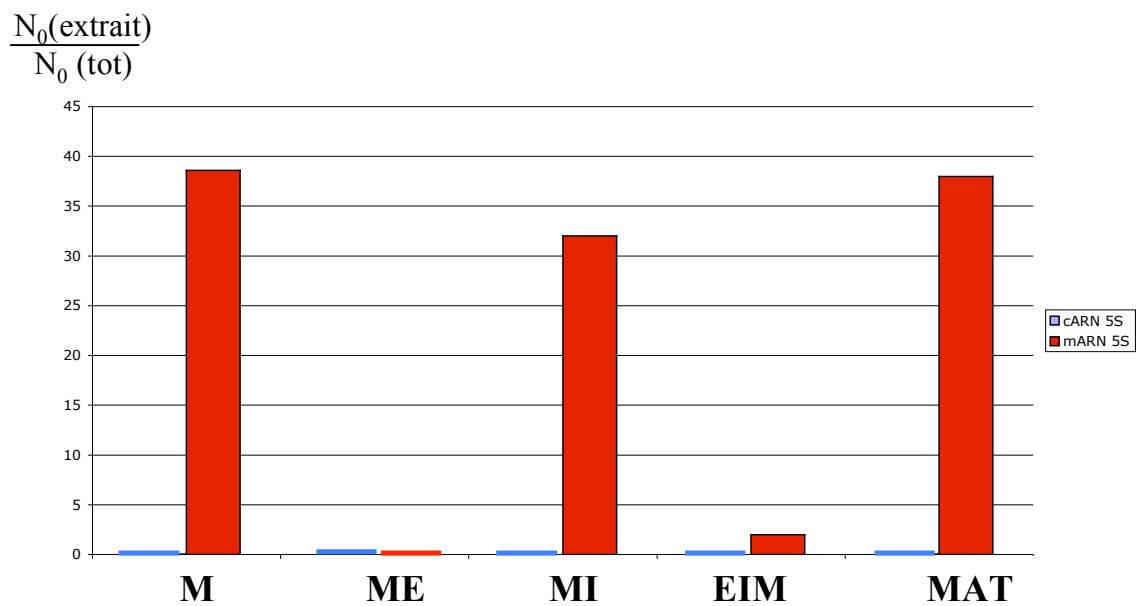


Figure 67

Quantification des ARNr 5S cytosoliques et mitochondriaux au sein des différents sous-compartiments mitochondriaux.

Le rapport $N_0(\text{extrait})/N_0(\text{tot})$ a été calculé à partir des résultats de qRT-PCR. Ce rapport correspond à la quantité d'ARNr présents dans les extraits mitochondriaux rapporté au niveau d'expression du gène dans les fractions totales ($N_0(\text{tot})$).

En bleu est représenté l' c ARNr 5S, en rouge l' m ARNr 5S.

Avec M : mitochondrie, ME : membrane externe, MI : membrane interne, EIM : espace inter-membranaire, MAT : matrice

3 Analyse des résultats et discussion

Les Ct que nous avons obtenus sont compris entre 14 et 31 (**Tableau 11**). Pour chaque ARNt, les valeurs sont reproductibles entre les trois amplifications réalisées à partir du même lot de transcription inverse, et entre les trois lots de transcription inverse. Les quantifications réalisées sont présentées sous forme d'histogrammes.

Les quantifications sont corrélées avec les résultats obtenus en northern blot

Comme le montre la **figure 67**, nous retrouvons l' l'_m ARNr 5S dans les mitochondries ainsi que dans les compartiments membrane interne et matrice. Cet ARNr n'est pas retrouvé dans les extraits de membrane externe. Par contre, il est faiblement retrouvé dans l'espace inter-membranaire. La présence de cet ARNr dans cet extrait témoigne d'une contamination de notre extrait par la matrice mitochondriale ou la membrane interne. Ainsi, nous n'allons pas tenir compte de cet extrait. L' l'_c ARNr 5S n'est pas retrouvé à l'intérieur de la mitochondrie. En effet, il n'est retrouvé que dans l'extrait total. Ces résultats sont donc en adéquation avec la localisation cellulaire de ces deux ARNr.

Les histogrammes (**Figure 68**) montrent que l'ARNt^{Gly(GCC)} n'est pas retrouvé dans l'extrait matriciel contrairement aux ARNt^{Gly(CCC)}, ARNt^{Gly(UCC)} et ARNt^{Val(CAC)}. De plus, l'ARNt^{Gly(UCC)} est présent en quantité plus importante que l'ARNt^{Gly(CCC)}. Ces résultats concordent donc avec les expériences réalisées par northern blot chez les mitochondries de pomme de terre (Brubacher-Kauffmann et al., 1999). De plus, les ratios des extraits mitochondriaux par rapport aux extraits totaux calculés par northern blot pour les trois ARNt^{Gly} et pour l' l'_c ARNr 5S (0,7 pour l'ARNt^{Gly(UCC)}, 0,2 pour l'ARNt^{Gly(CCC)}, 0,03 pour l'ARNt^{Gly(GCC)} et 0,02 pour l' l'_c ARNr 5S) (Brubacher-Kauffmann et al., 1999) sont équivalents à ceux trouvés par PCR quantitative (0,7 pour l'ARNt^{Gly(UCC)}, 0,3 pour l'ARNt^{Gly(CCC)}, 0,02 pour l'ARNt^{Gly(GCC)} et 0,04 pour l' l'_c ARNr 5S).

Ainsi, les conditions sont optimales pour une exploitation des données concernant les extraits membranaires.

$$\frac{N_0(\text{extrait})}{N_0(\text{tot})}$$

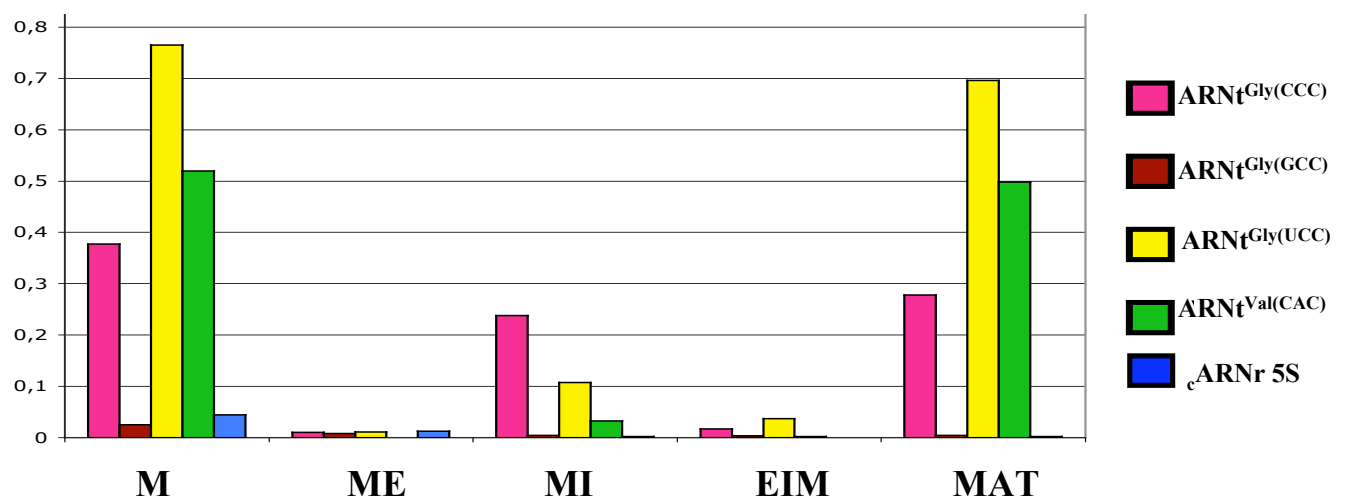


Figure 68

Répartition différentielle des ARNt au sein des différents sous-compartiments mitochondriaux.

Le rapport $N_0(\text{extrait})/N_0(\text{tot})$ a été calculé à partir des résultats de qRT-PCR. Ce rapport correspond à la quantité d'ARNt présents dans les fractions mitochondriales rapporté au niveau d'expression du gène dans les fractions totales ($N_0(\text{tot})$).

En rose est représenté l'ARNt^{Gly(CCC)}, en brun l'ARNt^{Gly(GCC)}, en jaune l'ARNt^{Gly(UCC)}, en vert l'ARNt^{Val(CAC)} et en bleu l'5S rRNA.

Avec M : mitochondrie, ME : membrane externe, MI : membrane interne, EIM : espace intermembranaire, MAT : matrice

Il n'y pas d'enrichissement en ARNt au niveau de la membrane externe (Figure 68)

Les quantifications réalisées sur l'extrait membrane externe ne montrent pas la présence d'ARNt. En effet, les signaux obtenus ne semblent pas être significatif. Il semble donc qu'il n'y ait pas d'enrichissement en ARNt qu'il soit importé ou non.

Plusieurs explications peuvent être proposées. Tout d'abord, il est possible que certains ARNt ne soient pas adressés vers la surface mitochondriale comme par exemple l'ARNt^{Gly(GCC)}. D'autres ARNt pourraient arriver à la surface mitochondriale et traverser la membrane externe *via* les pores VDAC sans subir aucune restriction, comme pour les ARNt^{Gly(CCC)}, ARNt^{Val(CAC)} et ARNt^{Gly(UCC)}. En effet, la membrane externe est composée de 50% de protéines VDAC. C'est une membrane très perméable, ainsi les ARNt pourraient traverser la membrane externe sans difficulté. De plus, il est possible que la présence des ARNt soit extrêmement transitoire à ce niveau et donc sans fixation covalente des ARNt aucune détection ne pourra être réalisée. Enfin, on ne peut pas exclure que nos conditions d'extraction des ARNt ne permettent pas de conserver les ARNt à la surface des membranes externes.

Les ARNt sont présents à des taux différents au niveau de la membrane interne (Figure 68)

Les quantifications obtenues pour la membrane interne montrent que l'ARNt^{Gly(CCC)} est présent en quantité deux fois plus importante que l'ARNt^{Gly(UCC)} et quatre fois plus importante que l'ARNt^{Val(CAC)} alors que ces deux derniers ARNt sont deux voire trois fois plus présents dans l'extrait matriciel. L'ARNt^{Gly(CCC)} a donc un comportement différent des deux autres ARNt. Nous pourrions imaginer que l'importation de cet ARNt soit freinée par des mécanismes de régulation au niveau de cette membrane d'où son enrichissement. Par contre, comme les ARNt^{Gly(UCC)} et ARNt^{Val(CAC)} sont plus importés dans la mitochondrie, alors ils pourraient traverser plus vite la membrane interne et donc ils seraient moins retrouvés au niveau de la membrane interne.

$$\frac{N_0(\text{extrait})}{N_0(\text{tot})}$$

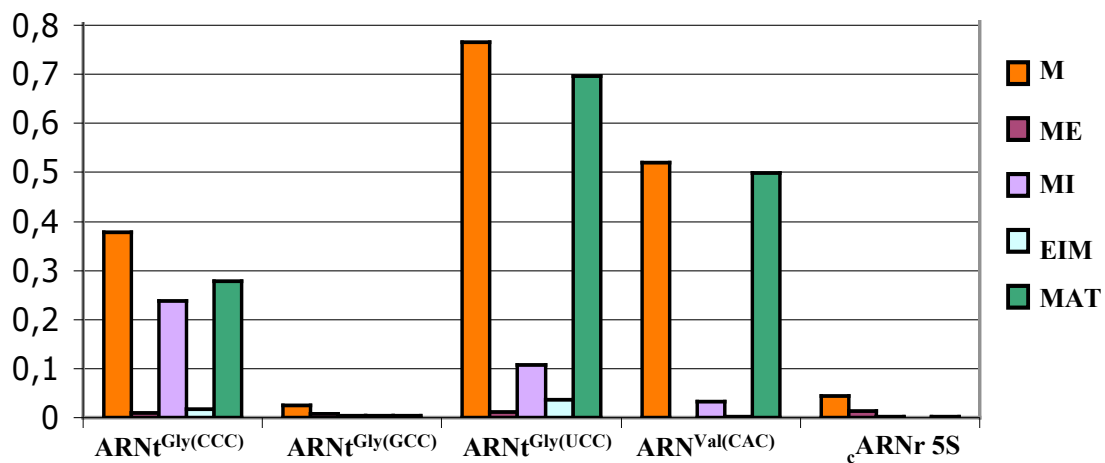


Figure 69

Répartition différentielle des ARNt au sein des différents sous-compartiments mitochondriaux.

Le rapport $N_0(\text{extrait})/N_0(\text{tot})$ a été calculé à partir des résultats de qRT-PCR. Ce rapport correspond à la quantité d'ARNt présents dans les fractions mitochondriales rapporté au niveau d'expression du gène dans les fractions totales ($N_0(\text{tot})$).

En rouge est représenté l'extrait mitochondrial, en violet l'extrait membrane externe, en mauve l'extrait membrane interne, en bleu l'espace inter-membranaire et en vert l'extrait matriciel.

Avec M : mitochondrie, ME : membrane externe, MI : membrane interne, EIM : espace inter-membranaire, MAT : matrice

Néanmoins, on ne peut pas exclure que les ARNt quantifiés soient accrochés à la face matricielle de la membrane interne. En effet, comme les taux d'ARNt présents dans l'extrait d'espace inter-membranaire sont faibles, il est possible que les ARNt ne soient pas enrichis au niveau de la face de la membrane interne orientée vers l'espace inter-membranaire mais plutôt au niveau de la face matricielle. Ainsi, comme la traduction mitochondriale est intimement liée à la membrane interne, on pourrait envisager que ces ARNt participent à la synthèse protéique alors que les ARNt retrouvés dans la matrice mitochondriale assureraient d'autres fonctions.

Suivi du comportement des ARNt tout au long des sous-compartiments mitochondriaux (Figure 69)

L'analyse des histogrammes obtenus pour les ARNt retrouvés dans la mitochondrie montre qu'ils ne semblent pas freinés lors de leur translocation à travers les deux membranes mitochondriales mais au contraire qu'ils soient importés rapidement et massivement. D'ailleurs à partir des Ct obtenus dans l'extrait total, nous avons pu estimer que l'ARNt^{Gly(UCC)} est 16 fois plus présent dans l'extrait total que l'ARNt^{Val(CAC)} et 500 fois plus présent que les deux autres ARNt^{Gly}. Ainsi, on pourrait imaginer qu'il y ait une forte présence de cet ARNt dans le cytosol qui pourrait permettre une importation massive et rapide de cet ARNt à travers les deux membranes mitochondriales et donc un fort taux dans la matrice mitochondriale.

Par contre, l'ARNt^{Gly(GCC)}, qui n'est pas retrouvé dans la mitochondrie, n'est pas enrichi à la surface des mitochondries. Il semble donc que cet ARNt soit confronté à une barrière à ce niveau. Inversement, l'ARNt^{Gly(CCC)} est présent dans l'extrait total au même taux que l'ARNt^{Gly(GCC)} non importé et comme aucun enrichissement n'est retrouvé à la surface de la mitochondrie, il semble qu'au niveau de la membrane externe mitochondriale l'ARNt^{Gly(CCC)} soit sélectionné pour être importé.

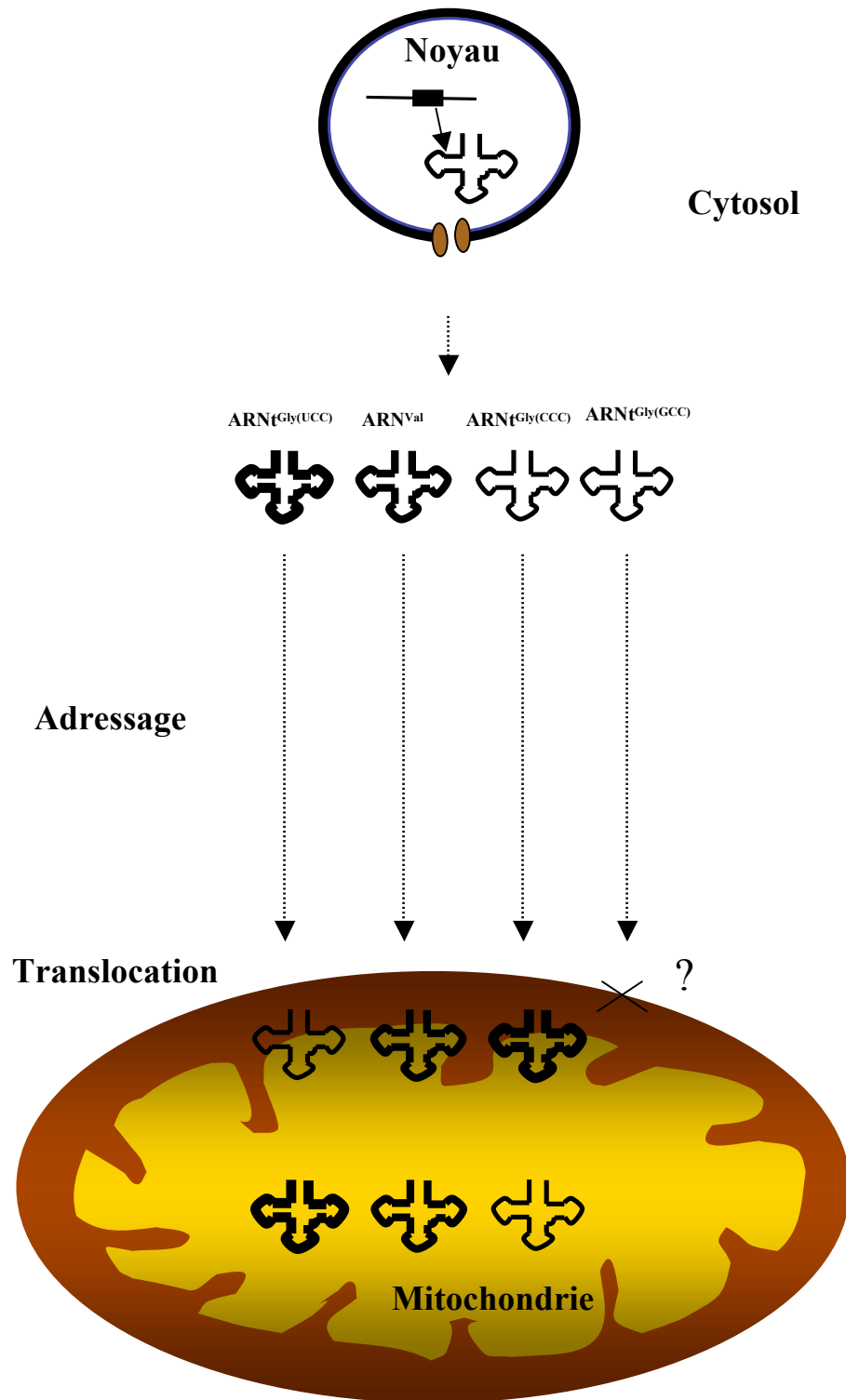


Figure 70

Modèle proposé pour expliquer la sélectivité du processus d'importation des ARNt au sein des mitochondries végétales

6 Conclusion

Chez les plantes supérieures, le nombre et l'identité des ARNt cytosoliques importés dans les mitochondries varient d'une plante à l'autre. Une des questions qui se pose est de comprendre comment se fait cette sélectivité d'importation. Cette question est particulièrement importante chez les plantes car le processus de sélection est hautement fin et surtout car des ARNt ayant une même séquence sont importés dans les mitochondries de certaines plantes et pas dans d'autres.

Nos hypothèses de départ suggéraient que la sélectivité puisse se faire à trois niveaux qui ne sont pas exclusifs : au moment de l'adressage des ARNt à la surface des mitochondries, lors de leur translocation à travers les deux membranes mitochondriales, lors d'une dégradation préférentielle de certains ARNt après l'importation non sélective de tous les ARNt cytosoliques.

Notre étude montre que ces hypothèses ne semblent pas valables chez les plantes. En effet, aucune des trois situations n'a été retrouvée. Les résultats suggèrent que la sélectivité ne se fasse pas lors de l'adressage des ARNt vers la surface de la mitochondrie puisque aucun enrichissement particulier en ARNt importés n'est observé. Inversement, nous n'observons pas non plus un enrichissement en ARNt cytosol-spécifiques à la surface des mitochondries. De plus, les membranes internes ne semblent pas indiquer qu'il y ait un blocage particulier en ARNt. Enfin, l'ARNt^{Gly(GCC)} non importé n'est pas retrouvé dans la mitochondrie. Il semble donc que le mécanisme de sélectivité soit plus complexe (**Figure 70**).

L'importation des ARNt à travers les membranes semble être régulée de telle sorte à avoir le pool d'ARNt requis au sein de la matrice mitochondriale à un taux adéquat. En effet, il semble qu'il y ait deux niveaux de sélection. Le premier permet de discerner les ARNt importés de ceux qui ne le sont pas tels que les ARNt^{Gly(GCC)} et ARNt^{Gly(CCC)}. Le second permet d'ajuster le taux d'ARNt importé comme pour les ARNt^{Gly(UCC)} et ARNt^{Gly(CCC)}. Ainsi, on pourrait imaginer que les ARNt importés soient sélectionnés au niveau de la membrane externe, probablement par des récepteurs membranaires et que les ARNt soient importés à des taux précis afin d'être utilisés dans la traduction (le taux sera peut être corrélé à l'usage des codons) ou dans d'autres fonctions au sein de la matrice mitochondriale (régulation etc.).

Cette étude doit être élargie à d'autres ARNt importés ou non. De plus, elle devra être confirmée par une deuxième approche telle que des expériences de dot blot. En effet, des oligonucléotides spécifiques d'ARNt importés ou non pourrait être déposés sur des membranes incubées avec des extraits des différents sous-compartiments mitochondriaux dont les ARNt sont radiomarqués. La comparaison des taux des ARNt présents dans les différents sous-compartiments mitochondriaux donnera des indications sur le niveau de sélectivité lors de l'importation des ARNt.

Conclusions et perspectives

Au cours de mes travaux de thèse, nous nous sommes intéressés à trois aspects du mécanisme d'importation des ARNt au sein des mitochondries végétales : tout d'abord la question de l'interaction entre la protéine VDAC et les ARNt, puis les partenaires protéiques de VDAC et enfin la recherche des barrières impliquées dans l'importation. Toutefois, il reste de nombreuses questions à résoudre.

1 Interaction entre les protéines VDAC de pomme de terre et les acides nucléiques

Ces travaux de thèse ont abordé dans un premier temps l'étude de l'interaction entre les protéines VDAC34 ou VDAC36 et les ARNt. Pour cela, nous avons tiré profit du fait que la protéine VDAC34 interagit plus fortement avec les ARNt que la protéine VDAC36 alors que ces deux protéines possèdent 75% d'identité. L'interaction de mutants des deux protéines VDAC avec les ARNt a été analysée par northwestern. Les résultats indiquent que l'interaction ne se fait par un motif précis mais que les acides aminés impliqués dans l'interaction sont répartis le long de la séquence protéique, en particulier au niveau du premier tiers N-terminal qui contient une hélice α . Cette étude a montré que toute la protéine et vraisemblablement sa structure semble requise pour l'interaction avec les ARNt. Les protéines VDAC étaient initialement connues pour être des transporteurs de métabolites tels que l'ATP. Néanmoins, les sites de fixation aux ARNt ne mettent pas en jeu les sites de liaison à l'ATP.

Une question qui reste en suspend est de savoir comment l'ARNt traverse la protéine VDAC. En effet, le diamètre de VDAC est de 3 nm environ. Cette protéine permet le passage de métabolites tels que l'ATP ou le NADH. Du fait de sa structure en « L », l'encombrement de l'ARNt est important. Ainsi, la question est de savoir si l'ARNt est dénaturé ou non lors de son passage à travers les membranes mitochondriales. Pour répondre à cette question, des expériences d'importation *in vitro* pourraient être envisagées avec un ARNt produit *in vitro* comme cela a été fait chez la levure (Entelis et al., 1998). Cet ARNt serait constitué de deux parties produites séparément et hybridées afin de former un ARNt capable d'adopter une structure 3D correcte mais contenant une brèche. Ainsi, si l'ARNt est retrouvé après importation entier, alors il n'aura pas été dénaturé lors de son transport. Par contre, si les deux

parties de l'ARNt sont retrouvées dans la mitochondrie, alors l'ARNt aura été dénaturé lors de son passage à travers les membranes mitochondriales.

L'étude de cette interaction des protéines VDAC a été élargie aux acides nucléiques. Il semble que la protéine VDAC34 soit plus adaptée à interagir avec les acides nucléiques que la protéine VDAC36. On pourrait donc imaginer qu'elle joue un rôle crucial et différent de VDAC36 au sein des mitochondries. Néanmoins, le Kd de VDAC36 témoigne d'une interaction forte entre cette protéine et les ARNt. Il est donc possible que dans certaines conditions la protéine VDAC36 subisse un changement de conformation permettant de dévoiler des sites de liaison aux acides nucléiques. Les protéines VDAC forment des familles multigéniques. Ainsi on pourrait imaginer qu'*in vivo* suivant les conditions physiologiques, chaque isoforme de VDAC lie préférentiellement un type d'acide nucléique. Ces porines assureraient donc des rôles différentiels et complémentaires. Pour étudier le rôle de ces isoformes, il serait intéressant d'étudier des mutants de ces protéines. Actuellement, des mutants d'insertion d'ADN-t sont disponibles pour les protéines VDAC1 à 4 d'*Arabidopsis thaliana*. Des essais ont été initiés en collaboration avec l'équipe de G. Ephritikhine (Institut des Sciences du Végétal, CNRS-UPR 2355, Gif sur Yvette) afin d'étudier l'effet de ses mutants sur le transport des ARNt dans les mitochondries. Chez l'algue verte *C. reinhardtii*, deux gènes codant des protéines VDAC-like, nommées VDACI et VDACII, ont été identifiés. Afin d'étudier le rôle potentiel de ces protéines dans le transport des ARNt, des travaux sont actuellement en cours avec l'équipe de C. Remacle (Université de Liège, Belgique) afin d'inhiber l'expression de ces protéines. Les mutants montrant une expression affaiblie ou nulle sont sélectionnés afin d'analyser leur activité physiologique ainsi que leur contenu en ARNt. Cette étude permettra de déterminer si le transport des ARNt dans les mitochondries est affecté dans ces mutants.

Les protéines VDAC peuvent interagir avec différents types d'acides nucléiques. Ainsi, on ne peut exclure qu'elles assurent des rôles différents du transport d'ARNt ou d'ADN. En effet, ces protéines pourraient permettre le passage d'ARN ou d'ADN en faible quantité non détectable avec les outils actuels. Par exemple, des ARN régulateurs pourraient être importés et être impliqués dans le contrôle du métabolisme mitochondrial. De plus, dans la mesure où certains ARNm sont adressés et traduits préférentiellement à la surface des mitochondries chez la levure et l'homme (Corral-Debrinski et al., 2000 ; Sylvestre et al., 2003a), on ne peut exclure qu'un tel phénomène existe chez les plantes, et que les protéines

VDAC pourraient servir de point d'ancrage pour maintenir ou stabiliser des ARNr ou de l'ARN messenger par exemple.

L'interprétation des résultats se fait en relation avec la structure secondaire prédite de VDAC34. Dans le cadre d'une étude structure/fonction, l'obtention de la structure cristallographique de cette protéine est primordiale pour comprendre l'interaction des protéines VDAC avec les ARNt. En effet, cette protéine forme un tonneau β en trois dimensions, des sites d'interaction peuvent donc être formés avec des acides aminés à différents positions de la séquence protéique qui sont rapprochés dans l'espace. Cette structure permettra aussi de comprendre comment l'ARNt peut traverser la porine. Cette étude a été réalisée et est présentée dans le paragraphe qui suit.

2 Essais de cristallisation des protéines VDAC

Afin de déterminer la structure tridimensionnelle de la protéine, trois pré-requis étaient nécessaires : avoir les protéines VDAC natives, pures et en grande quantité, mettre au point les conditions de cristallisation et avoir des tâches de diffraction exploitables. Nos expériences nous ont permis de produire sous forme native 1 mg des deux protéines VDAC34 et VDAC36 à 0,5 mg/mL. Ces protéines sont pures à 99%, elles se replient correctement et sont stables et homogènes en solution dans du β -octylglucoside (0,7%). Les tests que nous avons ensuite réalisés pour cribler les conditions de cristallisation ont mis en évidence plusieurs possibilités qui permettent d'obtenir des cristaux. Cependant, les cristaux obtenus étaient de petites tailles et les tâches obtenus n'étaient pas exploitables. Les conditions obtenues vont donc être reprises dans la technique de diffusion de vapeur afin de produire des cristaux de grande taille.

A ce jour, seules les structures des protéines VDAC1 humaine et de souris ont été résolues. Ainsi, la résolution de la structure des protéines VDAC de pomme de terre permettra d'enrichir les connaissances sur ces protéines et proposera la première structure de protéine VDAC végétale. De plus, la résolution des structures des deux protéines VDAC34 et VDAC36 de pomme de terre permettra de mieux comprendre pourquoi ces deux protéines interagissent différemment avec les acides nucléiques. Les protéines VDAC de pomme de

terre ne sont pas cristallisées dans un environnement lipidique contrairement à la protéine VDAC1 de souris. Ainsi, l'aboutissement de cette étude permettra de proposer la seconde structure pour les protéines VDAC.

Dans la littérature beaucoup de protéines ont vu leur cristallisation favorisée en présence de leur substrat. Par exemple, les aminoacyl-ARNt synthétases sont cristallisées beaucoup plus vite lorsqu'elles sont en présence de leurs ARNt homologues, probablement parce qu'elles sont stabilisées (Yaremchuk et al., 1995). Ainsi, dans l'optique de mieux comprendre l'interaction de VDAC avec les ARNt, la co-cristallisation des deux protéines VDAC de pomme de terre avec les ARNt natifs va être initiée. La résolution de la structure du complexe donnera des renseignements cruciaux pour la compréhension de l'interaction entre les protéines VDAC et les ARNt ainsi que pour le transport des ARNt.

3 Recherche des partenaires protéiques de VDAC

Un dernier aspect que nous avons abordé concerne l'identification des partenaires membranaires de VDAC impliqués dans l'importation des ARNt dans les mitochondries végétales. Pour se faire des expériences de farwestern sur des gels bidimensionnels ont été réalisées sur des membranes totales de mitochondries de pomme de terre en présence de VDAC34 native. Ainsi, la spectrométrie de masse a permis d'identifier huit protéines interagissant avec la protéine VDAC34 de pomme de terre. A partir des données disponibles au laboratoire et de la littérature, nous avons privilégié l'analyse de cinq d'entre elles : deux précurseurs de la malate déshydrogénase, une protéine homologue au précurseur de l'aldéhyde déshydrogénase 1 de *Lotus corniculatus*, une protéine homologue à la protéine TOM40-1 d'*Arabidopsis thaliana* et une protéine homologue à une sous-unité de l'ATP synthase de *Glycine max*. L'analyse des séquences de toutes ces protéines par le logiciel BindN montrent que plusieurs acides aminés pourraient potentiellement interagir avec les ARNt. L'étape suivante sera de valider l'interaction de ces protéines avec VDAC notamment par split ubiquitine ou farwestern en les surexprimant. Si l'interaction est validée, l'étape suivante sera de tester leur interaction avec les ARNt par northwestern et gel retard. Ainsi, si ces protéines interagissent avec VDAC et les ARNt, plusieurs possibilités s'offrent afin d'étudier le rôle de chacune de ces protéines dans le transport des ARNt.

Pour les précurseurs des protéines mitochondriales, il s'agira de réaliser par exemple des expériences d'importation *in vitro* avec les protéines surexprimées et des ARNt radiomarqués afin de voir si l'efficacité d'importation des ARNt est modifiée. Pour étudier la possible implication de la protéine TOM40-1 dans le transport des ARNt, des mutants pourraient être produits afin d'inhiber l'expression de cette protéine et d'analyser l'effet sur le transport des ARNt. La dernière protéine identifiée pour interagir avec VDAC34 est la sous-unité δ de l'ATP synthase. Cette sous-unité est impliquée dans le maintien de la liaison entre FO et F1, dans la régulation de FO en activant le transport des protons et dans la transmission d'énergie entre FO et F1. C'est donc une protéine cruciale pour la production d'ATP. De plus, il a été décrit que cette sous-unité peut-être localisée en dehors du complexe V (Monticello & Brusilow, 1994). Ainsi, la localisation de cette sous-unité au niveau d'un autre complexe que le complexe V laisse envisager qu'elle puisse former avec d'autres protéines un complexe permettant de produire l'énergie nécessaire au transport des ARNt. Une de ces protéines pourrait être la sous-unité γ de l'ATP synthase. En effet, il a été démontré au laboratoire que cette sous-unité est capable d'interagir avec les ARNt. D'ailleurs, il serait intéressant d'analyser l'interaction de cette sous-unité avec d'autres acides nucléiques. Pour tenter d'isoler un tel complexe, une colonne d'affinité contenant un ARNt pourrait être envisagée sur des protéines membranaires.

4 Etude du niveau de sélection dans le mécanisme d'importation des ARNt au sein des mitochondries végétales

La sélectivité de l'importation des ARNt dans les mitochondries peut se faire à plusieurs niveaux (qui ne sont pas exclusifs) : lors de l'adressage à la surface des mitochondries, lors de la translocation à travers chacune des deux membranes, ou par le biais d'une dégradation préférentielle à l'intérieur de la mitochondrie. Pour tenter de résoudre la question de la sélectivité nous avons recherché à quel niveau elle pouvait se faire. Ainsi, nous avons quantifié dans les différents sous-compartiments mitochondriaux plusieurs ARNt importés ou non dans la mitochondrie. Les résultats suggèrent que la sélectivité ne se fasse pas lors de l'adressage des ARNt vers la surface de la mitochondrie puisque aucun enrichissement particulier en ARNt importés n'est observé. Inversement, nous n'observons pas non plus un enrichissement en ARNt cytosol-spécifiques à la surface des mitochondries.

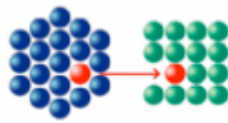
L'importation des ARNt à travers les membranes semble être régulée de telle sorte à avoir le pool d'ARNt requis au sein de la matrice mitochondriale à un taux adéquat. En effet, il semble qu'il y ait deux niveaux de sélection. Le premier permet de discerner les ARNt importés de ceux qui ne le sont pas. Le second permet d'ajuster le taux d'ARNt importé. Chez l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii*, la traduction mitochondriale dépend très fortement de l'importation d'ARNt cytosoliques. Les taux d'ARNt importés sont corrélés à l'utilisation des codons, suggérant l'existence de processus de régulation et/ou co-adaptation (Vinogradova et al., 2009). On peut donc imaginer qu'une telle situation existe chez les plantes. Afin d'élucider ce mécanisme de sélectivité plus en détail, il serait intéressant d'élargir cette étude à d'autres ARNt et de vérifier ces résultats par une seconde approche. Pour se faire, des expériences de dot blot pourraient être réalisées avec des oligonucléotides complémentaires aux ARNt placés sur une membrane qui sera mise à incuber avec des ARNt radiomarqués extraits des différents sous-compartiments mitochondriaux. La comparaison des taux des ARNt présents dans les différents sous-compartiments mitochondriaux donnera des indications sur le niveau de sélectivité lors de l'importation des ARNt.

5 Applications de l'étude du transport des ARNt aux dysfonctionnements mitochondriaux liés aux ARNt

Les protéines VDAC sont présentes chez tous les eucaryotes. Ainsi, il est possible que cette protéine soit impliquée chez d'autres organismes dans le transport des ARNt dans les mitochondries. Néanmoins, chez les protozoaires cette porine n'est pas impliquée dans le transport des ARNt (Pusnik et al., 2009). La compréhension de la sélectivité dans le mécanisme du transport des ARNt permettra d'adresser des molécules d'ARN ou d'ADN dans les mitochondries. De manière générale, la compréhension des mécanismes d'importation chez la levure, les protozoaires et les plantes permettent d'envisager de nouvelles approches pour adresser du matériel exogène, ADN ou ARN, dans le compartiment mitochondrial. A ce jour, quelques approches ont été décrites (Kyriakouli et al., 2008 ; Rustin et al., 2007). Par exemple, il est possible de restaurer des mutations de l'ADN mitochondrial en transfectant des mitochondries ou en exprimant un gène dans le noyau dont le produit d'expression serait importé dans la mitochondrie. Bien que ces approches soient confrontées à de multiples obstacles (transfection difficile, expression transitoire, etc.), elles se révèlent être

une stratégie productive et prometteuse pour l'avenir. En effet, la place de la mitochondrie dans de nombreux dysfonctionnements est grande, en particulier chez l'homme. Ainsi toute complémentation de tout ou partie des déficits mitochondriaux préparent les outils thérapeutiques de demain pour vaincre les maladies mitochondriales.

Nouveau chapitre de la thèse



Association Bernard Gregory
www.abg.asso.fr



*Valorisation des compétences des docteurs
«un nouveau chapitre de la thèse®»*

Samira EL FAROUK-AMEQRANE

École doctorale Sciences de la Vie et la Santé
Université de Strasbourg

Mentor : Pascale Klein

“Etude des protéines VDAC dans le cadre de
l’importation des ARNt dans les mitochondries”

Date de la présentation orale du « NCT » : 03 juillet 2009

Directrice de thèse : Laurence Maréchal-Drouard

Date probable de soutenance de la thèse : Octobre 2009

I Cadre général et enjeux

1 Introduction

Les organismes vivants sont constitués de cellules regroupées en tissus eux-mêmes regroupés en organes. Les cellules sont des unités vivantes qui fonctionnent de manière autonome. Elles produisent l'énergie qui leur est nécessaire au niveau d'un compartiment nommé mitochondrie. Cet élément est primordial car il est au cœur de nombreux processus vitaux pour les cellules comme la production d'énergie, la mort cellulaire ou le stockage du calcium. Aussi les défauts de fonctionnement de la mitochondrie sont à l'origine de nombreuses maladies qui impliquent de nombreux organes avec des signes neurologiques et musculaires souvent de premier plan. Les maladies les plus citées sont les syndromes MELAS et MERFF. Ceci explique que la mitochondrie est au cœur de nombreux programmes de recherches scientifiques fondamentales, agroalimentaires et pharmaceutiques.

Les mitochondries proviennent de bactéries qui auraient été intégrées au sein de cellules primitives. Ainsi elles possèdent leur propre ADN et leur propre machinerie de production des protéines. Cependant au cours de l'évolution, beaucoup de gènes ont été transférés depuis le génome mitochondrial vers le génome nucléaire, comme certains gènes codant des ARN de transfert (ARNt). Pour pallier ce manque la mitochondrie va importer par exemple des ARNt codés par le génome nucléaire. Ces ARNt sont les adaptateurs lors de la synthèse protéique entre la séquence d'ARN à décoder et les acides aminés. Ainsi lors de la lecture de la séquence d'ARN ils permettent de placer les acides aminés dans le bon ordre afin de produire une protéine fonctionnelle.

Mon laboratoire s'intéresse au transport des ARNt dans les mitochondries végétales, en particulier il a montré que les ARNt traversent la membrane externe mitochondriale à travers la protéine VDAC. Cette protéine forme des canaux au sein de la membrane externe mitochondriale pour le passage de petites molécules comme l'ATP. Ainsi au cours de mes trois années de thèse, j'ai étudié comment cette protéine permettait le passage des ARNt sachant tout d'abord que ce sont des molécules de même taille que les protéines VDAC et qu'ils sont extrêmement structurés car ils forment un « L » en trois dimensions (3D).

Ma thèse s'est focalisée dans un premier temps sur l'étude de l'interaction entre VDAC et les ARNt puisqu'aucun site potentiel de liaison avec l'ARN n'a pu être prédit avec les outils informatiques sur cette protéine. Dans un second temps comme cette protéine forme un canal en 3D il semblait nécessaire de déterminer sa structure spatiale afin de mieux comprendre comment les ARNt peuvent traverser ce pore. Puis comme VDAC peut interagir avec différents acides nucléiques et que tous les ARNt ne rentrent pas dans la mitochondrie, nous avons recherché à quel niveau se faisait la sélectivité. Enfin pour décortiquer le processus d'importation des ARNt dans les mitochondries, je me suis attelée à la recherche des partenaires de VDAC.

2 Ma thèse dans son contexte

2.1 Le contexte scientifique

Mes travaux ont été effectués dans le laboratoire dont la thématique est « Adressage et transport de macromolécules vers les mitochondries » sous la direction de Mme Maréchal-

Drouard. L'équipe travaille conjointement avec les autres laboratoires du département « Biogenèse des mitochondries dans la cellule végétale » autour de l'étude des mitochondries végétales.

Sur le plan international, mon laboratoire d'accueil est souvent sollicité pour des présentations ou pour animer des symposiums de congrès et nos études sont régulièrement citées dans de nombreux articles scientifiques. De plus, nos articles sont publiés dans des journaux à fort facteur d'impact, ce qui vaut à l'équipe une reconnaissance au niveau international. Ceci est d'autant plus valorisant qu'il est le seul étudiant l'importation des ARNt dans les mitochondries chez les plantes. Ce thème de recherche est beaucoup plus approfondi chez la levure ou chez les protozoaires. Ainsi, nos rapports avec les autres laboratoires sont d'ordre collaboratif et les recherches effectuées par ces équipes représentent des informations précieuses pour mes travaux.

2.2 Les enjeux scientifiques, techniques et socio-économiques

Ces travaux de thèse ont été réalisés dans le cadre de la recherche fondamentale. Les enjeux scientifiques à court terme sont donc difficilement prévisibles. Cependant la recherche appliquée se fonde sur des résultats de la recherche fondamentale. La compréhension du mécanisme d'importation des ARNt dans les mitochondries permettrait à long terme par exemple d'introduire des ARNt fonctionnels dans les mitochondries qui souffrent d'un ARNt non fonctionnel.

Du point de vue technique, mon travail a nécessité deux types d'approches. Tout d'abord, j'ai employé des techniques visant à tester l'interaction des protéines avec les acides nucléiques et avec les protéines. Puis j'ai recherché des ARNt (importés ou non dans la mitochondrie) dans les différents compartiments mitochondriaux afin de comprendre où se faisait la sélectivité. Dans l'ensemble, j'ai eu recours à des méthodes variées afin d'obtenir mes propres résultats.

Comme je l'ai dit ci-dessus, le système d'importation des ARNt dans les mitochondries végétales est très différent de celui retrouvé dans les deux autres organismes modèles à savoir la levure et les protozoaires. Il semble donc qu'au cours de l'évolution des complexes protéiques différents sont parvenus à assurer des fonctions similaires. Ainsi les résultats obtenus pour ces différents systèmes nous permettent d'envisager de nouvelles pistes pour nos recherches car il n'est pas rare que les protéines trouvées chez ces organismes assurent les mêmes fonctions chez les plantes. L'élucidation de cette machinerie peut aboutir à terme à la mise au point d'une navette permettant le transport d'ARNt dans les mitochondries afin de traiter les maladies mitochondriales liées à un défaut d'ARNt notamment chez l'Homme ou les plantes. Une autre application serait d'exprimer un ARNt qui serait importé dans une mitochondrie qui exprime un ARNt non fonctionnel.

2.3 Les moyens scientifiques, techniques et humains

Sur le plan scientifique, chaque semaine trois séminaires sont programmés. Le premier est réalisé au niveau du laboratoire. Il nous permet de prendre connaissance des recherches effectuées par chaque membre de l'équipe. C'est l'occasion de discuter de l'avancée de chaque projet et de proposer des solutions ou des alternatives aux problèmes rencontrés. Le second rendez vous est réalisé au niveau du département entre les membres des équipes travaillant sur les mitochondries végétales. C'est une discussion ouverte sur les dernières manipulations et

résultats. Enfin, le dernier séminaire est organisé par l'Institut, il est présenté par des intervenants aussi bien externes qu'internes. Ces présentations permettent de connaître les dernières évolutions à la fois au niveau scientifique et technique. A côté de ces séminaires, j'ai pu profiter des compétences scientifiques et techniques des membres de l'équipe pour cerner mon sujet de thèse. De plus, j'ai eu accès, par l'Institut et le CNRS, aux versions électroniques des dernières publications scientifiques et par l'Université de Strasbourg aux différentes bibliothèques du campus.

Au niveau technique, j'ai utilisé des appareils classiques tels que centrifugeuses, machines à PCR, machine d'électrophorèse, hottes stériles etc... De plus, j'ai eu recours aux plateformes de séquençage, de protéomique et de PCR quantitative.

Enfin, j'ai pu bénéficier de la collaboration des membres de mon équipe ainsi que de techniciens et d'ingénieurs responsables des services communs de séquençage, de protéomique et de PCR quantitative. Leurs compétences scientifiques et techniques m'ont été d'une aide capitale.

2.4 Appartenance à des réseaux et collaborations

Les membres de notre Institut et des autres unités de recherche de Strasbourg se retrouvent régulièrement au cours de séminaires. Ainsi nous avons créé des collaborations avec plusieurs équipes de recherche. Au niveau national, plusieurs collaborations sont en cours avec plusieurs équipes sur les différents sujets d'étude du laboratoire. Ces collaborations sont le fruit de rencontres réalisées lors de congrès ou de stages de formation.

De plus, le laboratoire fait actuellement partie du réseau « MeetOchondrie ». Ce réseau a été créé afin de favoriser le développement d'une communauté scientifique interactive, compétitive, et dont l'intérêt commun est la recherche sur les mitochondries, que celle-ci soit à visée fondamentale, clinique ou appliquée.

3 La thèse et moi...

3.1 Le pourquoi de cette thèse ?

J'ai eu mon premier contact avec mon laboratoire d'accueil lors d'un stage volontaire d'un mois durant l'été 2003. Je souhaitais vivre concrètement ce qu'était la recherche scientifique et pouvoir ainsi déterminer la suite de mon cursus après ma licence. Ce stage m'a permis d'utiliser plusieurs techniques. Il a été extrêmement fructueux en résultats et en rencontres. J'ai donc décidé d'effectuer mon stage de master2 dans ce laboratoire. Pendant ce stage, j'ai découvert le sujet et j'ai été séduite par l'intérêt des techniques employées ainsi que la qualité de l'équipe. Une fois mon master achevé, je me suis présentée au concours pour obtenir une bourse du ministère de la recherche afin de financer ma thèse. Etant bien classée au concours, j'ai débuté ma thèse dès la rentrée suivante.

Les raisons qui ont motivé mon choix de réaliser une thèse dans le même laboratoire sont nombreuses. Tout d'abord, cela m'a permis de valider les résultats obtenus durant le master (une publication en premier auteur est en cours de préparation). De plus, et surtout, c'est la qualité de l'équipe qui me décida. Les nombreuses publications de l'équipe ainsi que les invitations à des congrès internationaux m'ont prouvé qu'elle était reconnue au niveau international. De plus, l'ambiance de travail au sein du laboratoire est excellente et j'y ai

toujours trouvé le soutien et la motivation.

3.2 Mon rôle dans la définition du projet

Lors de la préparation du concours aux bourses ministérielles, nous avons défini mon sujet de thèse en collaboration avec ma directrice de thèse. Ainsi, nous avons dessiné les grandes lignes du projet en décidant des stratégies mises en place et des techniques que j'allais mettre en œuvre.

II Déroulement, gestion et coût

1 Préparation et cadrage du projet

1.1 Facteurs de succès et de risques

Il était très difficile d'évaluer les facteurs de succès dans la recherche fondamentale. De plus, le fait de faire partie de l'unique équipe travaillant sur le transport des ARNt dans les mitochondries végétales rendait la tâche plus difficile. Ceci dit, cela ne signifiait pas que rien n'était connu à ce sujet. Comme je l'ai dit précédemment, ce thème est plus approfondi chez la levure et les protozoaires, ce qui représente une grande aide pour orienter mon travail. De plus, les outils expérimentaux dont je disposais ou que j'envisageais de réaliser laissaient présager d'une bonne faisabilité du projet.

1.2 Propriété intellectuelle

La recherche que nous faisons au laboratoire est de la recherche fondamentale. Dès que nous publions, les résultats tombent dans le domaine public. Ainsi, il n'y a aucune confidentialité comme cela est la règle en recherche et développement. Il est possible de produire des brevets mais ce n'est pas notre préoccupation majeure. Nous voulons avant tout avancer dans la compréhension des mécanismes de transport des ARNt dans les mitochondries végétales.

2 Gestion du projet

Durant ma thèse et en fonction des résultats obtenus, mon projet a évolué. Ainsi en concertation avec ma directrice de thèse nous avons régulièrement évalué l'avancement de mes travaux de recherche et si nécessaire nous avons réorienté mon travail de recherche en mettant l'accent sur un point plus particulier. J'ai donc pu jouer un rôle actif au cours de ma thèse. Ma directrice de recherche m'a fait confiance en me laissant une grande autonomie dans mon travail. En effet, j'ai pu mettre au point les techniques, proposer des idées de recherche, tester des hypothèses. De plus, comme je l'ai mentionné précédemment, une réunion avec tous les membres du laboratoire est organisée toutes les semaines pour suivre l'avancée des travaux. Le but de ces réunions est d'exposer les tous derniers résultats obtenus ainsi que les problèmes rencontrés. Lorsqu'une approche particulière rencontre des difficultés, une alternative est proposée.

3 Coût du projet

3.1 Ressources humaines

Types de dépenses	Temps passé pour le projet	Coût total pour le projet
Doctorant	100 %	72 490 euros
Directeur de recherche	20%	42 500 euros
TOTAL		114 990 euros

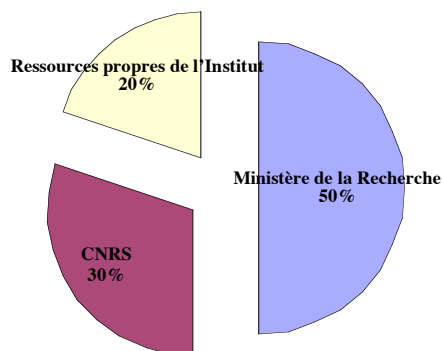
3.2 Dépenses associées au projet

Type de dépenses	Coût pour le projet
Consommables	15 000 euros
Infrastructures	3 200 euros
Matériels	6 600 euros
Déplacements	1 500 euros
Formations	1 650 euros
Documentation et communication	1 000 euros
TOTAL	28 950 euros

Coût total du projet : $114\,990 + 28\,950 = 143\,940$ euros

3.3 Origine des financements

Mon salaire a été financé par le Ministère de la Recherche grâce à la bourse qui m'a été attribuée suite à mon classement au concours. Le salaire de ma directrice de thèse a été financé par le CNRS. Enfin les dépenses associées au projet ont été financées par les fonds propres de l'Institut. Ces fonds proviennent de sources diverses : dotation de base du CNRS (32,6%) et de l'Université de Strasbourg (2,9%), et de contrats (64,5%). Ces contrats ont été contractés avec l'Agence Nationale de la Recherche, des industriels, la communauté européenne ou ils peuvent s'agir de dons de fondations. Ces ressources sont utilisées pour toutes les dépenses communes de l'Institut (produits chimiques, infrastructures...) puis sont distribuées aux différentes équipes de recherche.



III Compétences, savoir-faire, qualités professionnelles et personnelles

Cette thèse constitue pour moi une expérience professionnelle majeure. Elle me permet d'avoir aujourd'hui des compétences et connaissances à la fois scientifiques, techniques et méthodologiques.

1 Domaine d'expertise scientifique

Au cours de ma thèse, j'ai pu affiner mon expertise scientifique et technique dans le domaine de la biologie moléculaire et cellulaire grâce tout d'abord à mes travaux de recherche, aux différents articles lus et aux nombreux séminaires auxquels j'ai participé. Cette expérience me permettra de mettre en œuvre de nouveaux projets scientifiques et de gérer leur avancée.

2 Domaine d'expertise technique

Ma thèse m'a permis de m'investir dans la maîtrise de nombreuses approches comme les techniques de base de biologie moléculaire (techniques de clonage, mutagenèse par PCR,...) et des techniques biochimiques (gel de protéines, Western blot, interaction protéines-protéines et protéines-acides nucléiques). Travaillant sur les mitochondries, j'ai appris à les extraire des cellules en les maintenant intègres. De plus, j'ai pu approfondir mes connaissances informatiques et apprendre les outils nécessaires à l'étude des protéines et des acides nucléiques *in silico*.

3 Connaissances acquises dans le champ de la discipline

J'ai acquis de nombreuses connaissances concernant les interactions protéines/acides nucléiques et protéines/protéines. De plus, je me suis intéressée aux techniques de cristallisation des protéines et j'ai fait de nombreuses investigations sur la recherche d'ARNt au niveau des différents compartiments mitochondriaux.

4 Compétences méthodologiques

4.1 Conduite de projet

Pour être au courant des dernières avancées réalisées sur mon sujet de thèse, j'ai suivi l'évolution des connaissances dans mon domaine d'activité grâce à la bibliographie accessible sur le Web. Ainsi, nous avons pu orienter mes recherches en accord avec ma directrice de thèse.

4.2 Communication

Sur le plan de la communication, j'ai pu partager mon travail lors de congrès par le biais de posters et lors des séminaires au sein de notre Institut par le biais de communications orales en anglais.

J'ai également eu l'opportunité d'organiser deux projets scientifiques pour vulgariser la science au grand public.

En collaboration avec trois autres doctorants moniteurs, nous avons créé un stand sur la recherche à la Fête de la Science 2008 à Strasbourg. Ce premier projet consistait en la conception et l'organisation de jeux, d'expériences et de posters sur la biologie et les plantes. Ce stand a permis aux participants d'entrer par la pratique dans la démarche scientifique et de découvrir de manière ludique les fondements de la biologie. Ces journées d'échange avec le public ont été pour moi un très bon exercice de pédagogie puisqu'il demande d'expliquer en termes simples et de manière accessible des concepts qui sont complexes. Ce projet a également exigé une planification exhaustive des ressources à utiliser et transporter au village des Sciences où avait lieu la manifestation.

Le second projet porte sur l'élaboration d'un dossier Web qui va paraître sur le site Internet « Science citoyen » (<http://science-citoyen.u-strasbg.fr/>). Ce site est consulté en majorité par des enseignants du secondaire afin de préparer les cours qu'ils dispensent. Il permet de développer une véritable culture scientifique sur des thèmes inspirés par l'actualité. Ce dossier porte sur les Tests d'ADN. Il est subdivisé en plusieurs rubriques portant sur l'ADN, les techniques d'analyse et la législation. Nous avons mené une réelle réflexion sur des textes clairs et explicites accompagnés d'illustrations. De plus, nous assurerons une veille car les internautes pourront poser des questions auxquelles nous répondrons.

En tant que responsable des deux projets, j'ai pu encadrer et gérer des équipes dynamiques. De plus, j'ai développé des compétences administratives, financières, et logistiques tout en respectant les délais impartis par les organisateurs.

5 Compétences comportementales

5.1 Méthodologie de travail

J'ai un esprit assez critique qui me fait me remettre en question régulièrement ainsi que les résultats que je peux obtenir. Ainsi, je peux analyser consciencieusement mes résultats et orienter mes expériences en fonction des conclusions.

5.2 Gestion du temps

Au cours de ma thèse, j'ai eu l'opportunité d'effectuer un monitorat d'initiation à l'enseignement supérieur grâce à mon classement au concours de la bourse ministérielle pour financer ma thèse. Ainsi, mon projet a exigé une planification très précise puisque cet engagement a occupé une part assez conséquente de mon temps. En effet, la préparation des cours, leur dispense, la préparation ainsi que la surveillance et la correction des examens demandent un investissement assez conséquent. Ainsi, j'essaie au maximum de planifier mon travail. Je me donne un programme pour chaque jour. Durant la journée de travail, je connais les différents temps nécessaires aux expériences donc je m'organise pour pouvoir concilier plusieurs essais en même temps. Les expériences requièrent souvent des temps d'incubation que j'utilise pour faire de la bibliographie ou les tâches qui incombent à mon enseignement. Cette planification rigoureuse m'a permis de réaliser mes travaux de thèse en trois ans.

6 Savoirs-faire

6.1 Savoir-faire administratif

Le travail de laboratoire consiste aussi à réaliser des tâches administratives. En particulier, j'ai appris à établir des contrats pour des stagiaires et rédiger des dossiers de demande de bourses pour organiser mes déplacements aux congrès. De plus, la préparation des dossiers pour les projets de communication scientifique ont été pour moi une expérience formatrice tant dans la recherche de partenaires et de financements, que dans le suivi du projet, sa communication ou la logistique.

6.2 Savoir-faire linguistique

Ayant une bonne maîtrise de la langue anglaise, cette compétence me fut précieuse pendant toute la durée de ma thèse. La présence de personnes étrangères dans l'Institut et les séminaires en anglais me permettent d'améliorer ma compréhension et ma pratique de la langue anglaise. De plus, je suis amenée à préparer des présentations en anglais. J'ai donc pu affiner davantage ma maîtrise de la langue.

7 Qualités personnelles

7.1 Pédagogie/encadrement

Grâce à mon monitorat, j'ai suivi une excellente formation à l'enseignement et j'ai enseigné et encadré des étudiants de 2^{ème} année de Licence Sciences de la Vie à l'Université de Strasbourg. Ces enseignements permettent aux étudiants d'aborder la biochimie avec des cours théoriques et pratiques. Chaque séance était l'occasion pour les étudiants de développer leurs compétences de synthèse et d'expression orale ainsi que leur sens critique. Mener un groupe de 30 étudiants pendant 6 semaines et les conduire à avoir une réflexion critique sur les expérimentations qu'ils réalisent est très formateur. Il faut à la fois gérer le temps et le matériel, anticiper les expériences ardues, expliquer clairement la théorie, déceler les incompréhensions et les évaluer. Cela m'a permis de développer mon sens critique et ma pédagogie.

J'ai également géré des stagiaires. Je devais planifier leur travail, les former aux techniques classiques de laboratoire et les suivre tout au long de leur stage. Lorsque j'encadre, je deviens alors le "manager" : je forme et oriente les stagiaires. Au sein de l'équipe, je suis amenée à aider ou conseiller des étudiants en thèse dans leurs travaux.

7.2 Autonomie et Force de proposition

Comme je l'ai mentionné auparavant, mon projet a évolué en fonction des résultats. Ainsi, j'ai pu proposer des idées de recherche, tester des hypothèses et orienter mon travail de recherche. Ma directrice de thèse m'a fait confiance et m'a laissé une grande autonomie dans mon travail.

7.3 Adaptabilité et ouverture d'esprit

Ma rapidité de compréhension m'a permis de m'adapter rapidement au monde du travail notamment lors des collaborations. De plus, suite à différentes conversations avec des

chercheurs et des doctorants, il m'a été indiqué que j'avais une écoute et une ouverture d'esprit appréciées.

7.4 Construction d'un réseau professionnel personnel

Au fil des années, je me suis créé un réseau de connaissances comprenant des chercheurs, des ingénieurs, des maîtres de conférences, des responsables de plateformes de différents horizons et de différents instituts. À travers ces rencontres et les discussions que j'ai pu avoir, je me suis enrichie de tous leurs savoirs et leurs savoirs-faire. De plus, par ce moyen, j'ai eu accès à différentes ressources et à différents matériels.

7.5 Transférabilité de mes compétences

Mes recherches m'ont permis d'acquérir de nombreuses compétences scientifiques, techniques et méthodologiques qui peuvent être appliquées autant à la biologie végétale qu'à la biologie animale dans des laboratoires publics ou des entreprises privées.

IV Résultats et impacts de la thèse

1 Pour le laboratoire et l'équipe

Mes travaux ont permis de compléter les expériences amorcées pendant mon stage de master. Ces résultats sont actuellement rassemblés dans un manuscrit en vue d'une publication dans un journal à haut facteur d'impact. Ainsi, mon laboratoire va bénéficier de l'impact international de cette publication. La lisibilité du laboratoire devrait être renforcée au niveau international.

Ma thèse a permis à l'équipe d'approfondir ses connaissances sur les protéines VDAC et le processus d'importation des ARNt au sein des mitochondries végétales. Les derniers résultats obtenus ouvrent la voie vers de nouvelles recherches sur la compréhension de ce mécanisme ainsi que sa régulation et sur la cristallisation des protéines VDAC grâce aux outils méthodologiques que j'ai mis au point.

2 Pour la recherche et la société

Les résultats obtenus ont permis d'appréhender le transport des ARNt dans les mitochondries de plantes sous deux optiques particulières : par l'étude de l'interaction entre le canal VDAC, les acides nucléiques et les protéines ainsi que par la recherche des barrières empêchant l'import des ARNt.

À court terme, il n'y a aucun impact réel pour la société. Ceci dit, on peut imaginer qu'à terme ces travaux contribueront à ouvrir la voie à de nouveaux traitements contre les maladies présentant des dysfonctionnements au niveau des ARNt mitochondriaux ou à des applications dans le domaine agricole.

V Conclusion

En conclusion, la thèse est une formation très complète ouvrant de nombreuses voies que ce soit dans le domaine public ou privé. Elle permet d'acquérir de nombreuses compétences applicables à la recherche, l'enseignement, la communication ou encore la gestion de projet.

Les expériences que j'ai pu faire au cours de ma thèse ont renforcé mon envie de gérer des projets. Les compétences techniques, scientifiques et les méthodes de travail conjuguées à l'esprit d'analyse, l'adaptabilité et le travail d'équipe sont des qualités qui peuvent être utiles et bénéfiques à une entreprise. Toutes ces compétences peuvent me permettre de m'intégrer facilement dans une entreprise privée à laquelle je pourrais apporter une réelle valeur ajoutée. De plus, la possibilité de travailler sur des projets ayant une application concrète m'interpelle tout particulièrement. Actuellement en cours de rédaction de ma thèse, je poursuis ma prospection du marché et l'entretien de mon réseau afin d'obtenir un emploi dans ce domaine.

Mon deuxième projet professionnel serait d'intégrer une structure qui communique sur la science. En effet, faire découvrir de manière ludique les fondements de la biologie au grand public m'intéresse particulièrement. Le faire entrer dans la démarche scientifique lui permet de s'interpeller sur de sujets parfois très complexes. De plus, c'est l'occasion de briser des tabous ou de barrer la route à des « à priori » dans une ambiance conviviale. Ainsi, la communication de la science permet de développer une véritable culture scientifique. Elle permet de susciter des vocations chez les plus jeunes et est également un moyen de faire participer le grand public à des débats citoyens. De plus, les rencontres et le dialogue avec des personnes de différents horizons sont des expériences extrêmement enrichissantes où l'on apprend à déchiffrer les modes de pensée.

Ainsi, cette thèse constitue pour moi une expérience professionnelle majeure. Elle me permet d'avoir aujourd'hui des compétences et connaissances à la fois scientifiques, techniques et méthodologiques qui me seront précieuses dans mon avenir professionnel. Étant en fin de thèse aujourd'hui, je me rends compte que j'ai accompli dans un laps de temps défini et respecté, en parallèle à mon engagement au monitorat, un travail scientifique reconnu. Ceci me prouve que j'ai gagné le pari de la thèse.

Annexes

Bibliographie

- A**bu-Hamad S, Arbel N, Calo D, Arzoine L, Israelson A, Keinan N, Ben-Romano R, Friedman O, Shoshan-Barmatz V. 2009. The VDAC1 N-terminus is essential both for apoptosis and the protective effect of anti-apoptotic proteins. *J Cell Sci* 122:1906-1916.
- Abu-Hamad S, Sivan S, Shoshan-Barmatz V. 2006. The expression level of the voltage-dependent anion channel controls life and death of the cell. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:5787-5792.
- Adams KL, Palmer JD. 2003. Evolution of mitochondrial gene content: gene loss and transfer to the nucleus. *Mol Phylogenet Evol* 29:380-395.
- Adams KL, Qiu YL, Stoutemyer M, Palmer JD. 2002. Punctuated evolution of mitochondrial gene content: high and variable rates of mitochondrial gene loss and transfer to the nucleus during angiosperm evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:9905-9912.
- Adams V, Griffin L, Towbin J, Gelb B, Worley K, McCabe ER. 1991. Porin interaction with hexokinase and glycerol kinase: metabolic microcompartmentation at the outer mitochondrial membrane. *Biochem Med Metab Biol* 45:271-291.
- Adhya S. 2007. Leishmania mitochondrial tRNA importers. *Int J Biochem Cell Biol*.
- Agris PF. 2004. Decoding the genome: a modified view. *Nucleic Acids Res* 32:223-238.
- Ahmed AU, Beech PL, Lay ST, Gilson PR, Fisher PR. 2006. Import-associated translational inhibition: novel in vivo evidence for cotranslational protein import into Dictyostelium discoideum mitochondria. *Eukaryot Cell* 5:1314-1327.
- Akashi K, Takenaka M, Yamaoka S, Suyama Y, Fukuzawa H, Ohyama K. 1998. Coexistence of nuclear DNA-encoded tRNA^{Val}(AAC) and mitochondrial DNA-encoded tRNA^{Val}(UAC) in mitochondria of a liverwort *Marchantia polymorpha*. *Nucleic Acids Res* 26:2168-2172.
- Al Bitar F, Roosens N, Boxtel JV, Dewaele E, Jacobs M, Homble F. 2002. Expression of the rice vdc isoform2: histochemical localization and expression level. *Biochim Biophys Acta* 1579:133-141.
- Al Bitar F, Roosens N, Smeyers M, Vauterin M, Van Boxtel J, Jacobs M, Homble F. 2003. Sequence analysis, transcriptional and posttranscriptional regulation of the rice vdc family. *Biochim Biophys Acta* 1625:43-51.
- Alberts B, Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Watson, J.D. 1994. *Molecular Biology of the Cell*: Garland Publishing.
- Alberts B, Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Watson, J.D. 1995. *Biologie Moléculaire de la Cellule*: Garland Publishing.
- Andreoli C, Prokisch H, Hortnagel K, Mueller JC, Munsterkotter M, Scharfe C, Meitinger T. 2004. MitoP2, an integrated database on mitochondrial proteins in yeast and man. *Nucleic Acids Res* 32:D459-462.
- Arnez, JG et Mora D, 1997 Structural and fonctionnal considerations of the aminoacylation reaction *Trends in biochemical sciences* 22 : 211-216
- Azoulay-Zohar H, Israelson A, Abu-Hamad S, Shoshan-Barmatz V. 2004. In self-defence: hexokinase promotes voltage-dependent anion channel closure and prevents mitochondria-mediated apoptotic cell death. *Biochem J* 377:347-355.
- B**ackert S, Borner T. 2000. Phage T4-like intermediates of DNA replication and recombination in the mitochondria of the higher plant *Chenopodium album* (L.). *Curr Genet* 37:304-314.

- Bahamonde MI, Fernandez-Fernandez JM, Guix FX, Vazquez E, Valverde MA. 2003. Plasma membrane voltage-dependent anion channel mediates antiestrogen-activated maxi Cl⁻ currents in C1300 neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 278:33284-33289.
- Bahamonde MI, Valverde MA. 2003. Voltage-dependent anion channel localises to the plasma membrane and peripheral but not perinuclear mitochondria. *Pflugers Arch* 446:309-313.
- Baines CP, Kaiser RA, Sheiko T, Craigen WJ, Molkentin JD. 2007. Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death. *Nat Cell Biol* 9:550-555.
- Balk J, Leaver CJ, McCabe PF. 1999. Translocation of cytochrome c from the mitochondria to the cytosol occurs during heat-induced programmed cell death in cucumber plants. *FEBS Lett* 463:151-154.
- Bartholomew B, Kassavetis GA, Braun BR, Geiduschek EP. 1990. The subunit structure of *Saccharomyces cerevisiae* transcription factor III_C probed with a novel photocrosslinking reagent. *Embo J* 9:2197-2205.
- Bathori G, Parolini I, Tombola F, Szabo I, Messina A, Oliva M, De Pinto V, Lisanti M, Sargiacomo M, Zoratti M. 1999. Porin is present in the plasma membrane where it is concentrated in caveolae and caveolae-related domains. *J Biol Chem* 274:29607-29612.
- Bayrhuber M, Meins T, Habeck M, Becker S, Giller K, Villinger S, Vonrhein C, Griesinger C, Zweckstetter M, Zeth K. 2008. Structure of the human voltage-dependent anion channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:15370-15375.
- Beagley CT, Okimoto R, Wolstenholme DR. 1998. The mitochondrial genome of the sea anemone *Metridium senile* (Cnidaria): introns, a paucity of tRNA genes, and a near-standard genetic code. *Genetics* 148:1091-1108.
- Bentolila S, Alfonso AA, Hanson MR. 2002. A pentatricopeptide repeat-containing gene restores fertility to cytoplasmic male-sterile plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:10887-10892.
- Bera AK, Ghosh S, Das S. 1995. Mitochondrial VDAC can be phosphorylated by cyclic AMP-dependent protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 209:213-217.
- Bhattacharyya SN, Adhya S. 2004. tRNA-triggered ATP hydrolysis and generation of membrane potential by the leishmania mitochondrial tRNA import complex. *J Biol Chem* 279:11259-11263.
- Bhattacharyya SN, Chatterjee S, Adhya S. 2002. Mitochondrial RNA import in *Leishmania tropica*: aptamers homologous to multiple tRNA domains that interact cooperatively or antagonistically at the inner membrane. *Mol Cell Biol* 22:4372-4382.
- Bhattacharyya SN, Chatterjee S, Goswami S, Tripathi G, Dey SN, Adhya S. 2003. "Ping-pong" interactions between mitochondrial tRNA import receptors within a multiprotein complex. *Mol Cell Biol* 23:5217-5224.
- Bhattacharyya SN, Mukherjee S, Adhya S. 2000. Mutations in a tRNA import signal define distinct receptors at the two membranes of *Leishmania* mitochondria. *Mol Cell Biol* 20:7410-7417.
- Blachly-Dyson E, Peng S, Colombini M, Forte M. 1990. Selectivity changes in site-directed mutants of the VDAC ion channel: structural implications. *Science* 247:1233-1236.
- Blachly-Dyson E, Song J, Wolfgang WJ, Colombini M, Forte M. 1997. Multicopy suppressors of phenotypes resulting from the absence of yeast VDAC encode a VDAC-like protein. *Mol Cell Biol* 17:5727-5738.
- Blachly-Dyson E, Zambronicz EB, Yu WH, Adams V, McCabe ER, Adelman J, Colombini M, Forte M. 1993. Cloning and functional expression in yeast of two human isoforms

- of the outer mitochondrial membrane channel, the voltage-dependent anion channel. *J Biol Chem* 268:1835-1841.
- Boekema EJ, Braun HP. 2007. Supramolecular structure of the mitochondrial oxidative phosphorylation system. *J Biol Chem* 282:1-4.
- Bolender N, Sickmann A, Wagner R, Meisinger C, Pfanner N. 2008. Multiple pathways for sorting mitochondrial precursor proteins. *EMBO Rep* 9:42-49.
- Bonen L, and Brown, G.G. 1993. Genetic plasticity and its consequences : perspectives on gene organization and expression in plant mitochondria. *Can J Bot* 71:645-660.
- Bouzaidi-Tiali N, Aeby E, Charriere F, Pusnik M, Schneider A. 2007. Elongation factor 1a mediates the specificity of mitochondrial tRNA import in *T. brucei*. *Embo J* 26:4302-4312.
- Brandina I, Smirnov A, Kolesnikova O, Entelis N, Krasheninnikov IA, Martin RP, Tarassov I. 2007. tRNA import into yeast mitochondria is regulated by the ubiquitin-proteasome system. *FEBS Lett* 581:4248-4254.
- Braun HP, Schmitz UK. 1999. The protein-import apparatus of plant mitochondria. *Planta* 209:267-274.
- Brubacher-Kauffmann S, Marechal-Drouard L, Cosset A, Dietrich A, Duchene AM. 1999. Differential import of nuclear-encoded tRNAGly isoacceptors into solanum Tuberosum mitochondria. *Nucleic Acids Res* 27:2037-2042.
- Buettner R, Papoutsoglou G, Scemes E, Spray DC, Dermietzel R. 2000. Evidence for secretory pathway localization of a voltage-dependent anion channel isoform. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:3201-3206.
- Burger G, Gray MW, Lang BF. 2003. Mitochondrial genomes: anything goes. *Trends Genet* 19:709-716.
- Burger G, Lang BF. 2003. Parallels in genome evolution in mitochondria and bacterial symbionts. *IUBMB Life* 55:205-212.
- C**alvin K, Li H. 2008. RNA-splicing endonuclease structure and function. *Cell Mol Life Sci* 65:1176-1185.
- Carneiro VT, Dietrich A, Marechal-Drouard L, Cosset A, Pelletier G, Small I. 1994. Characterization of some major identity elements in plant alanine and phenylalanine transfer RNAs. *Plant Mol Biol* 26:1843-1853.
- Chang DD, Clayton DA. 1989. Mouse RNAase MRP RNA is encoded by a nuclear gene and contains a decamer sequence complementary to a conserved region of mitochondrial RNA substrate. *Cell* 56:131-139.
- Chatterjee S, Home P, Mukherjee S, Mahata B, Goswami S, Dhar G, Adhya S. 2006. An RNA-binding respiratory component mediates import of type II tRNAs into *Leishmania* mitochondria. *J Biol Chem* 281:25270-25277.
- Chen HC, Viry-Moussaid M, Dietrich A, Wintz H. 1997. Evolution of a mitochondrial tRNA PHE gene in *A. thaliana*: import of cytosolic tRNA PHE into mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* 237:432-437.
- Chevenet F., Brun C., Banuls A.L., Jacq B. and R. Christen. TreeDyn: towards dynamic graphics and annotations for analyses of trees. *BMC Bioinformatics* 2006, 7:439
- Choisne N, Martin-Canadell A, Small I. 1997. Transactivation of a target gene using a suppressor tRNA in transgenic tobacco plants. *Plant J* 11:597-604.
- Colombini M. 1980. Structure and mode of action of a voltage dependent anion-selective channel (VDAC) located in the outer mitochondrial membrane. *Ann N Y Acad Sci* 341:552-563.

- Colombini M. 1989. Voltage gating in the mitochondrial channel, VDAC. *J Membr Biol* 111:103-111.
- Conway DJ, Fanello C, Lloyd JM, Al-Joubori BM, Baloch AH, Somanath SD, Roper C, Oduola AM, Mulder B, Pova MM, Singh B, Thomas AW. 2000. Origin of *Plasmodium falciparum* malaria is traced by mitochondrial DNA. *Mol Biochem Parasitol* 111:163-171.
- Corral-Debrinski M, Blugeon C and Jacq C 2000. In yeast, the 3' untranslated region or the presequence of ATM1 is required for the exclusive localization of itq mRNA to the vicinity of mitochondria. *Mol Cell Biol* 20 : 7881-7892.
- Crausaz Esseiva A, Marechal-Drouard L, Cosset A, Schneider A. 2004. The T-stem determines the cytosolic or mitochondrial localization of trypanosomal tRNAs^{Met}. *Mol Biol Cell* 15:2750-2757.
- Crompton M. 1999. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J* 341 (Pt 2):233-249.

- D**elage L, Dietrich A, Cosset A, Marechal-Drouard L. 2003. In vitro import of a nuclearly encoded tRNA into mitochondria of *Solanum tuberosum*. *Mol Cell Biol* 23:4000-4012
- De Longevialle AF, Meyer EH, Andres C, Taylor NL, Lurin C, Millar AH, Small ID. 2007. The pentatricopeptide repeat gene OTP43 is required for trans-splicing of the mitochondrial nad1 Intron 1 in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 19:3256-3265.
- De Pinto V, Benz R, Caggese C, Palmieri F. 1989. Characterization of the mitochondrial porin from *Drosophila melanogaster*. *Biochim Biophys Acta* 987:1-7.
- De Pinto V, Tomasello F, Messina A, Guarino F, Benz R, La Mendola D, Magri A, Milardi D, Pappalardo G. 2007. Determination of the conformation of the human VDAC1 N-terminal peptide, a protein moiety essential for the functional properties of the pore. *Chembiochem* 8:744-756.
- Delage L, Dietrich A, Cosset A, Marechal-Drouard L. 2003a. In vitro import of a nuclearly encoded tRNA into mitochondria of *Solanum tuberosum*. *Mol Cell Biol* 23:4000-4012.
- Delage L, Duchene AM, Zaepfel M, Marechal-Drouard L. 2003b. The anticodon and the D-domain sequences are essential determinants for plant cytosolic tRNA(Val) import into mitochondria. *Plant J* 34:623-633.
- Delage L, Giege P, Sakamoto M, Marechal-Drouard L. 2007. Four paralogues of RPL12 are differentially associated to ribosome in plant mitochondria. *Biochimie* 89:658-668.
- Desloire S, Gherbi H, Laloui W, Marhadour S, Clouet V, Cattolico L, Falentin C, Giancola S, Renard M, Budar F, Small I, Caboche M, Delourme R, Bendahmane A. 2003. Identification of the fertility restoration locus, Rfo, in radish, as a member of the pentatricopeptide-repeat protein family. *EMBO Rep* 4:588-594.
- Dietrich A, Marechal-Drouard L, Carneiro V, Cosset A, Small I. 1996. A single base change prevents import of cytosolic tRNA(Ala) into mitochondria in transgenic plants. *Plant J* 10:913-918.
- Dill ET, Holden MJ, Colombini M. 1987. Voltage gating in VDAC is markedly inhibited by micromolar quantities of aluminum. *J Membr Biol* 99:187-196.
- Dimmer KS, Rapaport D. 2008. Proteomic view of mitochondrial function. *Genome Biol* 9:209.
- Doring C, Colombini M. 1985a. The mitochondrial voltage-dependent channel, VDAC, is modified asymmetrically by succinic anhydride. *J Membr Biol* 83:87-94.
- Doring C, Colombini M. 1985b. Voltage dependence and ion selectivity of the mitochondrial channel, VDAC, are modified by succinic anhydride. *J Membr Biol* 83:81-86.

- Dorner M, Altmann M, Paabo S, Morl M. 2001. Evidence for import of a lysyl-tRNA into marsupial mitochondria. *Mol Biol Cell* 12:2688-2698.
- Duchene AM, Giritch A, Hoffmann B, Cognat V, Lancelin D, Peeters NM, Zaepfel M, Marechal-Drouard L, Small ID. 2005. Dual targeting is the rule for organellar aminoacyl-tRNA synthetases in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:16484-16489.
- Duchene AM, Marechal-Drouard L. 2001. The chloroplast-derived trnW and trnM-e genes are not expressed in *Arabidopsis* mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* 285:1213-1216.
- Duchene AM, Pujol C, Marechal-Drouard L. 2009. Import of tRNAs and aminoacyl-tRNA synthetases into mitochondria. *Curr Genet* 55:1-18.
- Dudkina NV, Sunderhaus S, Boekema EJ, Braun HP. 2008. The higher level of organization of the oxidative phosphorylation system: mitochondrial supercomplexes. *J Bioenerg Biomembr* 40:419-424.
- Dyall SD, Brown MT, Johnson PJ. 2004. Ancient invasions: from endosymbionts to organelles. *Science* 304:253-257.

- E**lkeles A, Breiman A, Zizi M. 1997. Functional differences among wheat voltage-dependent anion channel (VDAC) isoforms expressed in yeast. Indication for the presence of a novel VDAC-modulating protein? *J Biol Chem* 272:6252-6260.
- Elkeles A, Devos KM, Graur D, Zizi M, Breiman A. 1995. Multiple cDNAs of wheat voltage-dependent anion channels (VDAC): isolation, differential expression, mapping and evolution. *Plant Mol Biol* 29:109-124.
- Englert M, Latz A, Becker D, Gimple O, Beier H, Akama K. 2007. Plant pre-tRNA splicing enzymes are targeted to multiple cellular compartments. *Biochimie* 89:1351-1365.
- Entelis N, Brandina I, Kamenski P, Krasheninnikov IA, Martin RP, 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 NS, Kieffer S, Kolesnikova OA, Martin RP, Tarassov IA. 1998. Structural requirements of tRNA^{Lys} for its import into yeast mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:2838-2843.
- Entelis NS, Kolesnikova OA, Dogan S, Martin RP, Tarassov IA. 2001. 5 S rRNA and tRNA import into human mitochondria. Comparison of in vitro requirements. *J Biol Chem* 276:45642-45653.
- Entelis NS, Krasheninnikov IA, Martin RP, Tarassov IA. 1996. Mitochondrial import of a yeast cytoplasmic tRNA (Lys): possible roles of aminoacylation and modified nucleosides in subcellular partitioning. *FEBS Lett* 384:38-42.
- Evans D, Marquez SM, Pace NR. 2006. RNase P: interface of the RNA and protein worlds. *Trends Biochem Sci* 31:333-341.

- F**ey J, Vermel M, Grienberger J, Marechal-Drouard L, Gualberto JM. 1999. Characterization of a plant mitochondrial active chromosome. *FEBS Lett* 458:124-128.
- Fey J, Weil JH, Tomita K, Cosset A, Dietrich A, Small I, Marechal-Drouard L. 2001. Editing of plant mitochondrial transfer RNAs. *Acta Biochim Pol* 48:383-389.

- Florentz C, Sohm B, Tryoen-Toth P, Putz J, Sissler M. 2003. Human mitochondrial tRNAs in health and disease. *Cell Mol Life Sci* 60:1356-1375.
- Font B, Eichenberger D, Goldschmidt D, Vial C. 1987. Interaction of creatine kinase and hexokinase with the mitochondrial membranes, and self-association of creatine kinase: crosslinking studies. *Mol Cell Biochem* 78:131-140.
- Forte M, Guy HR, Mannella CA. 1987. Molecular genetics of the VDAC ion channel: structural model and sequence analysis. *J Bioenerg Biomembr* 19:341-350.
- Francin M, Kaminska M, Kerjan P, Mirande M. 2002. The N-terminal domain of mammalian Lysyl-tRNA synthetase is a functional tRNA-binding domain. *J Biol Chem* 277:1762-1769.
- Frechin M, Senger B, Braye M, Kern D, Martin RP, Becker HD. 2009. Yeast mitochondrial Gln-tRNA(Gln) is generated by a GatFAB-mediated transamidation pathway involving Arc1p-controlled subcellular sorting of cytosolic GluRS. *Genes Dev* 23:1119-1130.
- Fujii S, Toriyama K. 2008. Genome barriers between nuclei and mitochondria exemplified by cytoplasmic male sterility. *Plant Cell Physiol* 49:1484-1494.

- Gabriel K, Milenkovic D, Chacinska A, Muller J, Guiard B, Pfanner N, Meisinger C. 2007. Novel mitochondrial intermembrane space proteins as substrates of the MIA import pathway. *J Mol Biol* 365:612-620.
- Galluzzi L, Kroemer G. 2007. Mitochondrial apoptosis without VDAC. *Nat Cell Biol* 9:487-489.
- Giege P, Brennicke A. 1999. RNA editing in Arabidopsis mitochondria effects 441 C to U changes in ORFs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:15324-15329.
- Giege P, Brennicke A. 2001. From gene to protein in higher plant mitochondria. *C R Acad Sci III* 324:209-217.
- Giege P, Heazlewood JL, Roessner-Tunali U, Millar AH, Fernie AR, Leaver CJ, Sweetlove LJ. 2003. Enzymes of glycolysis are functionally associated with the mitochondrion in Arabidopsis cells. *Plant Cell* 15:2140-2151.
- Giege R. 2008. Toward a more complete view of tRNA biology. *Nat Struct Mol Biol* 15:1007-1014.
- Gygi SP, Aebersold R. 2000. Mass spectrometry and proteomics. *Curr Opin Chem Biol* 4:489-494.
- Glover KE, Spencer DF, Gray MW. 2001. Identification and structural characterization of nucleus-encoded transfer RNAs imported into wheat mitochondria. *J Biol Chem* 276:639-648.
- Godbole A, Varghese J, Sarin A, Mathew MK. 2003. VDAC is a conserved element of death pathways in plant and animal systems. *Biochim Biophys Acta* 1642:87-96.
- Goncalves RP, Buzhynskyy N, Prima V, Sturgis JN, Scheuring S. 2007. Supramolecular assembly of VDAC in native mitochondrial outer membranes. *J Mol Biol* 369:413-418.
- Goswami S, Adhya S. 2006. The alpha-subunit of Leishmania F1 ATP synthase hydrolyzes ATP in presence of tRNA. *J Biol Chem* 281:18914-18917.
- Graham BH, Craigen WJ. 2005. Mitochondrial voltage-dependent anion channel gene family in *Drosophila melanogaster*: complex patterns of evolution, genomic organization, and developmental expression. *Mol Genet Metab* 85:308-317.

- Graham JW, Williams TC, Morgan M, Fernie AR, Ratcliffe RG, Sweetlove LJ. 2007. Glycolytic enzymes associate dynamically with mitochondria in response to respiratory demand and support substrate channeling. *Plant Cell* 19:3723-3738.
- Gray MW. 1999. Evolution of organellar genomes. *Curr Opin Genet Dev* 9:678-687.
- Sambrook JaR, DW. 2001. *Molecular Cloning*. NY, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Gray MW, Burger G, Lang BF. 2001. The origin and early evolution of mitochondria. *Genome Biol* 2:REVIEWS1018.
- Grosjean H, Droogmans L, Roovers M, Keith G. 2007. Detection of enzymatic activity of transfer RNA modification enzymes using radiolabeled tRNA substrates. *Methods Enzymol* 425:55-101.
- Grosjean H, Szweykowska-Kulinska Z, Motorin Y, Fasiolo F, Simos G. 1997. Intron-dependent enzymatic formation of modified nucleosides in eukaryotic tRNAs: a review. *Biochimie* 79:293-302.
- Gualberto JM, Lamattina L, Bonnard G, Weil JH, Grienemberger JM. 1989. RNA editing in wheat mitochondria results in the conservation of protein sequences. *Nature* 341:660-662.
- Guindon S, Gascuel O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology*.2003 52(5):696-704.
- Gygi SP, Aebersold R. 2000. Mass spectrometry and proteomics. *Curr Opin Chem Biol* 4:489-494.

- H**ammargren J, Salinas T, Marechal-Drouard L, Knorpp C. 2007. The pea mitochondrial nucleoside diphosphate kinase cleaves DNA and RNA. *FEBS Lett* 581:3507-3511.
- Hanson MR. 1991. Plant mitochondrial mutations and male sterility. *Annu Rev Genet* 25:461-486.
- Hatsugai N, Kuroyanagi M, Yamada K, Meshi T, Tsuda S, Kondo M, Nishimura M, Hara-Nishimura I. 2004. A plant vacuolar protease, VPE, mediates virus-induced hypersensitive cell death. *Science* 305:855-858.
- Heazlewood JL, Tonti-Filippini JS, Gout AM, Day DA, Whelan J, Millar AH. 2004. Experimental analysis of the Arabidopsis mitochondrial proteome highlights signaling and regulatory components, provides assessment of targeting prediction programs, and indicates plant-specific mitochondrial proteins. *Plant Cell* 16:241-256.
- Hedtke B, Legen J, Weihe A, Herrmann RG, Borner T. 2002. Six active phage-type RNA polymerase genes in *Nicotiana tabacum*. *Plant J* 30:625-637.
- Holden MJ, Colombini M. 1988. The mitochondrial outer membrane channel, VDAC, is modulated by a soluble protein. *FEBS Lett* 241:105-109.
- Holec S, Lange H, Kuhn K, Alioua M, Borner T, Gagliardi D. 2006. Relaxed transcription in Arabidopsis mitochondria is counterbalanced by RNA stability control mediated by polyadenylation and polynucleotide phosphorylase. *Mol Cell Biol* 26:2869-2876.
- Hoogenboom BW, Suda K, Engel A, Fotiadis D. 2007. The supramolecular assemblies of voltage-dependent anion channels in the native membrane. *J Mol Biol* 370:246-255.
- Hopper AK, Phizicky EM. 2003. tRNA transfers to the limelight. *Genes Dev* 17:162-180.

- K**aneko T, Suzuki T, Kapushoc ST, Rubio MA, Ghazvini J, Watanabe K, Simpson L. 2003. Wobble modification differences and subcellular localization of tRNAs in *Leishmania tarentolae*: implication for tRNA sorting mechanism. *Embo J* 22:657-667.

- Karp G. 2007. *Cell and Molecular Biology*.
- Kassavetis GA, Braun BR, Nguyen LH, Geiduschek EP. 1990. *S. cerevisiae* TFIIB is the transcription initiation factor proper of RNA polymerase III, while TFIIA and TFIIC are assembly factors. *Cell* 60:235-245.
- Kim M, Lim JH, Ahn CS, Park K, Kim GT, Kim WT, Pai HS. 2006. Mitochondria-associated hexokinases play a role in the control of programmed cell death in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell* 18:2341-2355.
- Kirino Y, Suzuki T. 2005. Human mitochondrial diseases associated with tRNA wobble modification deficiency. *RNA Biol* 2:41-44.
- Klingenberg M. 1989. Molecular aspects of the adenine nucleotide carrier from mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 270:1-14.
- Komori T, Ohta S, Murai N, Takakura Y, Kuraya Y, Suzuki S, Hiei Y, Imaseki H, Nitta N. 2004. Map-based cloning of a fertility restorer gene, Rf-1, in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant J* 37:315-325.
- Kotera E, Tasaka M, Shikanai T. 2005. A pentatricopeptide repeat protein is essential for RNA editing in chloroplasts. *Nature* 433:326-330.
- Koulintchenko M, Konstantinov Y, Dietrich A. 2003. Plant mitochondria actively import DNA via the permeability transition pore complex. *Embo J* 22:1245-1254.
- Koulintchenko M, Temperley RJ, Mason PA, Dietrich A, Lightowers RN. 2006. Natural competence of mammalian mitochondria allows the molecular investigation of mitochondrial gene expression. *Hum Mol Genet* 15:143-154.
- Kozjak-Pavlovic V, Ross K, Benlasfer N, Kimmig S, Karlas A, Rudel T. 2007. Conserved roles of Sam50 and metaxins in VDAC biogenesis. *EMBO Rep* 8:576-582.
- Kroemer G. 1998. The mitochondrion as an integrator/coordinator of cell death pathways. *Cell Death Differ* 5:547.
- Kruszka K, Barneche F, Guyot R, Ailhas J, Meneau I, Schiffer S, Marchfelder A, 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.
- Kuhn K, Weihe A, Borner T. 2005. Multiple promoters are a common feature of mitochondrial genes in *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Res* 33:337-346.
- Kujoth GC, Leeuwenburgh C, Prolla TA. 2006a. Mitochondrial DNA mutations and apoptosis in mammalian aging. *Cancer Res* 66:7386-7389.
- Kujoth GC, Leeuwenburgh C, Prolla TA. 2006b. Mitochondrial DNA mutations and apoptosis in mammalian aging. *Cancer Res* 66:7386-7389.
- Kumar R, Marechal-Drouard L, Akama K, Small I. 1996. Striking differences in mitochondrial tRNA import between different plant species. *Mol Gen Genet* 252:404-411.
- Kunzmann A, Brennicke A and Marchfelder A (1998) 5' End maturation and RNA editing have to precede tRNA 3' processing in plant mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95, 108-113.
- Laforest MJ, Delage L, Marechal-Drouard L. 2005. The T-domain of cytosolic tRNA^{Val}, an essential determinant for mitochondrial import. *FEBS Lett* 579:1072-1078.
- Laforest MJ, Roewer I, Lang BF. 1997. Mitochondrial tRNAs in the lower fungus *Spizellomyces punctatus*: tRNA editing and UAG 'stop' codons recognized as leucine. *Nucleic Acids Res* 25:626-632.
- Lang BF, Burger G, O'Kelly CJ, Cedergren R, Golding GB, Lemieux C, Sankoff D, Turmel M, Gray MW. 1997. An ancestral mitochondrial DNA resembling a eubacterial genome in miniature. *Nature* 387:493-497.

- LeBlanc AJ, Yermovsky-Kammerer AE, Hajduk SL. 1999. A nuclear encoded and mitochondrial imported dicistronic tRNA precursor in *Trypanosoma brucei*. *J Biol Chem* 274:21071-21077.
- Lee SM, Hoang MH, Han HJ, Kim HS, Lee K, Kim KE, Kim DH, Lee SY, Chung WS. 2009. Pathogen inducible voltage-dependent anion channel (AtVDAC) isoforms are localized to mitochondria membrane in *Arabidopsis*. *Mol Cells* 27:321-327.
- Lee WK, Thevenod F. 2006. A role for mitochondrial aquaporins in cellular life-and-death decisions? *Am J Physiol Cell Physiol* 291:C195-202.
- Levinger L, Morl M, Florentz C. 2004. Mitochondrial tRNA 3' end metabolism and human disease. *Nucleic Acids Res* 32:5430-5441.
- Lewis TM, Roberts ML, Bretag AH. 1994. Immunolabelling for VDAC, the mitochondrial voltage-dependent anion channel, on sarcoplasmic reticulum from amphibian skeletal muscle. *Neurosci Lett* 181:83-86.
- Li-Pook-Than J, Bonen L. 2006. Multiple physical forms of excised group II intron RNAs in wheat mitochondria. *Nucleic Acids Res* 34:2782-2790.
- Lin J, Wang Y, Wang G. 2006. Salt stress-induced programmed cell death in tobacco protoplasts is mediated by reactive oxygen species and mitochondrial permeability transition pore status. *J Plant Physiol* 163:731-739.
- Lister R, Carrie C, Duncan O, Ho LH, Howell KA, Murcha MW, Whelan J. 2007. Functional definition of outer membrane proteins involved in preprotein import into mitochondria. *Plant Cell* 19:3739-3759.
- Lister R, Hulett JM, Lithgow T, Whelan J. 2005. Protein import into mitochondria: origins and functions today (review). *Mol Membr Biol* 22:87-100.
- Liu MY, Colombini M. 1991. Voltage gating of the mitochondrial outer membrane channel VDAC is regulated by a very conserved protein. *Am J Physiol* 260:C371-374.
- Liu MY, Colombini M. 1992. Regulation of mitochondrial respiration by controlling the permeability of the outer membrane through the mitochondrial channel, VDAC. *Biochim Biophys Acta* 1098:255-260.
- Logan DC. 2006. Plant mitochondrial dynamics. *Biochim Biophys Acta* 1763:430-441.
- Lopez JL. 2007. Two-dimensional electrophoresis in proteome expression analysis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 849:190-202.
- M**ackenzie S, McIntosh L. 1999. Higher plant mitochondria. *Plant Cell* 11:571-586.
- Mannella CA. 1989. Structure of the mitochondrial outer membrane channel derived from electron microscopy of 2D crystals. *J Bioenerg Biomembr* 21:427-437.
- Mannella CA. 1997. Minireview: on the structure and gating mechanism of the mitochondrial channel, VDAC. *J Bioenerg Biomembr* 29:525-531.
- Mannella CA, Guo XW. 1990. Interaction between the VDAC channel and a polyanionic effector. An electron microscopic study. *Biophys J* 57:23-31.
- Marienfild J, Unseld M, Brennicke A. 1999. The mitochondrial genome of *Arabidopsis* is composed of both native and immigrant information. *Trends Plant Sci* 4:495-502.
- Martin G, Keller W. 2007. RNA-specific ribonucleotidyl transferases. *Rna* 13:1834-1849.
- Martin RP, Schneller JM, Stahl AJ, Dirheimer G. 1979. Import of nuclear deoxyribonucleic acid coded lysine-accepting transfer ribonucleic acid (anticodon C-U-U) into yeast mitochondria. *Biochemistry* 18:4600-4605.
- McDonald BM, Wydro MM, Lightowers RN, Lakey JH. 2009. Probing the orientation of yeast VDAC1 in vivo. *FEBS Lett* 583:739-742.
- Millar AH, Heazlewood JL, Kristensen BK, Braun HP, Moller IM. 2005. The plant mitochondrial proteome. *Trends Plant Sci* 10:36-43.

- Mireau H, Cosset A, Marechal-Drouard L, Fox TD, Small ID, Dietrich A. 2000. Expression of *Arabidopsis thaliana* mitochondrial alanyl-tRNA synthetase is not sufficient to trigger mitochondrial import of tRNA^{Ala} in yeast. *J Biol Chem* 275:13291-13296.
- Morl M, Marchfelder A. 2001. The final cut. The importance of tRNA 3'-processing. *EMBO Rep* 2:17-20.
- Muramatsu T, Yokoyama S, Horie N, Matsuda A, Ueda T, Yamaizumi Z, Kuchino Y, Nishimura S, Miyazawa T. 1988. A novel lysine-substituted nucleoside in the first position of the anticodon of minor isoleucine tRNA from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 263:9261-9267.

- N**egrutskii BS, Deutscher MP. 1991. Channeling of aminoacyl-tRNA for protein synthesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:4991-4995.
- Negrutskii BS, El'skaia AV. 2001. [Functional compartmentation of the translation apparatus and channeling of tRNA/aminoacyl-tRNA in cells of higher eukaryotes]. *Mol Biol (Mosk)* 35:702-707.
- Notsu Y, Masood S, Nishikawa T, Kubo N, Akiduki G, Nakazono M, Hirai A, 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.

- O**'Donoghue P, Luthey-Schulten Z. 2003. On the evolution of structure in aminoacyl-tRNA synthetases. *Microbiol Mol Biol Rev* 67:550-573.
- Okuda K, Myouga F, Motohashi R, Shinozaki K, Shikanai T. 2007. Conserved domain structure of pentatricopeptide repeat proteins involved in chloroplast RNA editing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:8178-8183.
- Ong SE, Pandey A. 2001. An evaluation of the use of two-dimensional gel electrophoresis in proteomics. *Biomol Eng* 18:195-205.

- P**aris Z, Rubio MA, Lukes J, Alfonzo JD. 2009. Mitochondrial tRNA import in *Trypanosoma brucei* is independent of thiolation and the Rieske protein. *Rna* 15:1398-1406.
- Park MY, Wu G, Gonzalez-Sulser A, Vaucheret H, Poethig RS. 2005. Nuclear processing and export of microRNAs in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:3691-3696.
- Pastorino JG, Hoek JB. 2003. Hexokinase II: the integration of energy metabolism and control of apoptosis. *Curr Med Chem* 10:1535-1551.
- Pastorino JG, Hoek JB. 2008. Regulation of hexokinase binding to VDAC. *J Bioenerg Biomembr* 40:171-182.
- Peng S, Blachly-Dyson E, Forte M, Colombini M. 1992. Large scale rearrangement of protein domains is associated with voltage gating of the VDAC channel. *Biophys J* 62:123-131; discussion 131-125.
- Perrin R, Meyer EH, Zaepfel M, Kim YJ, Mache R, Grienberger JM, Gualberto JM, Gagliardi D. 2004. Two exoribonucleases act sequentially to process mature 3'-ends of *atp9* mRNAs in *Arabidopsis* mitochondria. *J Biol Chem* 279:25440-25446.
- Perry AJ, Hulett JM, Likic VA, Lithgow T, Gooley PR. 2006. Convergent evolution of receptors for protein import into mitochondria. *Curr Biol* 16:221-229.

- Perry AJ, Rimmer KA, Mertens HD, Waller RF, Mulhern TD, Lithgow T, Gooley PR. 2008. Structure, topology and function of the translocase of the outer membrane of mitochondria. *Plant Physiol Biochem* 46:265-274.
- Picault N, Hodges M, Palmieri L, Palmieri F. 2004. The growing family of mitochondrial carriers in Arabidopsis. *Trends Plant Sci* 9:138-146.
- Popp B, Schmid A, Benz R. 1995. Role of sterols in the functional reconstitution of water-soluble mitochondrial porins from different organisms. *Biochemistry* 34:3352-3361.
- Preuss M, Ott M, Funes S, Luirink J, Herrmann JM. 2005. Evolution of mitochondrial oxa proteins from bacterial YidC. Inherited and acquired functions of a conserved protein insertion machinery. *J Biol Chem* 280:13004-13011.

- R**aczynska KD, Le Ret M, Rurek M, Bonnard G, Augustyniak H, Gualberto JM. 2006. Plant mitochondrial genes can be expressed from mRNAs lacking stop codons. *FEBS Lett* 580:5641-5646.
- Remacle C, Baurain D, Cardol P, Matagne RF. 2001. Mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* deficient in mitochondrial complex I: characterization of two mutations affecting the *nd1* coding sequence. *Genetics* 158:1051-1060.
- Reymann S, Haase W, Krick W, Burckhardt G, Thinner FP. 1998. Endosomes: another extra-mitochondrial location of type-1 porin/voltage-dependent anion-selective channels. *Pflugers Arch* 436:478-480.
- Richly E, Chinnery PF, Leister D. 2003. Evolutionary diversification of mitochondrial proteomes: implications for human disease. *Trends Genet* 19:356-362.
- Rinehart J, Krett B, Rubio MA, Alfonzo JD, Soll D. 2005. *Saccharomyces cerevisiae* imports the cytosolic pathway for Gln-tRNA synthesis into the mitochondrion. *Genes Dev* 19:583-592.
- Roger AJ, Silberman JD. 2002. Cell evolution: mitochondria in hiding. *Nature* 418:827-829.
- Roosens N, Al Bitar F, Jacobs M, Homble F. 2000. Characterization of a cDNA encoding a rice mitochondrial voltage-dependent anion channel and its gene expression studied upon plant development and osmotic stress. *Biochim Biophys Acta* 1463:470-476.
- Rostovtseva TK, Sheldon KL, Hassanzadeh E, Monge C, Saks V, Bezrukov SM, Sackett DL. 2008. Tubulin binding blocks mitochondrial voltage-dependent anion channel and regulates respiration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:18746-18751.
- Rubio MA, Rinehart JJ, Krett B, Duvezin-Caubet S, Reichert AS, Soll D, Alfonzo JD. 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.
- Rusconi CP, Cech TR. 1996a. The anticodon is the signal sequence for mitochondrial import of glutamine tRNA in *Tetrahymena*. *Genes Dev* 10:2870-2880.
- Rusconi CP, Cech TR. 1996b. Mitochondrial import of only one of three nuclear-encoded glutamine tRNAs in *Tetrahymena thermophila*. *Embo J* 15:3286-3295.

- S**alinas T, Duchene AM, Delage L, Nilsson S, Glaser E, Zaepfel M, 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, Schaeffer C, Marechal-Drouard L, Duchene AM. 2005. Sequence dependence of tRNA(Gly) import into tobacco mitochondria. *Biochimie* 87:863-872.
- Sampson MJ, Lovell RS, Craigen WJ. 1997. The murine voltage-dependent anion channel gene family. Conserved structure and function. *J Biol Chem* 272:18966-18973.

- Santoni V, Molloy M, Rabilloud T. 2000. Membrane proteins and proteomics: un amour impossible? *Electrophoresis* 21:1054-1070.
- Scheffler I. 1999. *Mitochondria*: John Wiley & Sons.
- Schein SJ, Colombini M, Finkelstein A. 1976. Reconstitution in planar lipid bilayers of a voltage-dependent anion-selective channel obtained from paramecium mitochondria. *J Membr Biol* 30:99-120.
- Schmitz-Linneweber C, Small I. 2008. Pentatricopeptide repeat proteins: a socket set for organelle gene expression. *Trends Plant Sci* 13:663-670.
- Schneider A, Marechal-Drouard L. 2000. Mitochondrial tRNA import: are there distinct mechanisms? *Trends Cell Biol* 10:509-513.
- Schwarzer C, Barnikol-Watanabe S, Thinnes FP, Hilschmann N. 2002. Voltage-dependent anion-selective channel (VDAC) interacts with the dynein light chain Tctex1 and the heat-shock protein PBP74. *Int J Biochem Cell Biol* 34:1059-1070.
- Shao L, Kinnally KW, Mannella CA. 1996. Circular dichroism studies of the mitochondrial channel, VDAC, from *Neurospora crassa*. *Biophys J* 71:778-786.
- Sherrer RL, Yermovsky-Kammerer AE, Hajduk SL. 2003. A sequence motif within trypanosome precursor tRNAs influences abundance and mitochondrial localization. *Mol Cell Biol* 23:9061-9072.
- Shoshan-Barmatz V, Hadad N, Feng W, Shafir I, Orr I, Varsanyi M, Heilmeyer LM. 1996. VDAC/porin is present in sarcoplasmic reticulum from skeletal muscle. *FEBS Lett* 386:205-210.
- Shoshan-Barmatz V, Keinan N, Zaid H. 2008. Uncovering the role of VDAC in the regulation of cell life and death. *J Bioenerg Biomembr* 40:183-191.
- Silberman JD, Simpson AG, Kulda J, Cepicka I, Hampl V, Johnson PJ, Roger AJ. 2002. Retortamonad flagellates are closely related to diplomonads--implications for the history of mitochondrial function in eukaryote evolution. *Mol Biol Evol* 19:777-786.
- Simamura E, Shimada H, Hatta T, Hirai K. 2008. Mitochondrial voltage-dependent anion channels (VDACs) as novel pharmacological targets for anti-cancer agents. *J Bioenerg Biomembr* 40:213-217.
- Small I, Peeters N, Legeai F, Lurin C. 2004. Predotar: A tool for rapidly screening proteomes for N-terminal targeting sequences. *Proteomics* 4:1581-1590.
- Smirnov A, Tarassov I, Mager-Heckel AM, Letzelter M, Martin RP, Krasheninnikov IA, Entelis N. 2008. Two distinct structural elements of 5S rRNA are needed for its import into human mitochondria. *Rna* 14:749-759.
- Smith MK, Day DA, Whelan J. 1994. Isolation of a novel soybean gene encoding a mitochondrial ATP synthase subunit. *Arch Biochem Biophys* 313:235-240.
- Smith MD, Petrak M, Boucher PD, Barton KN, Carter L, Reddy G, Blachly-Dyson E, Forte M, Price J, Verner K, et al. 1995. Lysine residues at positions 234 and 236 in yeast porin are involved in its assembly into the mitochondrial outer membrane. *J Biol Chem* 270:28331-28336.
- Söll D, and RajBhandary, U. 1995. *tRNA : Structure, Biosynthesis and Function*. Washington: D.C.: ASM Press.
- Song J, Midson C, Blachly-Dyson E, Forte M, Colombini M. 1998. The sensor regions of VDAC are translocated from within the membrane to the surface during the gating processes. *Biophys J* 74:2926-2944.
- Stojanovski D, Muller JM, Milenkovic D, Guiard B, Pfanner N, Chacinska A. 2008. The MIA system for protein import into the mitochondrial intermembrane space. *Biochim Biophys Acta* 1783:610-617.

- Struglics A, Fredlund KM, Rasmusson AG, Møller IM. The presence of a short redox chain in the membrane of intact potato tuber peroxisomes and the association of malate dehydrogenase with the peroxisomal membrane. *Physiol Plant*. 1993;88:19–28.
- Sunderhaus S, Eubel H, Braun HP. 2007. Two-dimensional blue native/blue native polyacrylamide gel electrophoresis for the characterization of mitochondrial protein complexes and supercomplexes. *Methods Mol Biol* 372:315-324.
- Suyama Y. 1967. The origins of mitochondrial ribonucleic acids in *Tetrahymena pyriformis*. *Biochemistry* 6:2829-2839.
- Sylvestre J, Vialette S, Margeot A, Jacq C, Dujardin G and Corral-Debrinski M. 2003a. The role of the 3' untranslated region in mRNA sorting to the vicinity of mitochondria is conserved from yeast to human cells. *Mol Biol Cell* 14 : 3848-3856.
- Tan TH, Pach R, Crausaz A, Ivens A, Schneider A. 2002. tRNAs in *Trypanosoma brucei*: genomic organization, expression, and mitochondrial import. *Mol Cell Biol* 22:3707-3717.
- Tan W, Colombini M. 2007. VDAC closure increases calcium ion flux. *Biochim Biophys Acta* 1768:2510-2515.
- Tarassov I, Entelis N, Martin RP. 1995a. An intact protein translocating machinery is required for mitochondrial import of a yeast cytoplasmic tRNA. *J Mol Biol* 245:315-323.
- Tarassov I, Entelis N, Martin RP. 1995b. Mitochondrial import of a cytoplasmic lysine-tRNA in yeast is mediated by cooperation of cytoplasmic and mitochondrial lysyl-tRNA synthetases. *Embo J* 14:3461-3471.
- Tarassov I, Kamenski P, Kolesnikova O, Karicheva O, Martin RP, Krasheninnikov IA, Entelis N. 2007. Import of nuclear DNA-encoded RNAs into mitochondria and mitochondrial translation. *Cell Cycle* 6:2473-2477.
- Tateda C, Yamashita K, Takahashi F, Kusano T, Takahashi Y. 2009. Plant voltage-dependent anion channels are involved in host defense against *Pseudomonas cichorii* and in Bax-induced cell death. *Plant Cell Rep* 28:41-51.
- Taylor RW, Turnbull DM. 2005. Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nat Rev Genet* 6:389-402.
- Thinnes FP, Gotz H, Kayser H, Benz R, Schmidt WE, Kratzin HD, Hilschmann N. 1989. [Identification of human porins. I. Purification of a porin from human B-lymphocytes (Porin 31HL) and the topochemical proof of its expression on the plasmalemma of the progenitor cell.]. *Biol Chem Hoppe Seyler* 370:1253-1264.
- Thomas L, Blachly-Dyson E, Colombini M, Forte M. 1993. Mapping of residues forming the voltage sensor of the voltage-dependent anion-selective channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:5446-5449.
- Thomas SG, Franklin-Tong VE. 2004. Self-incompatibility triggers programmed cell death in Papaver pollen. *Nature* 429:305-309.
- Thornberry NA, Lazebnik Y. 1998. Caspases: enemies within. *Science* 281:1312-1316.
- Trifunovic A, Wredenberg A, Falkenberg M, Spelbrink JN, Rovio AT, Bruder CE, Bohlooly YM, Gidlof S, Oldfors A, Wibom R, Tornell J, Jacobs HT, Larsson NG. 2004. Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature* 429:417-423.
- Triphan J, Aumuller G, Brandenburger T, Wilhelm B. 2007. Localization and regulation of plasma membrane Ca(2+)-ATPase in bovine spermatozoa. *Eur J Cell Biol* 86:265-273.

Triphan X, Menzel VA, Petrunkina AM, Cassara MC, Wemheuer W, Hinsch KD, Hinsch E. 2008. Localisation and function of voltage-dependent anion channels (VDAC) in bovine spermatozoa. *Pflugers Arch* 455:677-686.

Troll H, Malchow D, Muller-Taubenberger A, Humbel B, Lottspeich F, Ecke M, Gerisch G, Schmid A, Benz R. 1992. Purification, functional characterization, and cDNA sequencing of mitochondrial porin from *Dictyostelium discoideum*. *J Biol Chem* 267:21072-21079.

Ujwal R, Cascio D, Colletier JP, Faham S, Zhang J, Toro L, Ping P, Abramson J. 2008. The crystal structure of mouse VDAC1 at 2.3 Å resolution reveals mechanistic insights into metabolite gating. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:17742-17747.

Ulmasov B, Folk W. 1995. Analysis of the role of 5' and 3' flanking sequence elements upon in vivo expression of the plant tRNATrp genes. *Plant Cell* 7:1723-1734.

Ulmasov B, Topin A, Chen Z, He SH, Folk WR. 1998. Identity elements and aminoacylation of plant tRNATrp. *Nucleic Acids Res* 26:5139-5141.

Unsel M, Marienfeld JR, Brandt P, Brennicke A. 1997. The mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana* contains 57 genes in 366,924 nucleotides. *Nat Genet* 15:57-61.

Uyttewaal M, Mireau H, Rurek M, Hammani K, Arnal N, Quadrado M, Giege P. 2008. PPR336 is associated with polysomes in plant mitochondria. *J Mol Biol* 375:626-636.

Vander Heiden MG, Chandel NS, Li XX, Schumacker PT, Colombini M, Thompson CB. 2000. Outer mitochondrial membrane permeability can regulate coupled respiration and cell survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:4666-4671.

Vander Heiden MG, Li XX, Gottleib E, Hill RB, Thompson CB, Colombini M. 2001. Bcl-xL promotes the open configuration of the voltage-dependent anion channel and metabolite passage through the outer mitochondrial membrane. *J Biol Chem* 276:19414-19419.

Vinogradova E, Salinas T, Cognat V, Remacle C, Marechal-Drouard L. 2009. Steady-state levels of imported tRNAs in *Chlamydomonas* mitochondria are correlated with both cytosolic and mitochondrial codon usages. *Nucleic Acids Res* 37:1521-1528.

Voet D, Voet, J.G. 1990. *Biochemistry*. New York.

Voet D, Voet, J.G. 2002. *Biochemistry*. New York.

Wagner K, Gebert N, Guiard B, Brandner K, Truscott KN, Wiedemann N, Pfanner N, Rehling P. 2008. The assembly pathway of the mitochondrial carrier translocase involves four preprotein translocases. *Mol Cell Biol* 28:4251-4260.

Wandrey M, Trevaskis B, Brewin N, Udvardi MK. 2004. Molecular and cell biology of a family of voltage-dependent anion channel porins in *Lotus japonicus*. *Plant Physiol* 134:182-193.

Weber-Lotfi F, Ibrahim N, Boesch P, Cosset A, Konstantinov Y, Lightowlers RN, Dietrich A. 2009. Developing a genetic approach to investigate the mechanism of mitochondrial competence for DNA import. *Biochim Biophys Acta* 1787:320-327.

Yermovsky-Kammerer AE, Hajduk SL. 1999. In vitro import of a nuclear encoded tRNA into the mitochondrion of *Trypanosoma brucei*. *Mol Cell Biol* 19:6253-6259.

- Yi L, Dalbey RE. 2005. Oxa1/Alb3/YidC system for insertion of membrane proteins in mitochondria, chloroplasts and bacteria (review). *Mol Membr Biol* 22:101-111.
- Yogev O, Karniely S, Pines O. 2007. Translation-coupled translocation of yeast fumarase into mitochondria in vivo. *J Biol Chem* 282:29222-29229.
- Young MJ, Bay DC, Hausner G, Court DA. 2007. The evolutionary history of mitochondrial porins. *BMC Evol Biol* 7:31.
- Yu WH, Forte M. 1996. Is there VDAC in cell compartments other than the mitochondria? *J Bioenerg Biomembr* 28:93-100.
- Yu WH, Wolfgang W, Forte M. 1995. Subcellular localization of human voltage-dependent anion channel isoforms. *J Biol Chem* 270:13998-14006.
- Yu XH, Perdue TD, Heimer YM, Jones AM. 2002. Mitochondrial involvement in tracheary element programmed cell death. *Cell Death Differ* 9:189-198.
- Yukawa Y, Sugita M, Choisine N, Small I, Sugiura M. 2000. The TATA motif, the CAA motif and the poly(T) transcription termination motif are all important for transcription re-initiation on plant tRNA genes. *Plant J* 22:439-447.
- Z**amzami N, Kroemer G. 2001. The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:67-71.
- Zhang XP, Glaser E. 2002. Interaction of plant mitochondrial and chloroplast signal peptides with the Hsp70 molecular chaperone. *Trends Plant Sci* 7:14-21.
- Zizi M, Forte M, Blachly-Dyson E, Colombini M. 1994. NADH regulates the gating of VDAC, the mitochondrial outer membrane channel. *J Biol Chem* 269:1614-1616.
- Zizi M, Thomas L, Blachly-Dyson E, Forte M, Colombini M. 1995. Oriented channel insertion reveals the motion of a transmembrane beta strand during voltage gating of VDAC. *J Membr Biol* 144:121-129.