

Université de Montréal

La RNase P mitochondriale chez *Neurospora crassa*

par :

Ioana Minoiu

Département de biochimie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître ès Sciences (M. Sc) en
Biochimie option Cheminement libre

Décembre, 2012

© Ioana Minoiu

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

La RNase P mitochondriale chez *Neurospora crassa*

Présenté par :

Ioana Minoiu

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Daniel Zenklusen

.....
président-rapporteur

Dr Franz B. Lang

.....
directeur de recherche

Dr Nikolaus Heveker

.....
membre du jury

Résumé

La Ribonucléase P (RNase P) est une enzyme principalement reconnue pour sa participation à la maturation en 5' des ARN de transfert (ARNt). Cependant, d'autres substrats sont reconnus par l'enzyme. En général, la RNase P est composée d'une sous-unité ARN (le P-ARN, codé par le gène *rnpB*) qui porte le centre actif de l'enzyme et d'une ou de plusieurs sous-unités protéiques (la P-protéine).

Les P-ARN chez toutes les bactéries, la majorité des archéobactéries et dans le génome nucléaire de la plupart des eucaryotes, possèdent généralement une structure secondaire très conservée qui inclut le noyau (P1-P4); l'hélice P4 constitue le site catalytique de l'enzyme et l'hélice P1 apparie les extrémités du P-ARN en stabilisant sa structure globale. Les P-ARN mitochondriaux sont souvent moins conservés et difficiles à découvrir. Dans certains cas, les seules régions de structure primaire qui restent conservées sont celles qui définissent le P4 et le P1.

Pour la détection des gènes *rnpB*, un outil de recherche bioinformatique, basé sur la séquence et le profil de structure secondaire, a été développé dans le laboratoire. Cet outil permet le dépistage de toutes les séquences eucaryotes (nucléaires et mitochondriales) du gène avec une très grande confiance (basée sur une valeur statistique, E-value). Chez les champignons, plusieurs ascomycètes encodent un gène *rnpB* dans leur génome mitochondrial y compris tous les membres du genre d'*Aspergillus*. Cependant, chez les espèces voisines, *Neurospora crassa*, *Podospora anserina* et *Sordaria macrospora*, une version mitochondriale de ce gène n'existe pas. Au lieu de cela, elles contiennent deux copies nucléaires du gène, légèrement différentes en taille et en contenu nucléotidique.

Mon projet a été établi dans le but d'éclaircir l'évolution de la RNase P mitochondriale (mtRNase P) chez ces trois espèces voisines d'*Aspergillus*.

En ce qui concerne les résultats, des modèles de structures secondaires pour les transcrits de ces gènes ont été construits en se basant sur la structure consensus universelle de la sous-unité ARN de la RNase P. Pour les trois espèces, par la comparaison de ces modèles, nous avons établi que les deux copies nucléaires du gène *rnpB* sont assez distinctes en séquence et en structure pour pouvoir y penser à une spécialisation de fonction de la RNase P. Chez *N. crassa*, les deux P-ARN sont modifiés

probablement par une coiffe et les extrémités 5', 3' sont conformes à nos modèles, ayant un P1 allongé. Encore chez *N. crassa*, nous avons constaté que les deux copies sont transcrites au même niveau dans le cytoplasme et que la plus petite et la plus stable d'entre elles (Nc1) se retrouve dans l'extrait matriciel mitochondrial. Lors du suivi du P-ARN dans diverses sous-fractions provenant de la matrice mitochondriale soluble, Nc1 est associée avec l'activité de la RNase P. La caractérisation du complexe protéique, isolé à partir de la fraction active sur un gel non dénaturant, révèle qu'il contient au moins 87 protéines, 73 d'entre elles ayant déjà une localisation mitochondriale connue. Comme chez la levure, les protéines de ce complexe sont impliquées dans plusieurs fonctions cellulaires comme le processing de l'ADN/ARN, le métabolisme, dans la traduction et d'autres (par exemple : la protéolyse et le repliement des protéines, ainsi que la maintenance du génome mitochondrial). Pour trois protéines, leur fonction est non déterminée.

Mots-clés: ribozyme, ribonucléoprotéine, ascomycètes, *N. crassa*, mtRNase P, processus mitochondriaux, maturation des précurseurs des ARNt.

Abstract

Ribonuclease P (RNase P) is an endonuclease that cleaves 5'- leader sequences from tRNA precursors and a few other small RNAs. In most cases, the enzyme is a ribonucleo-protein complex (ribozyme), containing an RNA subunit (P-RNA; encoded by the *rnpB* gene) that carries the active centre of the enzyme, plus one or more protein subunits.

P-RNAs in Bacteria, Eukarya and Archaea have a highly conserved secondary structure including the core P1 and P4 helices. P4 forms the catalytic site of the ribozyme, and P1 pairs the RNA termini, stabilizing overall structure and protecting from nuclease degradation. For processing of mitochondrial (mt) tRNAs, certain eukaryotic species (e.g., *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus nidulans*) have separate mtDNA-encoded P-RNAs (of bacterial origin). Mt P-RNAs are often less conserved, and difficult to discover.

To identify *rnpB* genes, we have developed a search tool based on sequence plus secondary structure profiles. It predicts all known eukaryotic (nuclear and organellar) *rnpB* genes with high confidence (based on E-values). In fungi, many ascomycetes encode a mitochondrial *rnpB* gene, including all members of *Aspergillus*. Yet, the closely related *Neurospora crassa*, *Podospira anserina* and *Sordaria macrospora* lack an mtDNA-encoded gene version. Instead, they contain two nuclear gene copies with slightly different sequences.

My project aims to elucidate the evolution of mitochondrial RNase P in these three closely related species.

We have established secondary structure models based on comparisons with the universal minimum consensus secondary structure for all nuclear gene mtP-RNAs copies in all three species. By comparison of these secondary structure models, we have established that the two nuclear copies of *rnpB* gene are quite distinct in sequence and structure, suggesting a specialization of function. In *N. crassa*, both P-RNAs are modified most likely by capping, and 5'- 3' termini perfectly conform to P-RNA structure models that have an elongated P1 helical pairing. Furthermore, we find that the two nuclear copies of *rnpB* gene are present at about the same level in the cytoplasm,

and that the shorter form of P-RNA (Nc1) translocates into the (soluble) mitochondrial matrix. When tracing P-RNA in different mitochondrial sub-fractions of a native gel, the presence of Nc1 and mitochondrial RNase P activity are associated. A proteomics characterization of a P-RNA complex isolated by native gel electrophoresis reveals that it contains at least 87 proteins, 73 of which are of known mitochondrial localization. Like in yeast, the complex contains proteins potentially involved in other DNA/RNA processing activities, but also in translation, in metabolism, and in protein folding. Only three proteins are of unknown function.

Keywords: ribozyme, ribonucleoprotein, ascomycetes, *N. crassa*, mtRNase P, mitochondrial processes, maturation of tRNA precursors.

Table de matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	v
Table de matières.....	vii
Liste des tableaux.....	x
Liste des figures.....	xi
Liste des abréviations.....	xiii
Remerciements.....	xv
Chapitre I : Introduction.....	1
I. 1 Les fonctions cellulaires de la RNase P.....	2
I. 2 La RNase P: similitudes / différences fonctionnelles et structurales à travers les domaines phylogénétiques.....	7
I. 3 La mtRNase P.....	12
I. 3. 1 Le gène <i>rnpB</i> , codant pour le P-ARN de la RNase P, chez les mitochondries....	12
I. 3. 2 La mtRNase P classique: une ribonucléoprotéine.....	15
I. 3. 3 La mtRNase P sous forme «proteinaceous».....	16
I. 3. 3. 1 La possibilité de coexistence des deux formes de la mtRNase P chez l'humain.....	17
I. 3. 4 La mtRNase P chez les ascomycètes.....	18
I. 3. 4. 1 La mtRNase P chez les ascomycètes <i>N. crassa</i> , <i>P. anserina</i> et <i>S. macrospora</i>	20
I. 4 Les évidences sur le transport des P-ARN nucléaires de la RNase P dans la mitochondrie.....	21
I. 4. 1 La biogenèse des transcrits des P-ARN nucléaires de la RNase P.....	21
I. 4. 2 La translocation du noyau vers le cytoplasme du P-ARN nucléaire de la RNase P.....	26
I. 4. 3 L'importation du composant P-ARN nucléaire de la RNase P dans la mitochondrie.....	26
I. 5. L'hypothèse et les objectifs du projet.....	30

Chapitre II : Matériels et méthodes.....	31
II. 1 La culture de <i>N. crassa</i> et isolation de mitochondries pures.....	32
II. 1. 1 La culture de <i>N. crassa</i>	32
II. 1. 2 La purification des mitochondries.....	32
II. 2 La séparation de la matrice mitochondriale soluble et des membranes mitochondriales.....	33
II. 3 Le PNGS PAGE (Preparative Native Gel Stripe PAGE)/ le gel préparatif non dénaturant: gradient discontinu de polyacrylamide intercalé avec glycérol.....	36
II. 4 La préparation «in vitro» et marquage radioactif du substrat pré-ARNt ^{ProlineCCA}	38
II. 5 Le test d'activité de la mtRNase P.....	38
II. 6 La préparation du gel non dénaturant de polyacrylamide.....	39
II. 7 L'analyse de la composition du complexe protéique par LC MS/MS.....	40
II. 8 L'extraction des ARN.....	40
II. 8. 1 L'obtention des ARN non traités par TAP, non circularisés, juste traités à la DNase (ARN _{nd}).....	40
II. 8. 2 L'obtention des ARN non traités par TAP, circularisés et traités à la DNase (ARN _{nd}).....	41
II. 8. 3 L'obtention des ARN traités par TAP, circularisés et traités à la DNase (ARN _{did}).....	41
II. 9 Le RT PCR.....	42
II. 9. 1 La RT.....	42
II. 9. 2 Le PCR.....	42
Chapitre III : Résultats.....	48
III. 1 La caractérisation des copies nucléaires du gène <i>rnpB</i> , Nc1/Nc2, Pa1/Pa2 et Sm1/Sm2, retrouvées par la recherche <i>in silico</i>	50
III. 1. 1 La modélisation de la structure secondaire des ARN.....	50

III. 1. 2. L'expression de Nc1 et Nc2 chez <i>N. crassa</i>	57
III. 1. 3 La cartographie de Nc1 et Nc2.....	59
III. 1. 3. 1 La protection en 5' chez Nc1 et Nc2.....	59
III. 1. 3. 2 La présence des formes fonctionnelles chez Nc1 et Nc2.....	60
III. 2. 1 La localisation des transcrits Nc1 et Nc2.....	66
III. 2. 2 L'isolement de l'activité RNase P dans la matrice soluble mitochondriale.....	66
III. 2. 2. 1 L'association de la copie nucléaire Nc1 avec le complexe protéique actif....	67
III. 2. 2. 2 La composition protéique du complexe actif de la mtRNase P.....	67
Chapitre IV: Discussion.....	86
IV. 1 La caractérisation des Nc1/Nc2, Pa1/Pa2 et Sm1/Sm2, pointe vers une spécialisation de fonction de la RNase P.....	87
IV. 1. 1 Le processing de transcrits Nc1 et Nc2.....	88
IV. 2 La copie Nc1 est associé avec l'activité de la mtRNase P chez <i>N. crassa</i>	92
IV. 3 L'activité de la mtRNase P chez <i>N. crassa</i> est associée avec plusieurs autres fonctions cellulaires.....	93
IV. 3. 1 La mtRNase P chez <i>N. crassa</i> : une forme probablement attachée aux membranes.....	97
Conclusions et perspectives.....	99
Références.....	101
Annexes.....	110

Liste des tableaux

Tableau I : Analyse par séquençage, après le clonage des produits RT PCR (les fragments a et c) obtenus à partir des ARN décoiffés et circularisés de Nc1 et Nc2.....	63
Tableau II. Composition protéique du complexe mitochondrial actif de la RNase P chez <i>N. crassa</i>	74
Tableau III : Liste de protéines présentes dans le complexe mtRNase P chez <i>N. crassa</i> , dans celui de <i>S. cerevisiae</i> et/ou dans les fractions enrichies en activité mtRNase P chez <i>Aspergillus</i> et l'humain.....	110
Tableau IV. Analyse protéique comparative faite entre le complexe mtRNase P chez <i>N.crassa</i> , le complexe actif retrouvé chez <i>S. cerevisiae</i> et les fractions enrichies en activité mtRNase P chez <i>Aspergillus</i> et l'humain.....	114

Liste des figures

Figure I. 1 Réaction de catalyse du pré-ARNt par la RNase P bactérienne.....	4
Figure I. 2 Résumé des fonctions cellulaires de la RNase P chez les bactéries et les eucaryotes.....	5
Figure I. 3 Régions de séquence primaire de l'ARN de la RNase P, conservées tout au long de l'évolution.....	8
Figure I. 4 Structure secondaire consensus de l'ARN de la RNase P pour les trois règnes de la vie (Archaea, Bacteria et Eukarya).....	9
Figure I. 5 Évolution de la RNase P dans les trois règnes de la vie (Archaea, Bacteria et Eukarya – la partie nucléaire).....	11
Figure I. 6. Occurrence du gène <i>rnpB</i> mitochondrial.....	14
Figure I. 7 Modèles des structures secondaires du consensus bactérien et des P-ARN de la mtRNase P chez les ascomycètes <i>A. nidulans</i> , <i>S. cerevisiae</i> et <i>Saccharomyces exiguus</i>	19
Figure I. 8 Différentes architectures de promoteurs et voies de biosynthèse pour les gènes transcrits par Pol III (les gènes de classe III).....	24
Figure I. 9 La PNPase facilite l'importation des petits ARN nucléaires dans la matrice mitochondriale humaine.....	29
Figure II. 1 Schéma expérimentale de l'étude chez <i>N. crassa</i>	34
Figure II. 2 Isolation de mitochondries pures à partir de l'extrait mitochondrial brut....	35
Figure II. 3 PNGS PAGE (Preparative Native Gel Stripe PAGE) / gel préparatif non dénaturant: gradient discontinu de polyacrylamide intercalé avec glycérol.....	37
Figure II. 4 Amorces internes communes désignées pour vérifier l'expression et la localisation des transcrits Nc1 et Nc2, chez <i>N. crassa</i>	46
Figure II. 5 Amorces spécifiques à Nc1 et Nc2, désignées pour vérifier l'intégrité des extrémités 5' et 3' de transcrits de ces copies chez <i>N. crassa</i>	47

Figure III. 1 Modèle de structure secondaire pour les deux P-ARN de la RNase P, Nc1 et Nc2, chez <i>N. crassa</i>	53
Figure III. 2 Modèle de structure secondaire pour les deux P-ARN de la RNase P, Pa1 et Pa2, chez <i>P. anserina</i>	54
Figure III. 3 Modèle de structure secondaire pour les deux P-ARN de la RNase P, Sm1 et Sm2, chez <i>S. macrospora</i>	55
Figure III. 4 Modèle de la structure secondaire pour le P-ARN de la RNase P nucléaire, AN _{nuc} , chez <i>A. nidulans</i>	56
Figure III. 5 Présence des transcrits Nc1 et Nc2 dans l'ARN total chez <i>N. crassa</i>	58
Figure III. 6 Protection à l'extrémité 5' pour les transcrits Nc1 et Nc2.....	62
Figure III. 6. 1 Modèle illustrant la présence des molécules fonctionnelles et non fonctionnelles chez Nc1 et Nc2 dans l'ARN total de <i>N. crassa</i>	64
Figure III. 7 Localisation des transcrits Nc1 et Nc2 dans le lysat cytoplasmique vs l'extrait mitochondrial soluble.....	69
Figure III. 8 Localisation des extraits Nc1 et Nc2, dans différents compartiments mitochondriaux et dans les fractions mitochondriales F1-F10.....	70
Figure III. 9 Test d'activité de la RNase P, fait sur les fractions purifiées par PNGS PAGE à partir de l'extrait matriciel mitochondrial chez <i>N. crassa</i>	71
Figure III. 10 Purification du complexe protéique mitochondrial actif de la RNase P chez <i>N. crassa</i>	72
Figure III. 11 Sommaire de fonctions biologiques, retrouvées au niveau du complexe mitochondrial actif de la RNase P chez <i>N. crassa</i>	73
Figure IV. 1. Éléments transcriptionnels putatifs – la boîte TATA et le site de terminaison de la transcription (une suite de T génératrice d'une queue poly U) – présents dans les séquences génomiques de Nc1 et Nc2.....	91

Liste des abréviations

A	Adénine
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ADNmt	ADN mitochondrial
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messager
ARN M1	Sous-unité ARN autocatalytique de la RNase P d' <i>E. coli</i>
ARNr	ARN ribosomique
ARNt	ARN de transfert
ATP	Adenosine triphosphate
BN-PAGE	Gel non dénaturant de polyacrylamide
BSA	Albumine sérum bovin
C	Cytosine
CTP	Cytidine triphosphate
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
G	Guanine
GTP	Guanosine triphosphate
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton

LC MS/MS	Chromatographie en phase liquide couplée avec la spectrométrie de masse en tandem (SM/SM)
M	Molaire
mM	Millimolaire
mtRNase P	RNase P mitochondriale
nt	Nucléotides
P-ARN	Sous-unité ARN de la RNase P
P-ARNmt	Sous-unité ARN de la RNase P mitochondriale
pb	Paire de base
PEG	Polyéthylène glycol
pmol	Picomole
PMSF	Fluorure de phenylméthanesulfonyle
Pol I et Pol III	ARN polymérases I et III
P-Protéine	Sous-unités protéiques de la RNase P
pré-ARNt	Précurseur de l'ARNt
pré-ARNt ^{ProlineCCA}	Pré-ARNt Proline de <i>Reclinomonas americana</i> avec un CCA en 3'
RNase P	Ribonucléase P
RT PCR	Transcription inverse suivie par la réaction en chaîne par polymérisation
s	Secondes
SDS	Dodécylsulfate de sodium
UTP	Uridine triphosphate
U	Uracile et/ou unité
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-galactopyranoside
μCi	Microcurie

Remerciements

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à mon directeur de recherche, Dr Franz B. Lang, pour m'avoir orientée par ses nombreux conseils et commentaires tout au long de ce projet.

Ma gratitude va également à Lise Forget et Rachid Daoud, pour leur amitié, leur soutien moral et les discussions animées que nous avons partagées depuis mon arrivée au laboratoire. Je veux également les remercier pour leur aide, leurs conseils techniques et les suggestions qu'ils m'ont fournis durant ces années. Je souhaite aussi dire un grand merci à Lise pour les améliorations apportées à ce mémoire.

Mon affection et ma grande appréciation vont aussi à Sophie Breton, Sandrine Moreira Rousseau, Natacha Beck, Henner Brinckmann, Jean-François Thérroux, Matus Valach, Mohamed Aoulad Aissa, Pasha Javadi Khomami, Elias Seif, Sahar Parto, Simon Laurin-Lemay et Raphael Poujol pour leur intérêt constant à mes recherches, pour leur compagnie et pour leur amitié que j'apprécie beaucoup.

Finalement, ce mémoire n'aurait pas pu être mené à terme sans le soutien inconditionnel de ma famille, particulièrement celui de mon père et celui de mon mari, Paul. Je vous aime infiniment et je vous remercie d'être toujours là pour moi.

Chapitre I: Introduction

Pendant plusieurs décennies, il a été pensé que l'ADN était la seule molécule capable de conserver et transmettre l'information génétique et, que cette information était exprimée à travers les protéines, notamment les enzymes, les seules macromolécules biologiques connues pour catalyser des réactions chimiques. Ce dogme a été transgressé par la découverte de certains ARN qui peuvent servir de stockage d'information génétique ou de catalyseurs, comme l'ARN du virus de la mosaïque du tabac (1), l'intron auto-épissable de l'ARN ribosomique chez *Tetrahymena thermophila* (2) et l'ARN catalytique (l'ARN M1) de la RNase P chez *Escherichia coli* (3). Ces ARN ont été appelés plus tard ribozymes. Basée sur ces constats, l'hypothèse du « monde ARN » a été ensuite formulée. Il a été proposé que des macromolécules d'ARN, capables d'encoder et de catalyser leur propre duplication, ont été à l'origine de la vie sur terre et, qu'ultérieurement durant l'évolution, ce monde a été transformé graduellement en celui d'aujourd'hui, un monde de protéines (4). Au cours des dernières vingt-cinq années, cette hypothèse a été consolidée par la découverte de plusieurs autres ribozymes (ayant des rôles essentiels dans la cellule), dont le ribosome et la RNase P. Dans ce contexte, la RNase P montre un intérêt particulier, étant donné qu'elle est vue comme une relique du monde à l'ARN encore présente dans la vie cellulaire moderne.

Dans l'introduction de ce mémoire, je vais décrire brièvement les connaissances actuelles concernant les fonctions cellulaires de la RNase P. J'y discuterai les similitudes/différences fonctionnelles et structurales à travers les domaines phylogénétiques de ce ribozyme. Je présenterai les données existantes à ce jour concernant la mtRNase P. Je dresserai l'hypothèse et les objectifs de mon projet.

I. 1 Les fonctions cellulaires de la RNase P

La RNase P est principalement reconnue pour sa participation à la maturation des ARNt à l'extrémité 5'. Elle est la seule endonucléase connue qui coupe de façon spécifique la région 5' leader des pré-ARNt chez tous les organismes et les organelles étudiés jusqu'à maintenant (**Fig I. 1, Fig I. 2**), exception faite de *Nanoarchaeum equitans*. Chez cette espèce, la transcription de tous les ARNt commence à partir de promoteurs directement adjacents à l'extrémité 5' (5,6).

Le clivage des pré-ARNt par la RNase P a été étudié avec plus de détails chez les bactéries. Pour la RNase P bactérienne, la coupure du pré-ARNt nécessite la présence des ions métalliques. Les produits de réaction obtenus sont l'ARNt mature et la région 5' leader de l'ARNt (**Fig. I. 1**) (7-9). En plus de son implication dans la maturation des ARNt, la RNase P joue des rôles essentiels dans d'autres processus cellulaires chez les bactéries et les eucaryotes, ceux-ci étant résumés dans la **Fig. I. 2**.

Chez les bactéries, elle participe à la maturation de plusieurs autres petits ARN (les ARNr 2S, 4.5S (10,11)), de l'ARNtm (10S) (12), des ARNr (13) et de certains riboswitches (14). Elle accélère également la dégradation des ARNm des opérons *tna* (dégradation du tryptophane), *his* (biosynthèse d'histidine), *rbs* (transport du D-ribose), *secG* (excrétion de protéines), *lac* (lactose), ainsi que des ORFs b0669 et b0671 (15,16).

Chez les eucaryotes, elle participe à la maturation de certains ARNm polycistroniques (6,17), du rétrovirus chez la drosophile (18), des ARN viraux chez les plantes (19), des petits ARN nucléolaires et d'autres ARN non-codants (20-22). Des études récentes ont démontré qu'il y a un effet rétroactif de la RNase P nucléaire humaine sur la transcription accomplie par les ARN polymérases I et III (23,24). Elle remplit le rôle de facteur de transcription pour des ARNt et d'autres petits ARN (ARN 5S, ARN 7SL et le petit ARN splicéosomal U6) transcrits par Pol III; elle est aussi nécessaire pour une transcription efficiente par Pol I (25). De façon similaire, chez *Saccharomyces cerevisiae*, il a été montré que la transcription est liée à la maturation à l'extrémité 5' des ARNt nucléaires; Bdp1, une sous-unité du facteur de transcription TFIIIB de Pol III, co-immunoprécipite avec l'ARN de la RNase P nucléaire et la maturation de l'ARNt^{lle} est aberrante pour le mutant *bdp1Δ 253–269* (26). De plus, le constituant protéique de la mtRNase P chez la levure, Rpm2, active la transcription des gènes nucléaires et stabilise l'expression de certains ARNm qui codent pour des protéines mitochondriales (TOM40, TOM6, TOM20, TOM22 et TOM37, HSP60 et HSP10) (27). De même, sa délétion provoque une réduction de la traduction de Cox1, Cox2 et Cox3 (28).

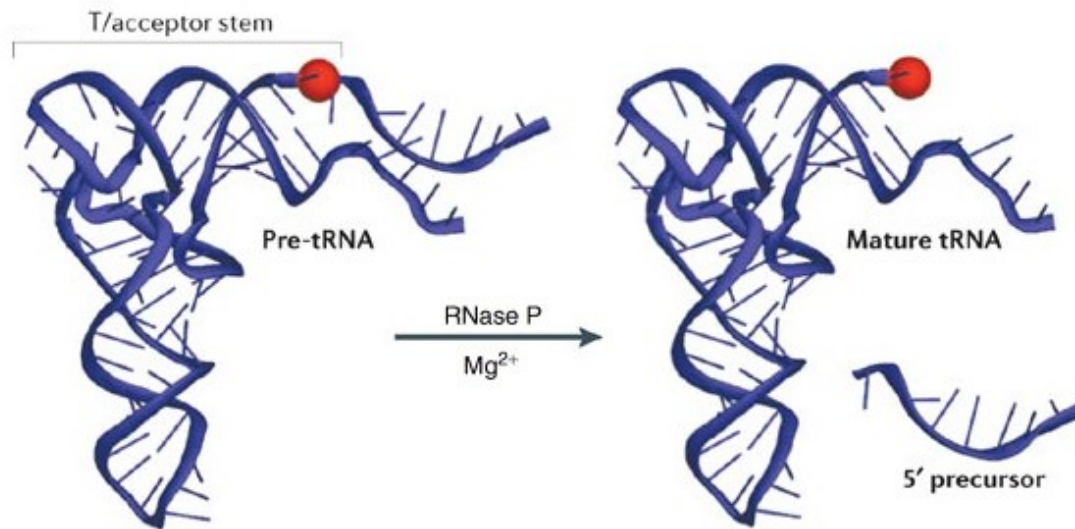


Figure I. 1 Réaction de catalyse du pré-ARNt par la RNase P bactérienne. En présence des ions métalliques (préférable Mg^{2+}), le pré-ARNt (à gauche) est clivé par la RNase P. Ce clivage est fait par l'hydrolyse d'une seule liaison phosphodiester. Les produits de réaction obtenus (à droite) sont l'ARNt mature avec un groupe phosphate (sphère rouge) et la région 5' leader avec un groupe hydroxyle en 3'. Figure modifiée à partir de (9).

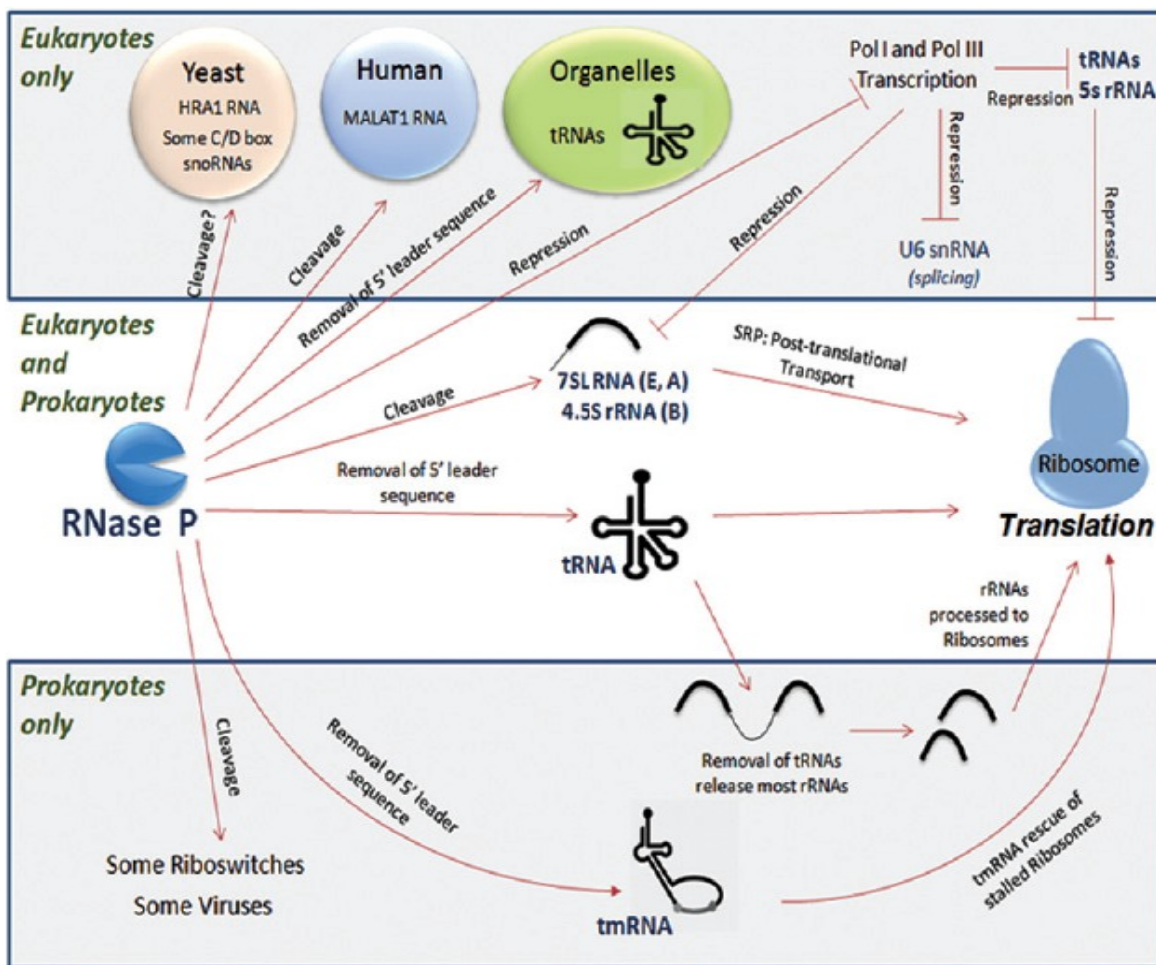


Figure I. 2 Résumé des fonctions cellulaires de la RNase P chez les bactéries et les eucaryotes. Figure tirée de (29).

Le gène RPM2, indépendamment de sa fonction dans la maturation en 5' des ARNt mitochondriaux, se comporte aussi comme suppresseur d'une mutation qui affecte l'import mitochondrial de protéines (mutant *isp42*) et il est essentiel pour une croissance fermentative normale (30). Finalement, la voie de maturation des pré-ARNt et celle de la biosynthèse des lipides de type II sont entrecroisées dans la mitochondrie de la levure (31-33). Toutes ces évidences suggèrent fortement une association de la RNase P avec des protéines de fonctions diverses, ainsi qu'une possible organisation des fonctions cellulaires telles que la transcription, la traduction, le métabolisme et la régulation, dans de supercomplexes dynamiques multifonctionnels stables.

Aujourd'hui, cette organisation en supercomplexes a été démontrée dans les mitochondries des champignons (*S. cerevisiae*, *A. nidulans* et *N. crassa*), dans celles de *Bos taurus* et de la plante *Brassica oleracea*, ainsi que chez la bactérie *Escherichia coli* (34). Il a été aussi démontré que l'activité de la mtRNase P est associée à d'autres activités cellulaires. Chez la levure, les résultats révèlent que la voie de maturation des pré-ARNt et des ARNr, et la dégradation des ARN mitochondriaux sont associées avec la machinerie de la traduction dans un supercomplexe multifonctionnel (32). Chez *E. coli*, un supercomplexe similaire a été caractérisé indiquant une association physique entre la transcription, la voie de maturation et d'aminoacylation des ARNt et la dégradation des ARN (34).

I. 2 La RNase P : similitudes/différences fonctionnelles et structurales à travers les domaines phylogénétiques

L'activité de la RNase P a été identifiée dans un grand nombre d'organismes représentant les trois règnes de la vie (Archaea, Bacteria et Eukarya) ainsi que dans les organelles, les plastides et les mitochondries (35,36). En général, la RNase P est composée d'une sous-unité d'ARN (le P-ARN, codé par le gène *mnpB*) qui est la sous-unité catalytique de l'enzyme, et d'une ou plusieurs sous-unités protéiques (la P-protéine) (6,37).

Les P-ARN des trois règnes de la vie proviennent d'un ancêtre commun. Ce fait est soutenu par la fonction commune de tous ces P-ARN, ainsi que par les similitudes trouvées dans les séquences primaires et les structures secondaires de tous les P-ARN. La comparaison des séquences primaires a montré que les P-ARN de la RNase P de tous les domaines de la vie partagent cinq régions conservées (CRI-V) (**Fig. I. 3**) (7). De même, la modélisation des P-ARN a permis d'élaborer une structure secondaire consensus entre les eubactéries, les archéobactéries et les eucaryotes. Ce modèle consensus regroupe le noyau (P1-P4), contenant le site catalytique (l'hélice P4) et l'hélice P1, essentielles pour l'activité RNase P, la région de jonction entre P7-P10 et la boucle interne existante entre P10/11 et P12 (**Fig. I. 4**) (6,38).

En contrepartie des similitudes fonctionnelles et structurales, les RNase P présentent quelques différences à travers les domaines phylogénétiques. Au plan fonctionnel, il a été montré qu'*in vitro*, les versions bactériennes des P-ARN sont actives sans cofacteur protéique (6). Par contre, la plupart des P-ARN des archéobactéries et des eucaryotes, sans leurs composants protéiques, montrent seulement une activité catalytique résiduelle, et ce, en conditions de salinité et de pH qui assurent une grande stabilité des substrats ARN (6,39,40). Ainsi, en conditions naturelles, ces P-ARN dépendent plus strictement de leur partie protéique pour une réaction enzymatique efficace (41-44).

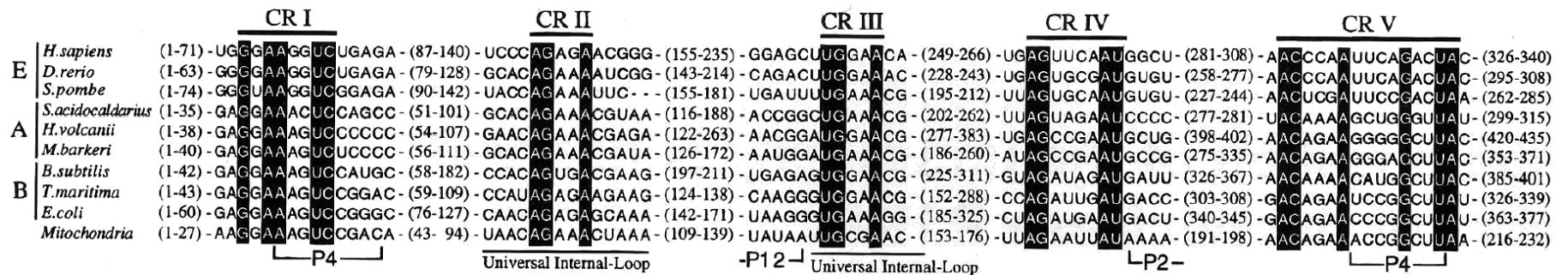


Figure I. 3 Régions de séquence primaire de l'ARN de la RNase P, conservées tout au long de l'évolution. L'alignement inclut trois Eukarya (dénotées E), trois Archeaea (dénotées A), trois Bacteria (dénotées B) et l'ARN de la mtRNase P d'*A. nidulans*. Figure tirée de (7).

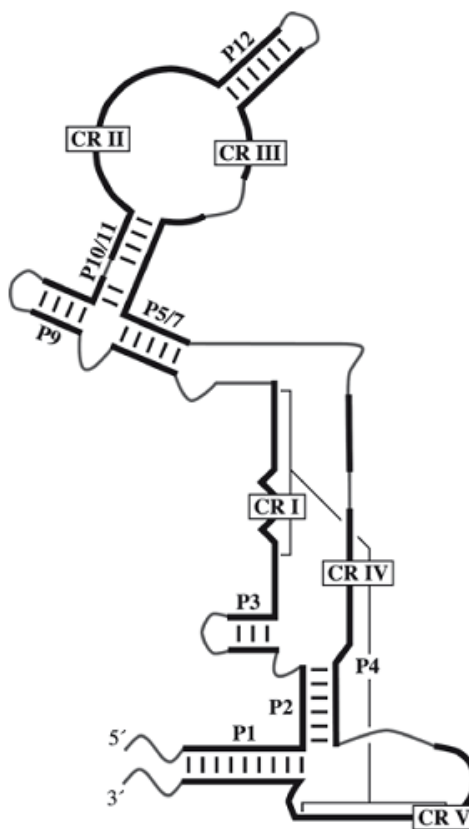


Figure I. 4 Structure secondaire consensus de l'ARN de la RNase P pour les trois règnes de la vie (Archaea, Bacteria et Eukarya). Les segments qui varient en structure, connectés aux éléments conservés, sont indiqués par des lignes grises. Les hélices sont notées P1-P12 et les régions de séquence primaire conservées sont marquées CR I-V. Les éléments de structure absents dans de petits groupes évolutifs sont inclus dans ce modèle (i.e. l'hélice P12 absente chez *Mycoplasma fermentans* et l'hélice P2 et toute partie en aval de l'hélice P10/11, absentes ou réduites chez *Pyrobaculum*). Figure tirée de (38).

Sur le plan structural, il a été observé que la masse de l'holoenzyme des archéobactéries est plus grande que celle des bactéries, même si les P-ARN ont des structures semblables. De plus, elle semble avoir quatre composants protéiques qui présentent des homologues (Pop4, Rpp1, Pop5, Rpr2) chez la plupart des eucaryotes, mais sans homologie avec la protéine bactérienne. Le seul lien avec la protéine bactérienne semble être la similarité structurale existante entre elle et Mth687 (Pop5). Plus précisément, les deux protéines adoptent une conformation structurale similaire, même si elles sont topologiquement distinctes et leur séquence n'est pas apparentée (**Fig. I. 5**) (45,46). Pour la RNase P nucléaire eucaryote, les études ont révélé une structure encore plus complexe que celles des archéobactéries. Le P-ARN nucléaire représente généralement deux tiers de la longueur de séquence du P-ARN bactérien et sa sous-unité protéique est beaucoup plus complexe; elle possède au minimum 9 ou 10 protéines (**Fig. I. 5**) (46).

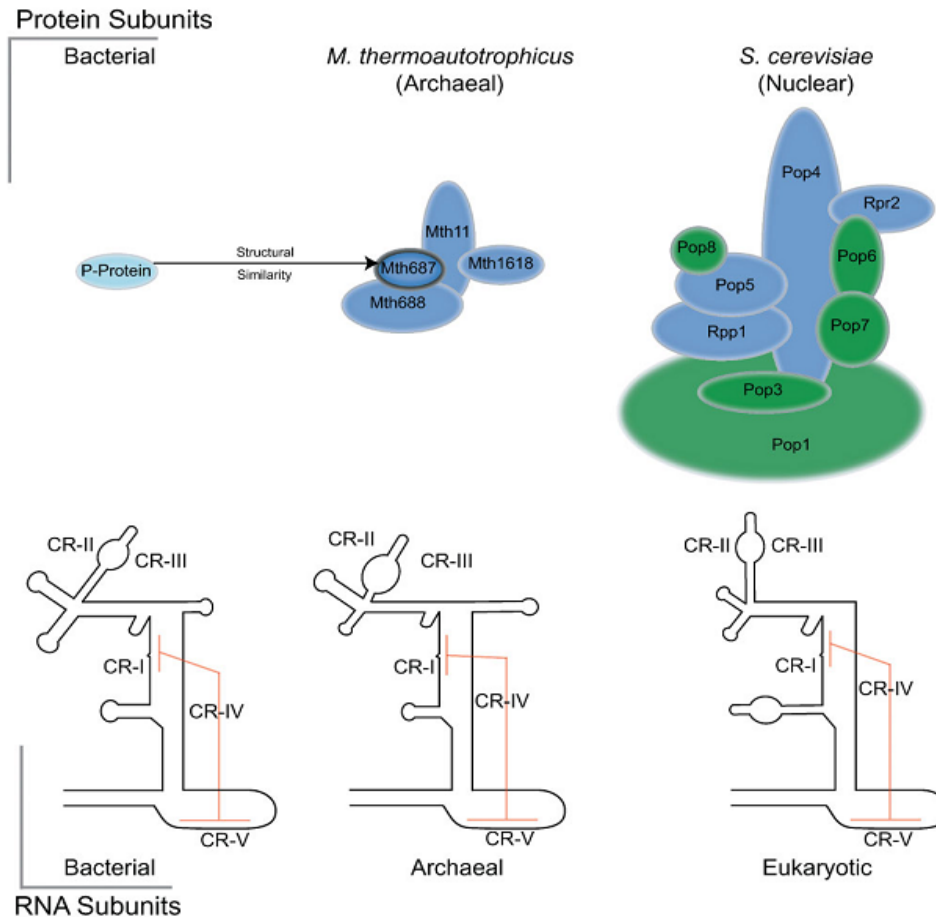


Figure I. 5 Évolution de la RNase P dans les trois règnes de la vie (Archaea, Bacteria et Eukarya – la partie nucléaire). Le code de couleur, bleu foncé sur la figure, indique les protéines homologues entre la RNase P nucléaire eucaryote et celle des archéobactéries. La similarité structurale entre la protéine de la RNase P bactérienne et la protéine Mth687 chez les archéobactéries est montrée par la flèche. Les interactions directes entre les sous-unités protéiques sont tracées en fonction des données obtenues par la technique double hybride¹ (42,47). Pour les sous-unités ARN, les cinq régions conservées (CR-I-V) et le pseudonœud qui inclut le site catalytique (en rouge) sont indiqués. Figure tirée de (46).

¹ Technique développée en biologie moléculaire permettant de détecter une interaction physique entre deux protéines.

I. 3 La mtRNase P

Les connaissances de la structure des RNase P dans les mitochondries sont limitées. Dans quelques cas seulement, des gènes codants pour des constituants de la mtRNase P ont été identifiés. Les informations disponibles indiquent une plus grande diversité dans la structure de ces enzymes. Certains aspects concernant l'origine et l'évolution des mitochondries sont essentiels pour pouvoir comprendre la grande diversité en structure et composition de la mtRNase P. Les mitochondries résultent apparemment de l'acquisition par endosymbiose² d'une α -protéobactérie par une cellule eucaryote (48). Au cours de l'évolution, la majorité des gènes de l'endosymbiote a été transférée au génome nucléaire de la cellule hôte ou perdue; une petite partie cependant est restée, constituant le génome de ces organelles. Ainsi, un nombre de gènes liés à des fonctions mitochondriales, encodés ou non dans le génome de l'organelle, montrent des similarités avec l'ancêtre bactérien. Toutefois, dans d'autres cas, des fonctions mitochondriales sont accomplies par des produits de gènes nucléaires originels. Dans un tel contexte, la mtRNase P pourrait être de type bactérien ancestral, une mosaïque bactérie/eucaryote ou encore de type nucléaire originel, de nature ribonucléoprotéique (forme classique) ou exclusivement protéique (forme « proteinaceous »).

Selon les études actuelles, on trouve des mtRNase P sous la forme : classique, constituée de protéines et d'une sous-unité ARN (6,49,50) ou « proteinaceous » (51,52).

I. 3. 1 Le gène *rnpB*, codant pour le P-ARN de la RNase P, chez les mitochondries

Le gène *rnpB* se retrouve chez toutes les bactéries, chez la majorité des archéobactéries (sauf *N. equitans* - voir section I. 1) et dans le génome nucléaire de la plupart des eucaryotes (exception faite d'*A. thaliana* (53)). Pourtant, sa présence est irrégulière dans les génomes mitochondriaux (**Fig. I. 6**). *S. cerevisiae* a été la première espèce pour laquelle un gène *rnpB* a été identifié dans son génome mitochondrial (54,55). Plus tard, des études comparatives de séquences ont révélé d'autres gènes *rnpB* codés dans les mitochondries de levures voisines de *S. cerevisiae*, dans celles des levures à fission, *Schizosaccharomyces pombe* et *Schizosaccharomyces octosporus* ainsi

² Une association entre deux organismes vivants où l'un est contenu par l'autre.

que chez *A. nidulans* et *Taphrina deformans* (35,56,57). Dans les dernières années, l'avancement des techniques de séquençage et des analyses de séquences a permis de conclure que peu d'espèces encodent un gène *rnpB* dans leur génome mitochondrial, parmi celles-ci les jakobides³ (dont *Reclinomonas americana*), certaines algues vertes (*Nephroselmis olivacea* et *Ostreococcus tauri*), certains zygomycètes⁴, ascomycètes⁵ et une partie des basidiomycètes⁶ (résultats non-publiés du laboratoire) (35,36,58,59) (**Fig. I. 6**). Ces analyses de séquence ont aussi démontré que le gène *rnpB* mitochondrial écarte à des degrés variables du consensus bactérien pour la plupart des espèces qui l'encodent (**Fig. I. 7**). Dans certains cas, les seules régions de structure primaire qui restent conservées sont celles qui définissent le pseudonœud P4 et l'hélice P1 (**Fig. I. 7**) (35,36). La divergence extrême des séquences et la présence sporadique du gène *rnpB* mitochondrial concordent avec la grande variabilité des formes structurales de la mtRNase P.

³ Des eucaryotes unicellulaires qui sont des flagellées hétérotrophes; ils se nourrissent avec des bactéries.

⁴ Des organismes très discrets et de taille généralement microscopique. Ce sont des champignons à spores dépourvus de flagelles, dans lesquels les cellules ne sont pas séparées par des cloisons.

⁵ Vaste embranchement de champignons, caractérisés par des spores qui se forment à l'intérieur des sporocystes spécialisés, les asques.

⁶ Vaste embranchement de champignons, caractérisés par des spores formées à l'extrémité de cellules spécialisées, les basides.

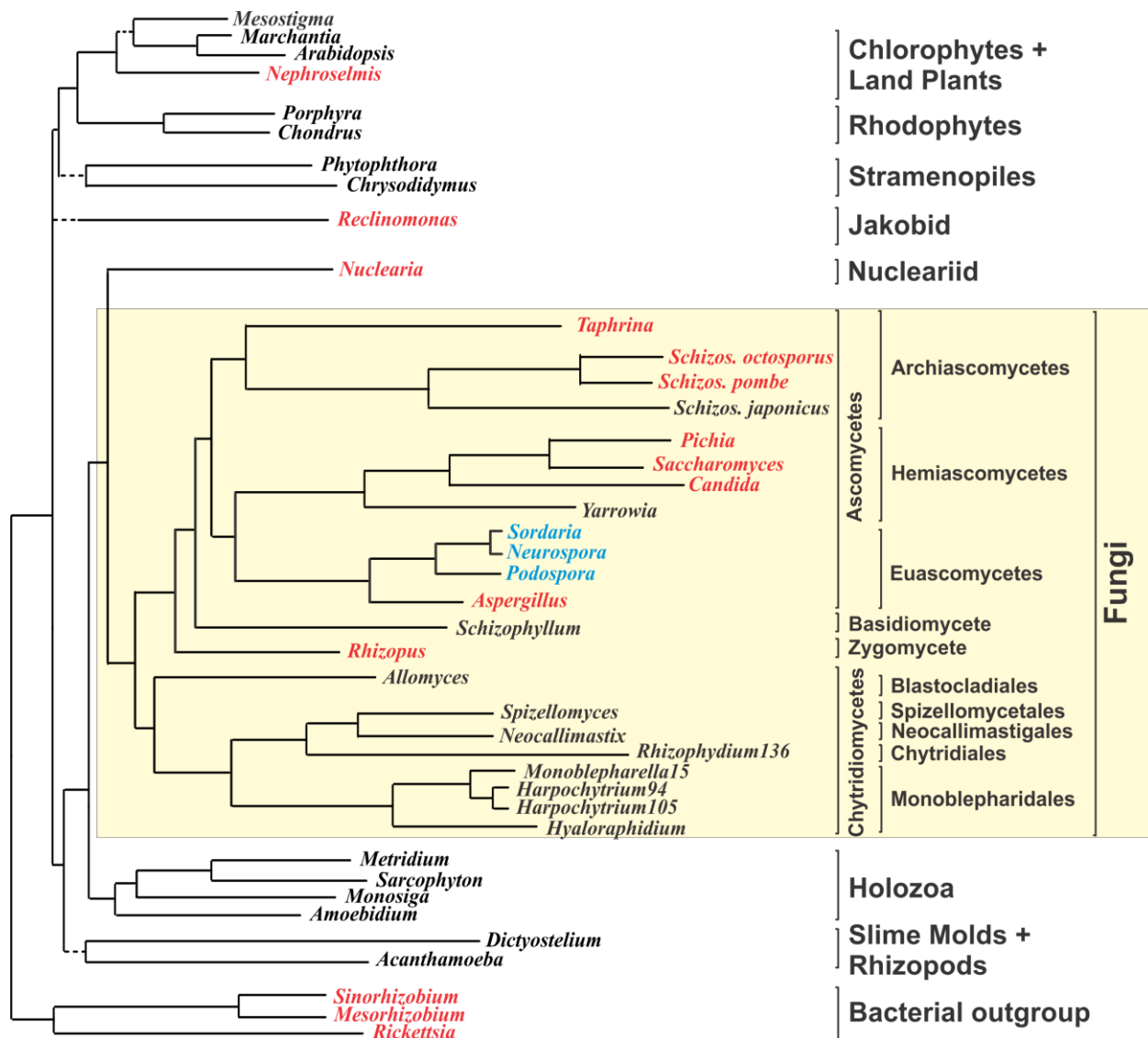


Figure I. 6. Occurrence du gène *rnpB* mitochondrial. Phylogénie hypothétique des espèces, basée sur des analyses phylogénétiques moléculaires de données de séquences mitochondriales et nucléaires. L'arbre contient seulement des espèces pour lesquelles le génome mitochondrial complet est connu. Les branches pleines indiquent des relations phylogénétiques qui sont fortement soutenues par les données moléculaires disponibles. Les lignes pointillées indiquent des incertitudes dans le placement phylogénétique. Les espèces en noir ne présentent pas un gène *rnpB* mitochondrial. Celles en rouge possèdent un gène mitochondrial et bactérien. En bleu sont marquées les espèces sans gène *rnpB* mitochondrial, mais avec une double copie nucléaire (traitées plus tard dans le mémoire). Cette figure est une version modifiée de l'arbre présenté dans (60).

I. 3. 2 La mtRNase P classique : une ribonucléoprotéine

La nature ribonucléoprotéique de la mtRNase P a été démontrée chez les ascomycètes *S. cerevisiae* et *A. nidulans*. Ces espèces possèdent une forme classique constituée par une sous-unité ARN et des protéines.

La mtRNase P chez la levure contient des constituants encodés à la fois dans le génome nucléaire et dans le génome mitochondrial (49,54,55). Le P-ARN mitochondrial (P-ARNmt) chez *S. cerevisiae* provient de l'ancêtre bactérien (61); la séquence primaire et la structure secondaire du P-ARNmt - encodé dans le génome mitochondrial (le gène RPM1) - ne ressemblent pas à celles du P-ARN nucléaire, et l'activité mitochondriale est indépendante de celle du noyau. Le P-ARNmt est essentiel à l'activité mtRNase P chez la levure et il n'est pas catalytique *in vitro* (50). Il présente une structure secondaire très réduite, les seuls motifs de structure secondaire restants étant les hélices P1, P4 et P18 (**Fig. I. 7**) (35). Cette réduction nette peut expliquer l'absence d'activité *in vitro* chez cette espèce. Concernant le composant protéique, la densité de flottaison dans les gradients de sulfate de césium, pour les fractions actives de la mtRNase P, indique une plus grande proportion protéique que chez la bactérie (50). Cependant, le seul composant protéique identifié jusqu'à maintenant chez la levure est une protéine nucléaire, encodée par le gène RPM2. Cette protéine est retrouvée uniquement dans les plus proches Saccharomycetales et elle n'est apparentée à aucune P-protéine bactérienne, archéobactérienne ou nucléaire connue (**Fig. I. 5**). La taille de cette protéine est 10 fois plus grande que la protéine bactérienne retrouvée chez *E. coli*, lui permettant potentiellement de compenser la forme réduite du P-ARN.

Chez *A. nidulans*, la mtRNase P est formée par une sous-unité ARN également encodée dans son génome mitochondrial, et au moins sept protéines. Comme chez la levure, ce P-ARNmt n'est pas catalytique *in vitro*, mais il est essentiel pour l'activité catalytique de l'enzyme (62). La modélisation de sa structure secondaire démontre qu'il contient toutes les hélices présentes chez le consensus bactérien sauf P13, P14, P15 et P18 (**Fig. I. 7**) (35). Les sept protéines mentionnées ci-dessus ont été purifiées avec l'activité catalytique de la mtRNase P chez *Aspergillus* (56). Cependant, leur

identification et leur fonction comme sous-unités de la mtRNase P restent encore indéterminées.

I. 3. 3 La mtRNase P sous forme «proteinceous»

Des études assez récentes ont indiqué l'existence d'une forme « proteinceous » de la mtRNase P chez l'humain et chez la plante *A. thaliana*.

Chez l'humain, Holtzmann et ses collègues ont démontré que, *in vitro*, l'activité de la RNase P peut être accomplie par l'association de trois protéines mitochondriales essentielles, MRPP1, MRPP2 et MRPP3 sans l'apport d'un P-ARN (52,63). Ces protéines ne sont pas homologues avec les sous-unités protéiques déjà caractérisées chez les autres RNase P (bactérienne, archéobactérienne et nucléaire), ou avec la protéine Rmp2 retrouvée chez la RNase P mitochondriale de la levure. MRPP1 est une ARNt m¹G méthyletransférase, présente chez les eucaryotes et archéobactéries et absente chez les bactéries. Chez la mtRNase P humaine, elle est probablement impliquée dans la liaison spécifique avec le substrat. MRPP2 est une protéine très bien conservée à travers les espèces, faisant partie de la famille des déshydrogénases/réductases à courte chaîne. Sa fonction n'est pas très claire dans le complexe protéique de la mtRNase P humaine. MRPP3 n'est pas encore connue. Concernant son rôle chez la mtRNase P humaine, il a été suggéré qu'elle s'occupe de l'activité catalytique de l'enzyme. En conséquence, chez l'humain l'activité de la mtRNase P peut être accomplie par un minimum de trois protéines associées. Toutefois, ces trois protéines peuvent faire partie des complexes plus grands et divers en taille; au moins 21 autres protéines ont été co-purifiées avec MRPP1, MRPP2 et MRPP3 (52).

Chez *A. thaliana*, il y a été démontré que des protéines PRORP (pour « proteinceous RNase P »), orthologues de la MRPP3, ont remplacé l'activité catalytique de la sous-unité ARN de la RNase P dans les organelles (51). Ces gènes PRORP sont présents chez tous les eucaryotes, à l'exception des amoebozoaires⁷ et champignons. Chez *A. thaliana*, trois orthologues, PRORP1, PRORP2 et PRORP3 sont retrouvés. PRORP1 co-localise avec les organelles. PRORP2 et PRORP3 se retrouvent

⁷ Un groupe d'organismes unicellulaires eucaryotes.

dans le noyau. Pour PRORP1 les tests d'activité de la RNase P *in vitro* ont montré qu'elle coupe le pré-ARNt^{Cys} mitochondrial, ainsi que le pré-ARNt^{Phe} chloroplastique; le site de coupure de PRORP1 correspond à l'endroit de clivage canonique de la RNase P et les ARNt générés présentent un phosphate en 5'. *In vivo*, chez *E. coli*, PRORP1 remplace la sous-unité ARN catalytique de la RNase P bactérienne (51).

Par ailleurs, les protéines PROPR2 et PROPR3 ont remplacé l'activité catalytique du P-ARN de la RNase P nucléaire d'*Arabidopsis*. Elles coupent *in vitro* les pré-ARNt^{Asp(GUC)} et pré-ARNt^{Gln(CUG)} nucléaires à l'extrémité 5' et leur coupure correspond à l'endroit de clivage canonique de la RNase P. De plus, les mutants catalytiques de ces deux protéines ne présentent plus d'activité RNase P (53).

I. 3. 3. 1 La possibilité de coexistence des deux formes de la mtRNase P chez l'humain

À part la forme protéique de mtRNase P (présentée ci-dessus), certaines observations suggèrent l'existence d'une forme classique, composée de l'ARN de la RNase P nucléaire et d'un composant protéique (64,65). Apparemment, une maturation efficace en 5' de précurseurs polycistroniques des ARNt chez la mitochondrie humaine nécessite la présence du P-ARN nucléaire, donc son importation (64). Cependant, le composant protéique de cette mtRNase P classique reste à identifier et aucune des sous-unités protéiques de la RNase P nucléaire n'est importée dans la mitochondrie humaine (6).

I. 3. 4 La mtRNase P chez les ascomycètes

La présence du gène *rnpB*, codant pour le P-ARN de la RNase P, est irrégulière chez les ascomycètes (35) (**Fig. I. 6**). La taille de ce gène est très variable parmi les ascomycètes. Chez *S. cerevisiae* il est de 490 nucléotides, tandis que ceux retrouvés chez *Saccharomyces fibuligera* (140 nt) et *Candida glabrata* (227 nt) sont beaucoup plus courts (35). La disponibilité de quelques séquences des P-ARNmt a permis l'analyse et la modélisation de structures secondaires, en utilisant le consensus bactérien comme guide. Ceci a permis de conclure que i) la structure secondaire des ascomycètes est réduite, ii) elle est très riche en A et U, rendant difficile la définition des domaines de structure secondaire non homologues au consensus bactérien, et iii) tous les P-ARNmt partagent seulement les hélices P1 et P4 (**Fig I. 7**), d'autres motifs de structure secondaire étant absents ou présents d'une manière corrélée avec les rapprochements phylogénétiques (35). Ainsi, les P-ARNmt étudiés chez les ascomycètes sont très réduits et hétérogènes en taille et en structure. Au cours de l'évolution, ce processus de réduction aurait pu conduire à la perte des gènes *rnpB* mitochondriaux et éventuellement à leur remplacement par un gène *rnpB* encodé dans le noyau ou par des protéines (comme chez l'humain et *A. thaliana*). La substitution par des protéines est peu probable, puisque des homologues/orthologues des PRORP1 et MRPP3, les protéines qui remplacent l'activité catalytique du P-ARNmt chez *Arabidopsis* et l'humain, n'existent pas chez les champignons (voir section I. 3. 3). Toutefois, la possibilité qu'une ou plusieurs autres protéines puissent exister chez les ascomycètes et remplacent l'activité catalytique du P-ARNmt n'est pas exclue.

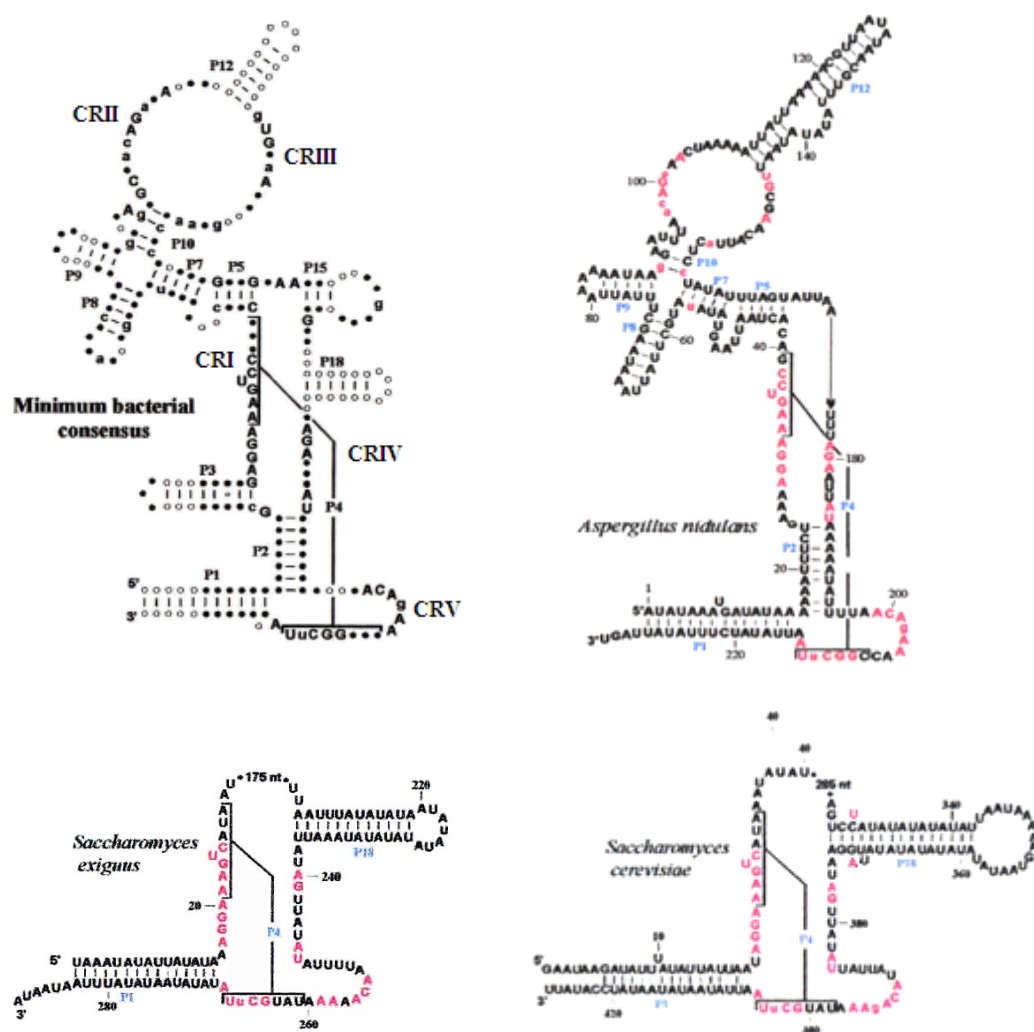


Figure I. 7 Modèles des structures secondaires du consensus bactérien et des P-ARN de la mtRNase P chez les ascomycètes *A. nidulans*, *S. cerevisiae* et *Saccharomyces exiguus*. Les lettres en majuscules sont conservées à 100 % comparativement au consensus bactérien. Les lettres en minuscules démontrent une conservation avec le consensus bactérien d’au moins 90%. Les positions en rouge sont homologues au consensus bactérien. Les régions de structure primaire conservées à travers l’évolution sont notées CRI-V. Les hélices sont notées P1-P19. Ces structures ont été tirées (35,36,66).

I. 3. 4. 1 La mtRNase P chez les ascomycètes *N. crassa*, *P. anserina* et *S. macrospora*

Pour explorer la possibilité d'un remplacement du gène mitochondrial *rnpB* par un gène nucléaire, un sous-groupe des ascomycètes se présente comme un cas intéressant. Alors que tous les membres du genre *Aspergillus*, y compris *A. nidulans*, possèdent un gène *rnpB* mitochondrial, les voisins *N. crassa*, *P. anserina* et *S. macrospora* en sont dépourvus (Fig. I. 6). Cependant, les génomes nucléaires complets sont maintenant disponibles pour ces espèces. Il est possible et accessible, à l'aide d'outil informatique, de rechercher à travers ces séquences entières, des copies de gène pouvant potentiellement correspondre à des gènes *rnpB*.

Un tel outil de détection, RNAweasel (<http://megasun.bch.umontreal.ca/RNAweasel>), a été développé dans le laboratoire (67,68). Il est basé sur la séquence et les profils de structures secondaires d'ARN et il permet le dépistage de toutes les séquences eucaryotes (nucléaires et mitochondriales) du gène *rnpB* avec une très grande confiance - basée sur une valeur statistique, E-value. Cette valeur indique quelle est la probabilité de retrouver une séquence spécifique au hasard dans une base de données ciblée; plus elle est petite, plus grande sera la confiance qu'on a la bonne séquence.

Par cette recherche *in silico*, chez *A. nidulans* on retrouve un gène *rnpB* nucléaire et le gène *rnpB* mitochondrial. Tandis que, dans les génomes nucléaires des espèces voisines, deux séquences potentielles du gène *rnpB* sont identifiées (voir tous les détails de structures secondaires dans la partie Résultats, section III. 1. 1). Basés sur ces observations, deux scénarios peuvent expliquer l'évolution différente des gènes *rnpB* chez ces espèces : soit une des deux copies nucléaires du gène *rnpB* est exprimée et transportée dans la mitochondrie pour s'occuper de la maturation des ARNt mitochondriaux, soit les deux copies assument des activités RNase P nucléaires, et une enzyme protéique s'occupe de la maturation des ARNt mitochondriaux; ces deux scénarios sont applicables dans le cas où le gène mitochondrial est devenu non-fonctionnel ou est disparu au cours de l'évolution.

I. 4. Les évidences sur le transport des P-ARN nucléaires de la RNase P dans la mitochondrie

I. 4. 1 La biogenèse des transcrits des P-ARN nucléaires de la RNase P

Selon les observations actuelles, avant d'être transportés dans d'autres sous-compartiments cellulaires, l'ARN nucléaire de la RNase P, les ARNt et certains autres petits ARN (l'ARNr 5S⁸, l'ARN splicéosomal U6⁹, l'ARN 7SL¹⁰, l'ARN 7K¹¹, l'ARN B2¹² et l'ARN de la RNase MRP¹³) sont synthétisés en précurseurs, et leur processing est nécessaire. Dans les cellules eucaryotes, la transcription des gènes codant pour ces petits ARN est accomplie par Pol III (69,70). Deux types généraux des transcrits primaires peuvent être distingués après cette transcription:

i. Des transcrits primaires (ex. chez l'humain, l'ARNr 5S, l'ARN splicéosomal U6, l'ARN 7SL, l'ARN 7K, l'ARN de la RNase MRP et l'ARN B2 chez la souris) qui sont synthétisés sans séquence leader en 5' et avec une queue poly U en 3' (4 à 5 résidus U, transcrits à partir d'une série de T qui représente généralement le site de terminaison de la transcription par Pol III); pour obtenir l'ARN mature, les résidus U en 3' seront clivés post-transcriptionnellement par des endonucléases et/ou exonucléases (**Fig. I. 8**) (70).

ii. Des transcrits primaires qui sont produits avec des extrémités 5' et 3' rallongées et pour être fonctionnels, leur maturation est nécessaire (**Fig. I. 8**) (ex. les transcrits primaires des ARNt qui subissent le clivage des extrémités par des endonucléases et/ou exonucléases, le remplacement et/ou l'addition de nucléotides à l'extrémité 3' plus l'addition du CCA, et l'épissage si ils contiennent des introns) (70).

⁸ Composant de la grande sous-unité ribosomique chez les procaryotes et eucaryotes.

⁹ Composant des petites ribonucléoprotéines nucléaires U6 (snRNP U6) qui avec d'autres snRNP, de l'ARN pré-messager non modifié et diverses autres protéines forment le splicéosome (complexe moléculaire ribonucléoprotéique important qui permet l'épissage des ARN pré-messagers).

¹⁰ Le composant ARN du complexe SRP (« signal recognition particale RNA»); complexe qui dirige le trafic des protéines dans la cellule.

¹¹ ARN retrouvé chez les animaux; il contrôle la transcription du facteur d'élongation P-TEFb.

¹² ARN qui inhibe la transcription par Pol II des ARN messagers comme réponse au choc thermique.

¹³ Enzyme retrouvée chez les eucaryotes ; dans le noyau, elle participe au processing des précurseurs ARNr; dans la mitochondrie elle est impliquée dans l'initiation de la réplication de l'ADN mitochondrial.

Certains des transcrits générés par Pol III (ex. l'ARN splicéosomal U6, l'ARN 7K et l'ARN B2) peuvent aussi subir d'autres modifications post-transcriptionnelles, comme une coiffe en 5' et/ou la polyadénylation, ou l'adénylation en 3' (70,71).

La coiffe de ces transcrits a une structure différente de celle retrouvée chez les transcrits de Pol II soit, un groupement méthyle attaché au γ -phosphate du 5'-terminus (70). Ses fonctions restent encore inconnues. Certains auteurs présument qu'elle peut contribuer à la stabilité des ARN, en les protégeant contre la dégradation par des exonucléases et en augmentant leur durée de vie (72,73). D'autres suggèrent que la formation de la coiffe peut déclencher l'exportation du noyau vers le cytoplasme pour certains de ces ARN (ex. le cas de l'ARN 7K chez l'humain et celui de l'ARN B2 chez la souris, retrouvés dans le noyau et dans le cytoplasme (74,75)).

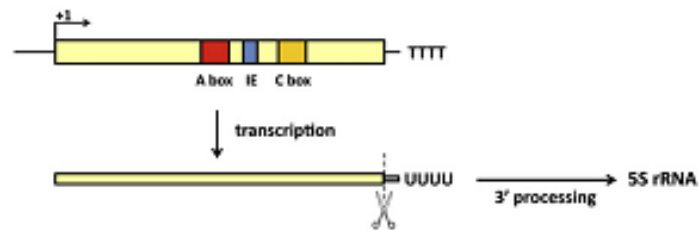
La polyadénylation est observée pour l'ARN B2 - certains de ces ARN sont transcrits avec une queue poly A assez longue (de 10 à 300 résidus sont ajoutés après la série de T). Ces ARN sont majoritairement cytoplasmiques et plus stables que ceux sans queue poly A (75-77). Pour certains autres petits ARN (ex. l'ARN splicéosomal U6, l'ARN 7K, l'ARN 7SL chez l'humain), un processus d'adénylation a été aussi constaté. Dans les transcrits primaires de ces ARN, il y a été découvert qu'un résidu A, qui ne fait pas partie de la séquence génomique, est ajouté si, pendant la transcription, il y a déletion d'un ou plusieurs U de la queue 3' (71). Quant aux fonctions de la polyadénylation/adénylation des petits ARN dans la cellule, elles restent cependant irrésolues. Certains auteurs postulent que la polyadénylation et/ou l'adénylation peuvent être impliquées soit dans la stabilité des petits ARN, soit dans un mécanisme d'édition/réparation, ou dans un mécanisme de ciblage vers des voies de dégradation (71). Une implication dans la régulation de l'exportation nucléaire de certains de ces petits ARN a été aussi considérée (ex. cas de l'ARN B2) (75,77).

Pour ce qui est de la biogenèse et le processing du transcrit de l'ARN nucléaire de la RNase P, il existe très peu de données (juste chez l'humain et quelques levures). Chez l'humain, le gène codant pour le P-ARN nucléaire (H1 RNA) de la RNase P est transcrit par Pol III. Pour ce gène, les éléments du contrôle transcriptionnel se retrouvent en amont du site d'initiation de la transcription, soit une boîte TATA, un élément de

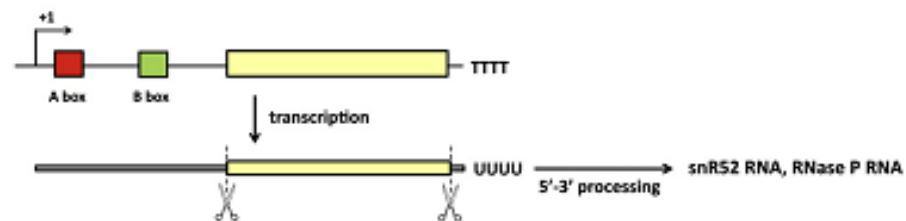
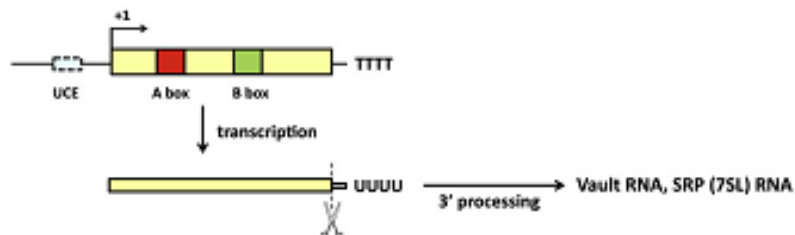
séquence proximal et un élément de séquence distal (78). Les transcrits primaires sont générés sans le 5' leader et avec la queue des U en 3' (79). Un processing en 3' est nécessaire, pour que ces transcrits soient fonctionnels.

Chez les levures *S. cerevisiae*, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces kluyveri* et *Saccharomyces globosus*, les données actuelles indiquent que le gène du P-ARN nucléaire est transcrit aussi par Pol III. Deux éléments de contrôle transcriptionnel, deux blocs de séquences (A et B), entraînent la transcription (**Fig. I. 8**) (80). Ces séquences se retrouvent en aval du site de transcription, à l'extérieur de l'extrémité 5' du transcrit mature (**Fig. I. 8**). Le transcrit primaire du P-ARN est produit sous forme d'un précurseur, ayant une séquence leader en 5' assez longue, plus quelques U en 3'. Pour obtenir un transcrit fonctionnel, les deux extrémités sont clivées, post-transcriptionnellement (**Fig. I. 8**) (70,80,81).

TYPE 1 PROMOTER



TYPE 2 PROMOTERS (A BOX/B BOX – CONTAINING PROMOTERS)



TYPE 3 PROMOTER

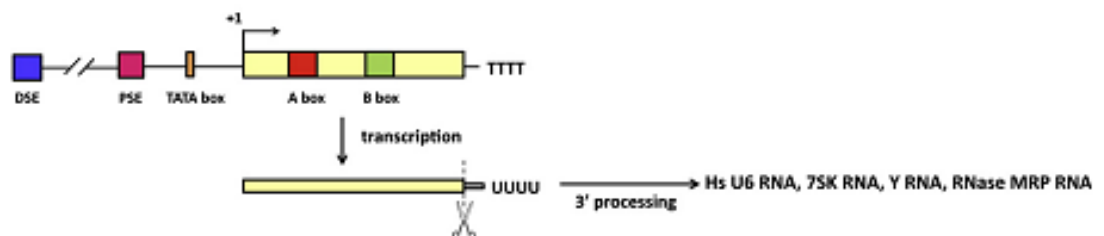


Figure I. 8 Différentes architectures de promoteurs et voies de biosynthèse pour les gènes transcrits par Pol III (les gènes de classe III). De façon générale, les gènes de classe III possèdent des promoteurs de type I, II ou III. Les promoteurs de type III se distinguent du type I et II par le fait que les principaux éléments du contrôle transcriptionnel se retrouvent en amont du site d'initiation de la transcription. Ces éléments sont une boîte TATA, un élément de séquence proximal (PSE, nécessaire pour la transcription basale) et un élément de séquence distal (DSE, utilisé pour augmenter la transcription). Le gène de l'ARN 5S est le seul portant un promoteur de type I. Ce type de promoteur est formé par deux blocs de séquences (BOX A et BOX C), plus un élément de transcription interne (IE) retrouvé en aval du site d'initiation de la transcription. Les promoteurs de type II (retrouvés au niveau des gènes des ARNt) sont constitués par deux blocs des séquences (BOX A et BOX B) conservés et situés en aval du site d'initiation de la transcription, à l'intérieur de la région qui désigne le transcrit mature. Dans certains cas (ex. le gène du P-ARN nucléaire de la RNase P chez *S. cerevisiae*), ces séquences se retrouvent dans la région 5' flanquante, à l'intérieur de la région qui désigne la séquence précurseur. Les blocs A et B peuvent aussi être présents au niveau de certains gènes de classe III possédant un promoteur de type III (ex. chez l'humain, l'ARN splicéosomal U6, l'ARN 7K, l'ARN de la RNase MRP). Comme souligné dans la figure, les transcrits primaires pour des gènes ayant des promoteurs de type II (la plupart représentés par les pré-ARNt) sont transcrits généralement avec une séquence 5' leader qui doit être clivée postérieurement par des endonucléases. À l'opposé, les transcrits primaires des gènes ayant des promoteurs de type I et III, sont produits sans 5' leader; ceci implique que le premier nucléotide en 5' de l'ARN mature sera le même que le premier incorporé transcriptionnellement. De plus, les transcrits primaires des gènes de classe III sont générés avec une courte queue en 3' qui sera ensuite clivée. Cette figure a été tirée de (70).

I. 4. 2 La translocation du noyau vers le cytoplasme du P-ARN nucléaire de la RNase P

Le H1 RNA, le composant ARN de la RNase P nucléaire humaine est le seul ARN connu jusqu'à maintenant pour lequel une translocation cytoplasmique a été démontrée (82). Par contre, le mécanisme et les composants de la voie d'exportation du noyau vers le cytoplasme restent inconnus (82). La seule observation faite est qu'une partie des ARN exportés reste dans le cytoplasme pour accomplir des fonctions inconnues (83); alors que l'autre partie est transportée dans la mitochondrie et participe à la maturation des mtARNt (64).

Les seuls petits ARN transcrits par Pol III pour lesquels des composants de l'exportation nucléaire sont connus sont les ARNt. Chez les vertébrés, les transcrits matures des ARNt sont exportés du noyau vers le cytoplasme à travers les pores nucléaires. Cette translocation est faite à l'aide d'un récepteur d'exportation, l'exportine-t, qui lie directement l'ARNt d'une manière RanGTP-dépendante (84).

I. 4. 3 L'importation du composant P-ARN nucléaire de la RNase P dans la mitochondrie

La biogenèse des mitochondries et leur bon fonctionnement nécessitent l'importation à partir du cytoplasme de protéines et de petits ARN nucléaires. Chez des espèces, l'importation de petits ARN nucléaires, incluant des ARNt, l'ARNr 5S, l'ARN de la RNase MRP et l'ARN nucléaire de la RNase P, est essentielle à la réplication de l'ADN mitochondrial, la transcription et la traduction mitochondriales. L'importation des ARNt a été observé chez les plantes, les mycètes, les protistes et les animaux; pour ce qui est de l'ARNr 5S, de l'ARN de la RNase MRP et l'ARN nucléaire de la RNase P, leur présence n'a été signalée que dans la mitochondrie humaine (85).

Les voies d'importation de ces ARN dans la mitochondrie ne sont pas très bien définies. Leurs composants varient d'un système à l'autre, et des différences remarquables sont observées même chez des espèces étroitement apparentées.

Pour les ARNt, deux voies d'importation ont été signalées. L'ARNt_{CCU}^{Lys} de *S. cerevisiae*, utilise la voie d'importation de protéines dans la mitochondrie, via les translocases membranaires mitochondriales, les complexes TOM et TIM23. Elle nécessite de l'ATP et un potentiel membranaire ($\Delta\Psi$)¹⁴ intact. L'ARNt à importer est aminoacylé, lié avec le précurseur cytosolique de la lysyl-tRNA-synthétase mitochondriale, et ce complexe est délivré à la surface mitochondriale par l'intermédiaire d'une autre protéine, l'enolase (85).

L'autre voie est indépendante du transport des protéines dans la mitochondrie et elle est largement répandue parmi les espèces (des kinétoplastides aux animaux). Des composants différents, spécifiques pour chaque espèce, font partie de cette voie, y compris le canal transporteur d'anions voltage-dépendent (VDAC) chez les plantes, le facteur d'élongation de la traduction (eEF1a) chez *Trypanosoma brucei*, ou le complexe d'importation des ARN (RIC) chez *Leishmania tropica* (un proche voisin de *T. brucei*) (86).

L'ARNr 5S est détecté dans les mitochondries purifiées et dans les mitoplastes¹⁵. Au moins deux voies d'importation mitochondriale existent pour cet ARN. Comme dans le cas des ARNt, l'une utilise en partie la voie d'importation des protéines - les translocases TOM et TIM23. Elle a aussi besoin de l'ATP, d'un $\Delta\Psi$ intact et des précurseurs cytosoliques - le précurseur cytosolique de la protéine ribosomique mitochondriale L-18 (MRPL18) et celui de la rhodanase mitochondriale (85).

Pour l'autre voie d'importation, quelques éléments ont été définis: la nécessité d'un $\Delta\Psi$ intact et une protéine, la polynucléotide phosphatase (PNPase), une 3'-5' exoribonucléase qui agit comme régulateur d'importation pour l'ARN 5S. Cette voie d'importation est aussi partagée par l'ARN de la RNase MRP et H1 RNA (**Fig. I. 9**) (85).

Au sujet de H1 RNA, il y a été démontré que son importation dans la matrice mitochondriale humaine est nécessaire pour une maturation efficace en 5' des transcrits

¹⁴ Gradient électrochimique des protons à travers la membrane interne mitochondriale

¹⁵ Mitochondries sans membrane externe.

polycistroniques et que cette importation dépende en partie de la PNPase (64,87). Cette exoribonucléase est présente chez les bactéries, les plantes, la mouche, la souris et l'humain mais, absente chez les archéobactéries, les trypanosomes et les mycètes. Chez l'humain, elle se retrouve dans l'espace intermembranaire mitochondrial, attachée à la membrane interne mitochondriale (**Fig. I. 9**) (87). Quant au mécanisme d'importation, la PNPase reconnaît et s'attache à une tige-boucle, un motif structural spécifique, retrouvé au niveau du H1 RNA. Cette interaction physique permet le transfert de l'ARN aux composants retrouvés en aval de la voie d'importation, en promouvant sa translocation à travers la membrane interne mitochondriale. De plus, l'existence d'un potentiel membranaire ($\Delta\Psi$) à travers la membrane interne mitochondriale peut aider à relâcher les ARN liés à la PNPase ou encore, faciliter leur translocation à travers cette membrane, vers la matrice mitochondriale (**Fig. I. 9**) (87).

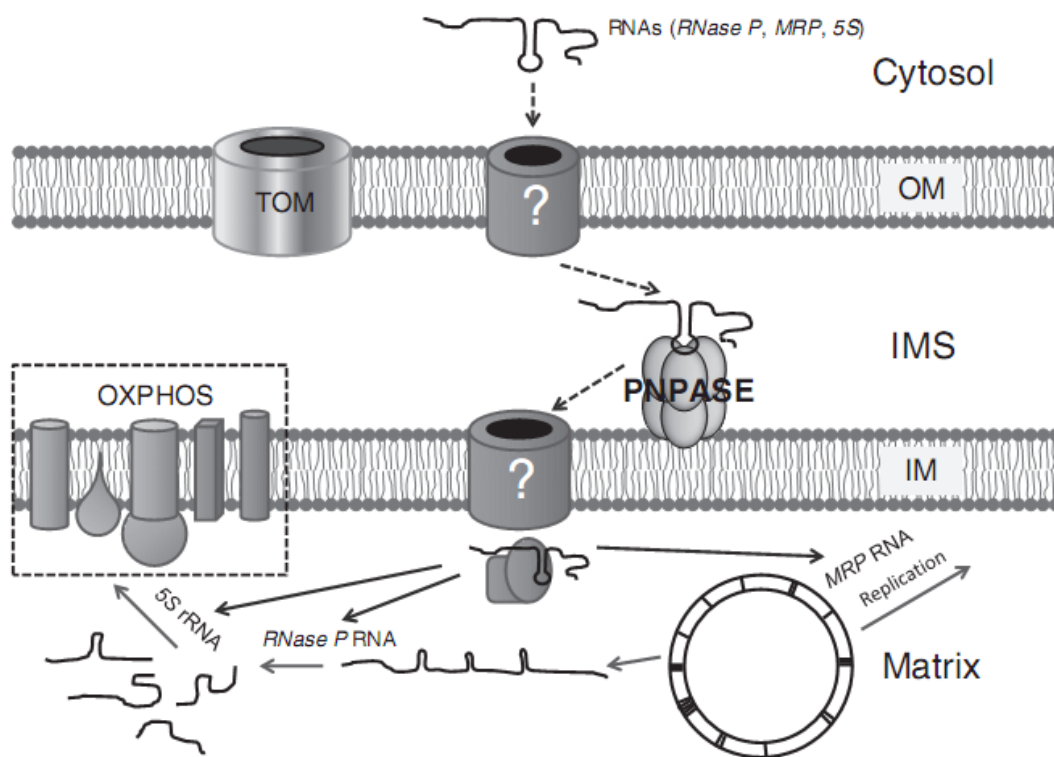


Figure I. 9 La PNPase facilite l'importation des petits ARN nucléaires dans la matrice mitochondriale humaine. La PNPase favorise l'importation dans la matrice mitochondriale des petits ARN nucléaires, en incluant l'ARNr 5S, l'ARN de la RNase MRP et H1 RNA de la RNase P nucléaire, en se liant à des tiges-boucles spécifiques - des motifs structuraux retrouvés au niveau des ARN importés. Les petits ARN nucléaires importés accomplissent de fonctions dans la réplication, la transcription et la traduction mitochondriales. Les produits de la traduction mitochondriale sont des composants des complexes I-IV de la phosphorylation oxydative (OXPHOS). Cette figure a été tirée de (85).

I. 5. L'hypothèse et les objectifs du projet

L'occurrence du gène *rnpB* codant pour l'ARN de la RNase P est sporadique dans le génome mitochondrial des ascomycètes. Certaines de ces espèces possèdent un gène mitochondrial, par contre leurs voisines peuvent ne pas l'avoir. Ainsi, chez les voisines d'*A. nidulans*, soient, *N. crassa*, *P. anserina* et *S. macrospora* aucun gène *rnpB* mitochondrial n'existe (**Fig. I. 6**). Par contre, dans leur génome nucléaire, on constate une duplication de ce gène. Suite à ces observations, on a émit l'hypothèse qu'une de ces deux copies nucléaires sera importée dans la mitochondrie pour s'occuper de la maturation en 5' des pré-mtARNt chez ces espèces (cas similaire chez l'humain). Cependant, on n'exclut pas que les deux copies fonctionnent dans le noyau ou/et dans la mitochondrie.

Pour valider cette hypothèse chez ces espèces, on vérifie : (i) l'état de conservation des copies (ii) leur transcription (iii) l'existence de formes fonctionnelles parmi ces copies, avec des extrémités 5' et 3' entières qui permettent le repliement d'un site catalytique intact (une hélice P4 entière) et d'une hélice P1 stable qui protège ce site contre la dégradation par des nucléases (iv) la localisation des transcrits de ces copies. Par la suite, on examine l'association d'une de ces deux copies à l'activité mtRNase P, tout de suite après sa purification. Aussi, vu qu'en conditions natives, dans la mitochondrie de *S. cerevisiae* (32) et *A. nidulans* (88), on observe l'organisation en complexe de la voie de maturation des pré-ARNt et les voies métaboliques, nous suggérons que la même activité se retrouve sous cette forme chez *N. crassa*, *P. anserina* et *S. macrospora*. Dans ce contexte, on vise la purification du complexe mitochondrial associé à l'activité mtRNase P et sa caractérisation.

Cette étude offre la possibilité de formuler des conclusions au sujet de changements survenus au cours de l'évolution à l'activité de la mtRNase P chez les ascomycètes. Elle permet de mieux comprendre comment l'activité de la sous-unité ARN mitochondriale a été progressivement remplacée par une copie de l'activité nucléaire.

Chapitre II : Matériels et méthodes

II. 1 La culture de *N. crassa* et isolation de mitochondries pures

II. 1. 1 La culture : *N. crassa* (souche 74-OR23-1VA) a été inoculé en milieu liquide Y-Gly pH 5.8 (0.5% m/v yeast extract, 3% v/v glycérol) à température ambiante; la croissance s'est poursuivie pendant 48 heures.

II. 1. 2 La purification de mitochondries

Après croissance, les cellules de *N. crassa* sont récoltées par filtration, écrasées doucement à 4°C avec du sable stérilisé (mélange moitié/moitié de 840-590 uM et 300-200 uM mesh, Ottawa Sand standard, Fisher Scientific), ensuite, lavées et resuspendues dans le tampon de lavage (0.7 M Sorbitol, 1.0 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl-buffer, pH 7.5). On sépare les mitochondries brutes par deux centrifugations différentielles; la première centrifugation est faite à 409 g pendant 10 min, suivie par la deuxième (faite sur le surnageant recueilli après la première centrifugation) à 14740 g pendant 10 min. Le culot de mitochondries brutes, est resuspendu ensuite dans un volume minimal de tampon de lavage, puis chargé sur un gradient discontinu de sucrose et centrifugé à 4°C, pendant 120 min à 134 000 g (**Fig. II. 1** et **Fig II. 2**). Après ultracentrifugation, on récupère les mitochondries (entre 36% et 60% sucrose, bande orange-brune **Fig. II. 2**), on les dilue 4 fois dans un volume d'eau ultra pure, et on les concentre à nouveau par centrifugation à 13170 g, 15 min à 4°C. À la fin, le poids du culot est noté. À partir de cette étape, on traite le culot obtenu de la façon suivante : 10 mg mitochondries/ml (concentration finale) sont traitées avec 0.1% digitonine (10% solution stock, no cat. : D141, Sigma-Aldrich) pendant 10 minutes sur glace, avec agitation. Le volume des mitochondries traitées à la digitonine, est dilué 7 fois dans le tampon de lavage. Les mitochondries sont concentrées à nouveau par centrifugation (13170 g, 15 min à 4°C) et resuspendues encore une fois dans un volume minimal de tampon de lavage. Subséquemment, on fait le traitement avec 50 µg/ml protéinaseK (10 mg/ml solution stock, no cat. : P2308, Sigma-Aldrich) 20 min, la désactivation de l'enzyme pendant 10 min avec 1mM PMSF (1M solution stock), la reisolement des mitochondries par centrifugation (13170 g, 15 min) et le dernier lavage des mitochondries (deux centrifugations différentielles comme déjà mentionné ci-dessous); toutes ces manipulations sont faites à 4°C (89). À la fin, les mitochondries pures récupérées sont

pesées et stockées à -80°C pour utilisations subséquentes. Pour différentes sous-fractions cellulaires (lysats total, lysat cytoplasmique et mitochondries intactes - recueillies avant faire leur rupture mécanique) on prélève divers volumes (équivalents à 5 mg de mitochondries) (en rouge, **Fig. II. 1**); ces aliquotes sont utilisées ultérieurement pour extraire l'ARN et faire le RT PCR.

II. 2 La séparation de la matrice mitochondriale soluble et des membranes mitochondriales

On extrait la matrice mitochondriale soluble à partir du lysat mitochondrial, obtenu par l'ouverture d'environ 850 mg de mitochondries pures. Cette ouverture implique la rupture mécanique de mitochondries à 4°C en les secouant au vortex (en 10 reprises de 60s chacune) en présence d'un mélange moitié/moitié de billes de verre (125-212 microns et 425-600 microns, Sigma-Aldrich) et d'un 1 ml de tampon d'extraction (50 mM Bis-Tris/HCl pH: 7.5, 100 mM NH₄Cl, 10 mM MgCl₂, 10% glycérol). Par la suite, on sépare les billes de verre du lysat mitochondrial, et après on ramasse les membranes mitochondriales (culot) et la matrice soluble (surnageant) par deux centrifugations différentielles à 4°C; la première centrifugation est faite pendant 5 min à 12900 g, suivie par la deuxième (faite sur le surnageant recueilli après la première centrifugation) à 20800 g pendant 30 min. Le culot membranaire et la matrice soluble sont stockées à -80°C pour des utilisations ultérieures. Encore, pour les différents sous-compartiments mitochondriaux (des mitochondries non ouvertes, des membranes mitochondriales et extrait matriciel mitochondrial) on recueille des aliquotes (en rouge, **Fig. II. 1**) qui seront utilisées ultérieurement pour extraire l'ARN et faire le RT PCR; le volume pour chaque aliquote est l'équivalent de 5 mg de mitochondries pures.

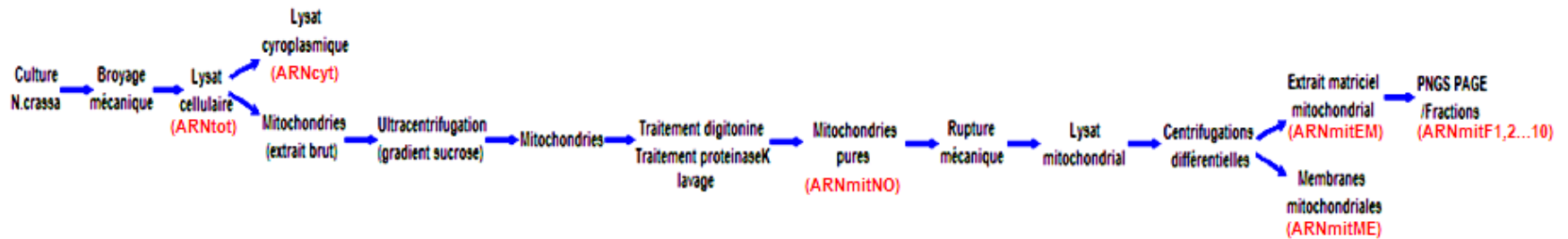


Figure II. 1 Schéma expérimental de l'étude chez *N. crassa*. Approche expérimentale utilisée pour confirmer la transcription, l'intégrité des extrémités 5' et 3' et la localisation des transcrits Nc1 et Nc2 de deux copies du gène nucléaire *rnpB*. En rouge on montre les endroits où des aliquotes de diverses sous-fractions cellulaires sont prélevées pour être utilisées ultérieurement à extraire l'ARN et faire le RT PCR. ARN_{tot} : ARN isolé à partir du lysat total, ARN_{cyt} : ARN isolé à partir du lysat cytoplasmique, ARN_{mitNO} : ARN isolé à partir des mitochondries pures intactes (récoltées avant de faire leur rupture mécanique), ARN_{mitEM} : ARN isolé à partir de l'extrait matriciel mitochondrial, ARN_{mitME} : ARN isolé à partir des membranes mitochondriales, ARN_{mitF1-10} : ARN isolé à partir des fractions de la matrice mitochondriale soluble, obtenues par PNGS-PAGE.

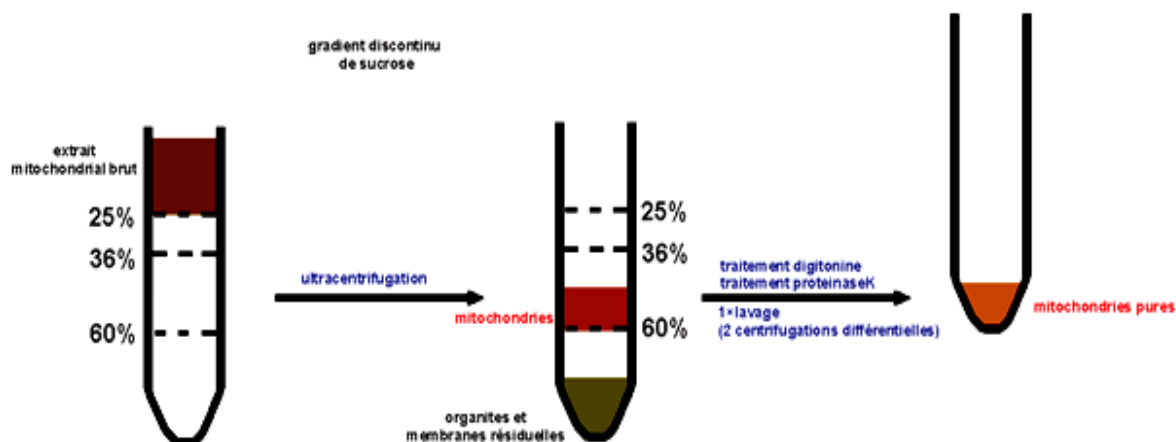


Figure II. 2 Isolation de mitochondries pures à partir de l'extrait mitochondrial brut. L'extrait mitochondrial brut, resuspendu dans 10 ml tampon lavage, est déposé au-dessus d'un gradient discontinu et ultracentrifugé. Le gradient est préparé en déposant, l'une par-dessus l'autre, dans des tubes Beckman (25×89mm), trois solutions de sucrose de densités différentes (60% (9ml), 36% (8ml) et 25% (3ml)), l'une par-dessus l'autre, dans des tubes Beckman (25×89mm). Après ultracentrifugation, les mitochondries sont récupérées entre 36% et 60% sucrose (bande orange-brune), diluées dans l'eau ultra pure et reculottées par centrifugation. Les mitochondries pures sont obtenues à la fin après des traitements avec digitonine, protéinaseK et des centrifugations différentielles (1 fois lavage).

II. 3 Le PNGS PAGE (Preparative Native Gel Stripe PAGE)/ le gel préparatif non dénaturant : gradient discontinu de polyacrylamide intercalé avec glycérol

PNGS PAGE est une méthode développée dans notre laboratoire pour permettre l'isolation des complexes protéiques. Cette approche repose sur l'alternance d'un gradient discontinu de polyacrylamide non dénaturant (de 4.5% jusqu'à 14%) et d'un tampon glycérol (60% glycérol, 50 mM Tricine, 15 mM Bis-Tris) (**Fig. II. 3**). Les différentes concentrations de polyacrylamide sont préparées à partir d'une solution stock de polyacrylamide 49.5% (48 g Roche acrylamide ultra-pure et 1.5 g BioRad N, N'-Méthylène-bis-Acrylamide dissouts dans 100 ml d'eau ultra pure). Chacune des solutions contient le pourcentage de polyacrylamide correspondant, 20% glycérol et 1× tampon CN PAGE (0.5M acide aminocaproïque, 50 mM Bis-Tris, pH7 à 4°C) (34).

Pour la préparation du gel, on coule 1 ml de polyacrylamide 14% et on le laisse polymériser. Ensuite, on ajoute 0.8 ml du tampon glycérol par-dessus. Après, 1 ml de polyacrylamide 13% est coulé et polymérisé, et on ajoute un autre volume de 0.8 ml du tampon au-dessus. De la même façon, comme dans le cas du 13%, 14%, on coule le gradient jusqu'à la concentration de polyacrylamide 4.5% (**Fig. II. 3**). Le gel est ensuite migré à 4°C pendant la nuit, à un voltage constant de 80V dans une unité d'électrophorèse SE 400 (18×16cm) (no cat. : SE-400-15-1.5, Hoefer). Un volume, équivalent à environ 790 mg de mitochondries pures, de la matrice mitochondriale soluble a été chargé sur le gel. On utilise deux tampons de migration: 1× tampon cathode (50 mM Tricine, 15 mM Bis-Tris, pH7 à 4°C) et 1× tampon anode (50 mM Bis-Tris, pH7 à 4°C). Après migration, 10 fractions glycérol ont été prélevées (~0.6 ml chaque, l'équivalent d'environ 20 mg de mitochondries pures par fraction). Une partie de chaque fraction (volume équivalent à une quantité de 5 mg de mitochondries pures) est retenue pour extraire l'ARN et pour faire le RT PCR (**Fig. II. 1**), le reste est soit utilisé immédiatement ou stocké à -80°C pour d'autres expériences.

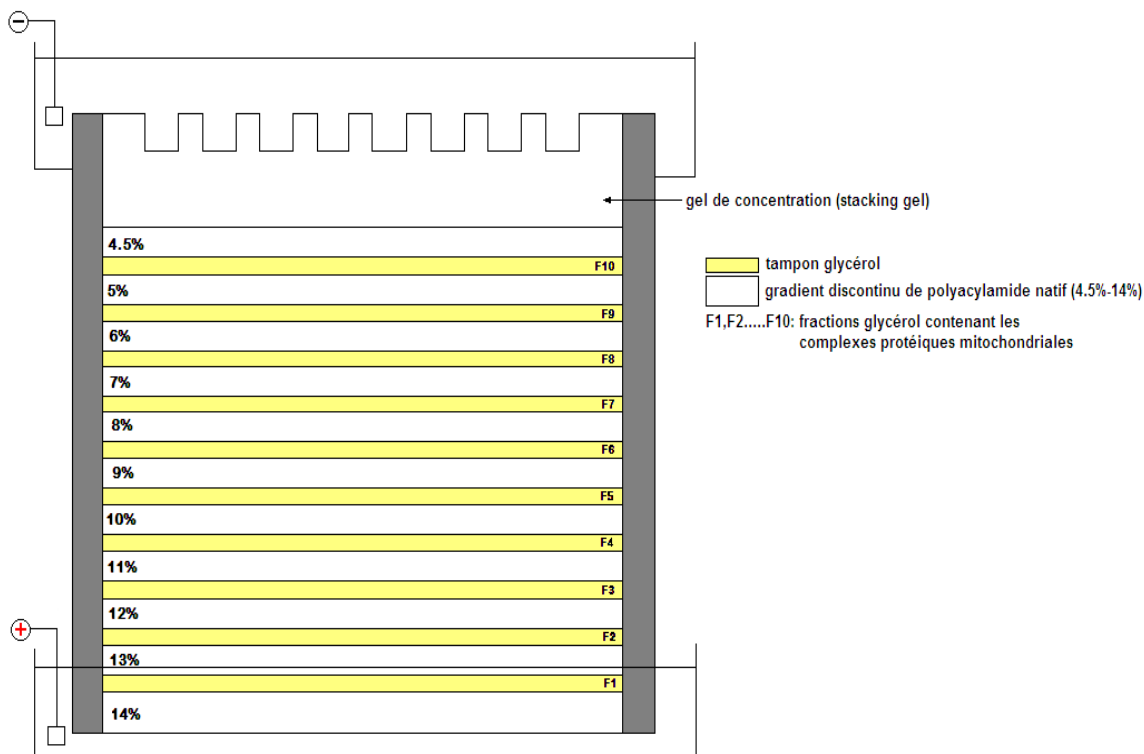


Figure II. 3 PNGS PAGE (Preparative Native Gel Stripe PAGE)/gel préparatif non dénaturant : gradient discontinu de polyacrylamide intercalé avec glycérol. Méthode développée dans notre laboratoire pour permettre la purification des complexes protéiques. Elle repose sur les mêmes principes que le BN PAGE régulier. Dans cette approche, le fractionnement préparatif des complexes protéiques est accompli en utilisant une série discontinue des bandes d'acrylamide non dénaturantes (de 4.5% jusqu'à 14%), entrelacées avec du tampon glycérol (60%). Le tampon glycérol permet la récupération facile, après migration, des fractions qui contiennent les complexes. Cette méthodologie permet la séparation des complexes (1 à 4 par fraction) ayant de propriétés de migration similaires, la préservation de leur intégrité ainsi que la minimisation des artefacts de préparation (34).

II. 4 La préparation « in vitro » et marquage radioactif du substrat pré-ARNt^{ProlineCCA}

La préparation du substrat est faite de la façon suivante. L'ADN du pré-ARNt^{ProlineCCA} de *Reclinomonas americana*, inséré dans le vecteur pFBS/EcoRV (2.9 kb), est amplifié par PCR (en utilisant les amorces 5'-GAAATTAATACGACTCACTATAGGGTAACGTAATGTAAAAGGTT-3' et 5'-TGGTCGGGATGACGTGATTTGAACA-3') et quantifié. De cet ADN, on utilise 200 ng pour faire une transcription *in vitro* et obtenir un substrat radioactif pré-ARNt^{ProlineCCA}. La transcription est faite avec 2U/ml T7 RNA polymérase (no cat : 18033-019, Invitrogen) dans 20 µl volume de réaction contenant 1× tampon T7 RNA Polymérase (no cat. : Y90108, Invitrogen), 10 mM DTT (no cat. : Y00147, Invitrogen), 0.5 mM ATP, GTP, UTP, CTP (no cat. : 28-4065-51, GE Healthcare), 1U/µl SUPERase•InTM (no cat.: AM2694, Ambion) et 20 µCi du [α -³²P] ATP (3000 Ci/mmol, Perkin Elmer). Après incubation pendant la nuit à 37°C, on ajout un tampon-stop (8M URÉE, 1× TBE, 140 mg de bleu bromophénol et de xylène cyanol) pour interrompre la transcription. Après, l'échantillon est dénaturé 5 min à 65°C, chargé sur un gel dénaturant 10% polyacrylamide/7M URÉE et migré pendant 4 heures à 200V à la température ambiante. Après migration, on coupe la bande de 117 nt du substrat pré-ARNt^{ProlineCCA} et on la incube pendant la nuit à 37°C dans un volume de 400 µl 0.1% SDS. À la fin, on élimine le détergent par précipitation avec du NaCl (1M) et on précipite le substrat marqué avec 0.5M NaOAc/95% éthanol.

II. 5 Le test d'activité de la mtRNase P

On prépare les tests enzymatiques dans un volume de réaction de 20 µl contenant : 30 mM HEPES-OH (ph 7.6), 6 mM MgCl₂, 30 mM KCl, 2 mM DTT, 25 µg/ml BSA, 1% PEG, 1 U/µl SUPERase•InTM (no cat. : AM2694, Ambion), 40000 cpm du substrat purifié pré-ARNt^{ProlineCCA} et soit, 2µl de chaque fraction prélevée après migration sur le gel PNGS PAGE, soit 1µl du contrôle positif ARN M1; les réactions sont incubées 30 min à 37°C, arrêtées après par extractions phénol/chloroforme, précipitées avec NaOAc/éthanol en présence des 0.5 µg/ml d'ARN de transfert de la levure (Sigma),

migrées sur un gel dénaturant 8% polyacrylamide/7M URÉE (4h, à 200V à la température de la pièce) et soumises à l'autoradiographie (~12h).

Pour le contrôle positif ARN M1, on utilise le plasmide contenant le gène de l'ARN M1 (fourni par Sidney Altman) pour faire la transcription *in vitro*; cette transcription est faite de la même façon que pour le substrat sans ajouter l'isotope radioactif. L'ARN M1 résultant est purifié sur une colonne « illustra MicroSpin G-50 » (selon le protocole de la compagnie GE Healthcare), précipité deux fois dans 0.5 M NaOAc/95% éthanol, lavé avec 80% éthanol et stocké dans l'eau ultra pure à -80°C. Avant utilisation, on préchauffe l'ARN M1 (~10nM) 5 min à 65°C et on le refroidit doucement à la température de la pièce pour un repliement adéquat. Par la suite, on l'active 5 min à 37°C dans le tampon de réaction auquel on a ajouté 100mM de MgCl₂. Après activation, on ajoute le substrat radioactif (40000 cpm), et le test d'activité de la RNase P pour le contrôle positif est traité comme déjà mentionné ci-dessus.

II. 6 La préparation du gel gradient continu, non dénaturant de polyacrylamide

Le gel gradient (4%-14%) est préparé à l'aide d'un « gradient maker » (no cat. : SG30, Hoefer), et coulé dans une unité d'électrophorèse SE 400 (18×16cm) (no cat. : SE-400-15-1.5, Hoefer), en suivant les instructions fournies par la compagnie (<http://www.hoeferinc.com/downloads/SE400-IMA0.pdf>). La préparation des solutions de polyacrylamide, 4% (18ml) et 14% (15ml), est faite comme dans section II. 3.

Après préparation du gel, on le laisse polymériser à la température de la pièce pendant 60 min. Par la suite, on ajoute un gel de concentration de 4% polyacrylamide et on laisse encore polymériser 45 min à la même température. Après polymérisation, pour chaque fraction prélevée par PNGS PAGE (F1, F2...F10), on charge sur gel un volume équivalent à 2 mg de mitochondries pures. Le gel est migré à 4°C, pendant la nuit à 100V dans les mêmes tampons de migration que ceux utilisés pour PNGS PAGE (section II. 3). Après migration, on colore le gel avec « SYPRO® Ruby Protein Gel Stain » (no cat: S12000, Invitrogen) selon le protocole fourni (MP 12000, Invitrogen); les complexes protéiques sont visualisés à 300 nm sur une source d'ultraviolet (UV).

Après visualisation, on coupe la bande du complexe protéique et on la congèle à -80°C , ou on l'envoie en spectrométrie de masse.

II. 7 L'analyse de la composition du complexe protéique par LC MS/MS

La bande de polyacrylamide contenant le complexe protéique est coupée du gel et digérée avec trypsine. Après digestion, l'identification des protéines est faite par LC MS/MS. Tous ces travaux sont accomplis par le service de séquençage de l'Université de Montréal (IRIC) incluant l'annotation fonctionnelle par Mascot. Trois analyses LC MS/MS différentes ont été faites pour le complexe; à la fin nous avons gardé les protéines identifiées trois et deux fois (avec des scores de protéines ≥ 20), plus quelques protéines qui ont été identifiées une fois, mais à partir d'au moins deux peptides et avec un score de protéines ≥ 20 ; ce score représente le seuil à partir duquel les résultats obtenus après LC MS/MS seront encore considérés significatifs (<http://www.matrixscience.com>).

II. 8 L'extraction des ARN

Les volumes prélevés à partir de l'extrait total et pour différentes sous-fractions cellulaires (marqués en rouge, **Fig. II. 1**) sont utilisés pour extraire l'ARN. On purifie l'ARN en utilisant le RNeasy Plus Universal Mini Kit selon le protocole fourni par la compagnie (no cat: 73404, QIAGEN). Différents volumes de chaque extrait d'ARN purifié, correspondants à différentes quantités équivalentes de mitochondries pures, sont traités après avec la DNase I (10 U/ μl , compagnie, no cat: 27-0514, Amersham Biosciences) ou la TURBO DNase™ (2 U/ μl , no cat. AM2238, Ambion) selon le protocole fourni par la compagnie. Ensuite, on les utilise pour d'autres traitements (ligation et/ou traitement par TAP) ou pour faire directement le RT PCR.

II. 8. 1 L'obtention des ARN non traités par TAP, non circularisés, juste traités à la DNase (ARN_{nd})

Après sa purification avec la colonne QIAGEN, pour une partie d'ARN total, on fait un traitement à la DNase I (10 U/ μl , compagnie, no cat: 27-0514, Amersham Biosciences) pour enlever toute trace d'ADN. La réaction enzymatique est faite à 37°C ,

pendant 30 minutes dans 100 μl volume final. Contenu réaction enzymatique: d'ARN \sim 8 μg , 40 mM Tris-Cl pH7.5, 6.2 mM MgCl_2 , 0.3 U/ μl DNase I et de l'eau millipore jusqu'à 100 μl volume final. Après le traitement à la DNase I, on fait une extraction phénol/chloroforme des ARN.

II. 8. 2 L'obtention des ARN non traités par TAP, circularisés et traités à la DNase (ARN_{nd})

On traite une partie d'ARN total (obtenu après la purification sur la colonne QIAGEN) par T4 RNA ligase (10 U/ μl , no cat : 00026296, Fermentas). La réaction enzymatique est faite à 37°C, pendant une heure et demie dans un volume final de 50 μl . Contenu de la réaction enzymatique : les ARN \sim 8 μg , 1 \times tampon de réaction pour la ligase, 3.3 mM ATP, 0.01 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ BSA, 0.24 U/ μl ligase et de l'eau millipore jusqu'à 50 μl .

Après, l'enzyme DNase I 0.15 U/ μl est ajoutée et on laisse encore 30 minutes à 37°C. Ces réactions enzymatiques sont suivies par une extraction phénol/chloroforme des ARN traités.

II. 8. 3 L'obtention des ARN traités par TAP, circularisés et traités à la DNase (ARN_{td})

Pour une partie des ARN totaux (obtenus après la purification sur la colonne QIAGEN), on enlève la protection à l'extrémité 5' avec l'enzyme Tobacco Acid Pyrophosphatase, TAP (10 U/ μl , no catalogue : T19050, EPICENTRE biotechnologies) dans un volume final de 20 μl . La réaction enzymatique est faite à 37°C, pendant 2 heures. Contenu de la réaction enzymatique: des ARN \sim 8 μg , 1 \times tampon de réaction pour TAP, 0.35 U/ μl l'enzyme TAP et de l'eau millipore jusqu'à 20 μl volume final.

Ensuite, pour les ARN traités par TAP, on fait le traitement à la T4 RNA ligase (10 U/ μl , no cat : 00026296, Fermentas). Cette réaction enzymatique est faite dans les mêmes conditions que celles de la section II. 8. 2; la réaction enzymatique contient 20 μl ARN traités par TAP, 1 \times tampon de réaction pour la ligase, 3.3 mM ATP, 0.01 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ BSA, 0.24 U/ μl ligase et de l'eau millipore jusqu'à 50 μl .

Après, on ajoute l'enzyme DNase I 0.15 U/ μ l et le traitement est fait comme avant (section II. 8. 2). Ces réactions enzymatiques sont aussi suivies par une extraction phénol/chloroforme des ARN traités.

II. 9 Le RT PCR

II. 9. 1 La RT

Conditions de réaction : Des tubes contenant différentes quantités des ARN, avec 1 pmole d'amorce complémentaire de Nc, sont complétés avec de l'eau millipore pour avoir un volume final de 14 μ l. Ensuite, on les met 3 minutes à 80°C et 5 minutes sur glace. Après, on ajoute 1 \times tampon de réaction pour RT, 1mM dNTPs et 0.125 U/ μ l l'enzyme reverse transcriptase, AMV (25U/ μ l, no cat: 11495062001, Roche) afin d'avoir en volume final de réaction de 20 μ l, et la réaction est incubée une heure à 45°C. Une deuxième réaction est faite après – 3 minutes à 80°C, 5 minutes sur glace, rajout de 0.125 U/ μ l de RT AMV et encore une heure d'incubation à 45°C.

II. 9. 2 Le PCR

Conditions de réaction : 2 μ l ADNc obtenu après RT, 1 \times PCR tampon de réaction sans MgCl₂, 2 mM de MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, RNase 0.02 mg/ μ l, amorces directes et complémentaires 0.5 mM et 1.7 U de l'enzyme High Fidelity PCR System (no cat: 11 732 650 001, Roche) dans un volume final de 50 μ l.

Conditions d'amplification : PCR (18, 21, 24, 27, 30, 33, 36, 38 cycles): 95°C x 5 min, 88°C x 3 min. 95°C x 15 s, Tm-5°C x 15s, 72°C x 15s.

Après amplification PCR, les produits obtenus sont séparés et visualisés sur 4% agarose MetaPhor® (no cat : 50181, Lonza) ou sur 1.1% agarose.

Les séquences génomiques, les amorces internes communes (en rouge, Fig. II. 4) et les amorces spécifiques, désignées pour amplifier les extrémités 5' et 3' (en bleu-marin, Fig. II. 5) pour Nc1 et Nc2:

>Nc1

5'CCTCTCTTTTTCCCTTTTTTCTCTCCTCGTGAAGCCTCGTCCTCTTCAAC
 GCTGCGTTTCTATGCTACGAACGGAGAGACTCGCGCAAGCGTGTCTTTC
 ACACCTTTTCCTTCGGGAAAACACTTTCTACCA**GGCATATGAGAAATTC**
GGAGAAATCGCTTCACTTTCAGCCTACAATCATCAGGTCCACCTGGTGT
 TTGGCTCTGCCGGCACGGTCTGCGCGTGATCCTCGCGTCTGTAATTGGC
 ATCAGAAAAGCAGGGCGCTGAGCTCCTCTGGTCGCTTGCGATCGGGGA
 TAGTTTCAGCGTTTCTCTGGGAGGGCCATTACGAAGCTTGTGAATGAA
 ATCACTTGAGTGCAATACGCAGCGTGCATGCCCGTTACTCCCCTTTCGA
 GAGGAGGATGGACTGCACAATTCGAT**TCCGATTACTCTGTTGAGGACG**
 AGGTTTCACCACCCCTTTCATTG 3'

>Nc2

5'CCAAGTGCAGTACTTCTTTCCTCTTTCCTCCCCGTGAAGCTTCGTCCTC
 TTCAATGCTGCGTTTCTATGCACCAACGGAGAGTTCTGCCTCGGCAGTC
 CTTTCATCAT**GGCATATGAGAAATTCGGAG**AAATCGCTTCACCTTCAGC
 CACCCCTCT**GATCGCGTCAGGGTCGGCTCACTCCGGTGGCCTGGCTTT**
 GTCAAGATTGAGGAGCTGCTGCCGGCAACGGTCTCACGCGATACTGCG
 TGGGTAATTGGCATCAGAAAAGCAGGCGGCTATCCTAAGCGGACAAGC
TGACGGTGTAGTCGCCCTCTGGGAGAGCCATTACGAAGCTTGTGGGTA
 GAATCACTTCAGTGCAATACGCAGCGTGCGGTGTCTATCTTCTTCTGGG
 CAGACCTGTACAATCCGAT**TCCGATTACTCTGTTGAGGACGAAGCTTCA**
 CCACCCTTTTCTTCTC3'

Nc1/Nc2- direct commune : 5'**GGCATATGAGAAATTCGGAG**3'

Nc1/Nc2- complémentaire commune : 5'**GGCATATGAGAAATTCGGAG**3'

Nc1 compl. extrémités : 5'**AGGTGGACCTGATGATTGTAG**3'

Nc1-directe extrémités : 5'**CTCTGGTCGCTTGCGATCGGGG**3'

Nc2 compl. extrémités : 5'**TGAGCCGACCCTGACGCGATC**3'

Nc2-directe extrémités : 5'**GCTATCCTAAGCGGACAAGCTG**3'

Le clonage des fragments PCR

Réparation des extrémités 5' et 3' des produits PCR: On ajoute 2 unités de T7 DNA polymérase (3 U/ μ l, New England Biolabs) et 2 unités de Klenow (2 U/ μ l, Roche) au mélange PCR et on incube 30 minutes à 12°C. On désactive les enzymes en ajoutant 10 mM EDTA et en incubant encore 10 minutes à 65°C. Les échantillons sont laissés refroidir doucement avant d'être utilisés.

Purification des fragments PCR: On migre 0.25-1 μ g de chaque produit PCR sur un gel d'agarose 1.1% et on coupe les bandes d'agarose, contenant les produits PCR. Ces bandes sont transférées par la suite dans des microtubes et congelées au moins 30 min à -20°C. On centrifuge les échantillons après à la température de la pièce durant 15 min à 14000 rpm et le liquide est récupéré. À la fin, on estime la concentration de l'ADN sur un gel d'agarose 1.1% à l'aide du marqueur de concentration λ Hind III.

Phosphorylation : La réaction enzymatique est préparée dans un volume final de 10 μ l et elle se poursuit durant 30 minutes à 37°C. On désactive l'enzyme à 65°C pendant 20 minutes et les échantillons sont laissés refroidir doucement avant d'être utilisés. La réaction de phosphorylation contient: 50 ng de fragment d'ADN purifié (si c'est nécessaire de concentrer l'ADN réduire le volume « au speed vac »), 1 mM ATP, 1 \times tampon Kinase et 5 unités T4 polynucleotide kinase (USB). Le tampon Kinase 10X contient : 500 mM tris pH 7.6, 100 mM MgCl₂, 1 mM spermidine HCl, 50 mM DTT, 1 mM EDTA;

Ligation : conditions de réaction : 5 ng/ μ l ADN en tenant compte de ratio molaire insert phosphorylé/vecteur - 2 inserts/1 vecteur pBFL6, 1 \times tampon de ligation, 1 \times ATP et 0.15 U/ μ l T4 DNA ligase (Roche) sont incubés 16 heures à 14°C, puis la réaction est arrêtée avec de 10mM EDTA; le tampon ligase 10X contient : 200 mM Tris pH 7.6, 50 mM MgCl₂, 50 mM DTT; le plasmide pBFL6 est la version modifiée au laboratoire du plasmide commercial « pBluescript »; ce vecteur contient le gène *lacZ* permettant la sélection bleue /blanche quand il est exprimé chez la bactérie (90);

Transformation : Pour la transformation, 2-3 ng de produit de ligation (vecteur+insert) est pris, on complète avec du TE pour avoir à la fin un volume de 10 μ l et on garde les

tubes sur glace. Après, on ajoute 200 µl de cellules *Escherichia coli* souche DH5α compétentes, on les laisse sur glace 20 minutes, puis on fait un choc thermique à 42°C, 30 secondes et on les met de nouveau sur glace 2 minutes. Ensuite, 1 ml de milieu liquide LB est ajouté et incubé à 37°C pendant 40 minutes. Après 40 minutes on fait un spin (3 minutes à 3000 rpm) et on jette le milieu en laissant ~ 200 µl. Les bactéries sont resuspendues dans le volume restant et sont étalées sur 4 pétris (milieu de culture LB solide additionné de Cam + tet+/+IPTG /X-gal); les pétris sont incubés à 37°C, 20 heures. Après, les pétris sont mis à 4°C pour arrêter la croissance et pour augmenter la coloration (~ 2 heures); le milieu LB solide (pH 7.5) contient: 1% Bacto tryptone, 0.5% extrait de levure, 1% NaCl, 1.5% agar, 10 mg/l chloramphénicol, 5 mg/l tétracycline, 0.018 mM IPTG et 0.04 mg/l X-gal; le X-gal sert à faire la sélection de colonies blanches et bleues : les blanches contiennent l'insert, les bleues contiennent le vecteur sans l'insert.

Repiquage : On repique des colonies blanches dans un bloc de culture à 96 puits, 850 µl de milieu LB liquide/puits. Le bloc est mis à 37°C avec agitation, 20 heures; le milieu de culture liquide LB (pH 7.5) contient : 0.5% Bacto tryptone, 0.25% extrait de levure, 0.5% NaCl, 1× M9 (stock 10X), glycérol 2% (stock 50%), chloramphénicol 5 µg/ml.

Préparation de l'ADN double brin : Le Kit QIAprep 96 turbo MiniprepKit de QIAGEN est utilisé en suivant le protocole de la compagnie (No. De catalogue : 27193). L'extraction d'ADN est suivie d'une réaction de séquençage. Le séquençage est fait de façon automatique par le service de séquençage de l'Université de Montréal (IRIC). Les résultats sont obtenus sous forme de fichier informatique et chromatogramme, et sont analysés sur plateforme UNIX avec les programmes typiques d'analyse de séquences FASTA et Consed. Ce dernier est un programme développé pour l'assemblage des séquences ADN après séquençage automatique; il permet l'alignement des plusieurs séquences, leur visualisation et leur analyse en comparaison avec une séquence consensus (91).

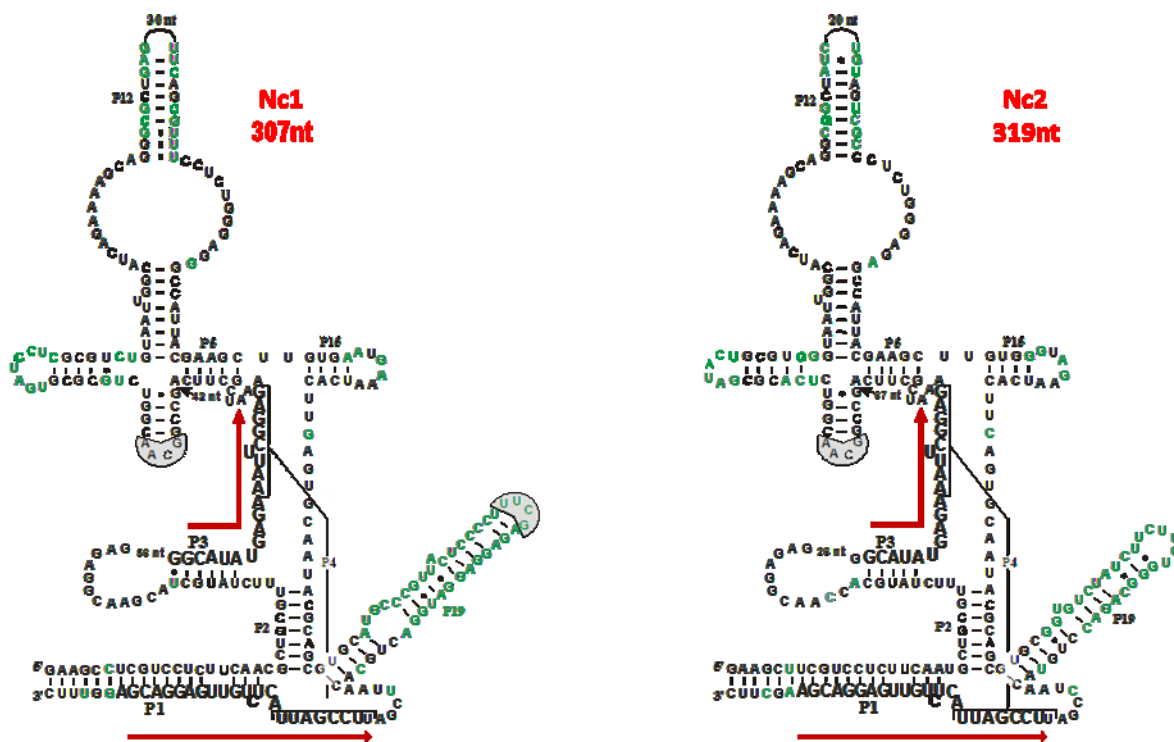


Figure II. 4 Amorces internes communes désignées pour vérifier l'expression et la localisation des transcrits Nc1 et Nc2, chez *N. crassa*. Des amorces ont été choisies (marquées avec des flèches rouges, en caractères plus grands) dans les régions internes communes aux deux P-ARN. L'utilisation de ces amorces donne une dynamique d'amplification PCR équivalente pour les deux copies, étant donné qu'on a les mêmes conditions de réaction, et, en même temps, elles permettent l'obtention de produits RT PCR de taille différente, qui peuvent être séparés et analysés après, sur un gel d'agarose MetaPhor®. Cette agarose permet la séparation et la visualisation des fragments PCR, RT PCR ayant jusqu'à 2% différence de taille entre eux. En noir on représente les nucléotides communs entre Nc1 et Nc2. En vert on a les nucléotides qui diffèrent entre Nc1 et Nc2.

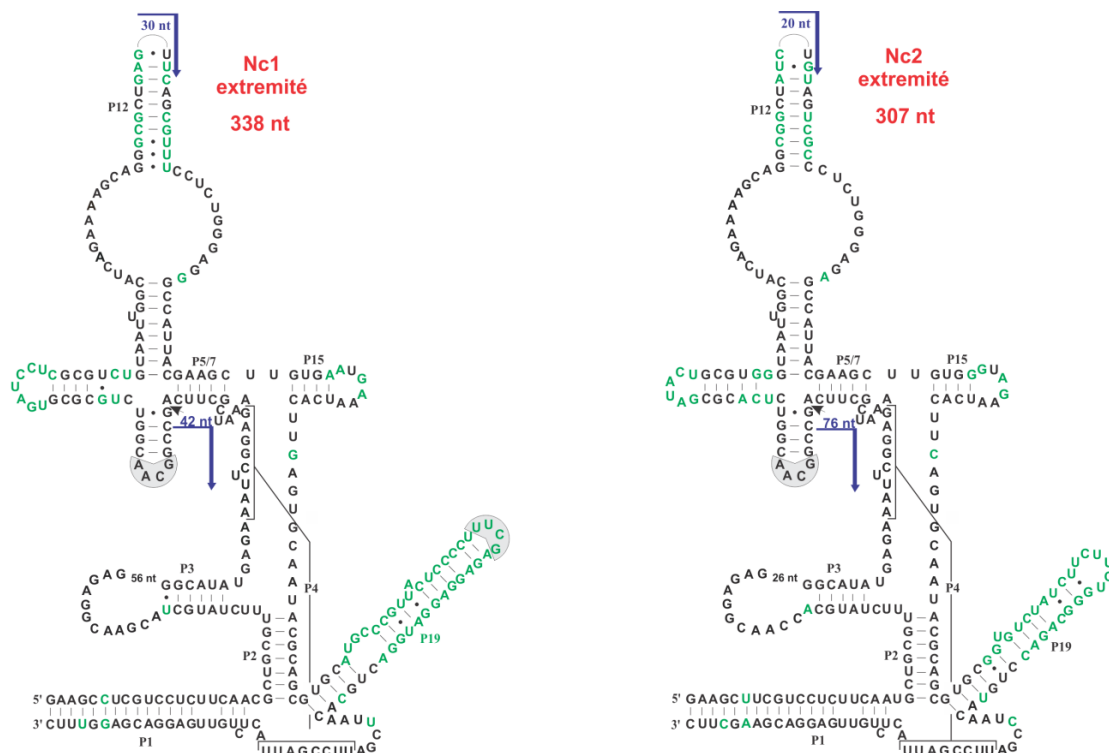


Figure II. 5 Amorces spécifiques à Nc1 et Nc2, désignées pour vérifier l'intégrité des extrémités 5' et 3' des transcrits de ces copies chez *N. crassa*. Ces amorces (marquées avec des flèches en bleu-marine) ont été choisies, pointées vers l'extérieur des deux molécules dans des régions spécifiques, qui présentent plus de variabilité au niveau de la taille et du contenu nucléotidique (les hélices P12 et les nucléotides retrouvés après l'hélice P5/7) chez les deux P-ARN. Elles couvrent aussi les régions de séquence primaire des hélices P4 et P1, en permettant la vérification de leur intégrité, après, par séquençage. En noir on représente les nucléotides communs entre Nc1 et Nc2. En vert on a les nucléotides qui diffèrent entre Nc1 et Nc2.

Chapitre III: Résultats

Ce chapitre regroupe les résultats concernant les constituants de la mtRNase P chez *N. crassa*, *P. anserina* et *S. macrospora*. Des modèles de structure secondaire de P-ARN ont été construits à partir des séquences nucléaires du gène *rnpB* pour les trois espèces, respectivement Nc1/Nc2 chez *N. crassa*, Pa1/Pa2 chez *P. anserina* et Sm1/Sm2 chez *S. macrospora* (**Fig. III. 1**, **Fig. III. 2** et **Fig. III. 3**). Par la suite, parmi ces espèces, *N. crassa* a été choisi comme organisme modèle pour répondre aux questions soulevées dans ce projet. Ce choix est fait en se basant sur le fait que *N. crassa* présente une croissance rapide et facile et qu'elle est la mieux caractérisée parmi les champignons filamenteux.

Ainsi, chez *N. crassa*, il a été possible de (i) valider que Nc1 et Nc2 comportent des extrémités 5' et 3' entières, concordantes avec les modèles des structures secondaires construits (ii) suivre leur localisation dans l'extrait cytoplasmique et la matrice mitochondriale soluble ainsi que dans différents sous-compartiments et fractions mitochondriales, et (iii) établir quelle copie est associée avec l'activité de la mtRNase P. De plus, la purification d'un complexe natif contenant l'activité de la mtRNase P a été réalisée.

Étant donné que les deux copies d'ARN sont encodées dans le noyau et qu'une est possiblement importée dans la mitochondrie, nous avons purifié les mitochondries dans l'objectif de minimiser la contamination par les ARN cytoplasmiques (Détails - Matériels et méthodes). La présence en trace de la petite sous-unité de l'ARNr cytoplasmique nous a donné un indice concernant la pureté de l'extrait mitochondrial obtenu; par RT PCR nous avons trouvé qu'il est près de 1000 fois moins abondant que l'ARNr mitochondrial dans la matrice mitochondriale.

La séparation d'un complexe natif contenant l'activité mtRNase P a été faite en utilisant un gel préparatif non dénaturant PNGS PAGE, un outil développé dans le laboratoire. Pour résumer, ce gel permet la séparation de la matrice mitochondriale soluble en fractions distinctes qui contiennent des complexes protéiques ayant de propriétés de migration similaires (Détails - Matériels et méthodes).

III. 1 La caractérisation des copies nucléaires du gène *rnpB*, Nc1/ Nc2, Pa1/ Pa2 et Sm1/ Sm2, retrouvées par la recherche *in silico*

Par la caractérisation de Nc1/Nc2 (*N.crassa*), Pa1/Pa2 (*P. anserina*) et Sm1/Sm2 (*S. macrospora*), nous avons ciblé trois aspects importants: leur état de conservation, leur transcription, et l'intégrité des extrémités 5' et 3'. Pour les trois espèces, l'état de conservation des copies a été vérifié en faisant la modélisation et l'analyse de leurs structures secondaires. Par la suite, la transcription et l'intégrité des extrémités 5', 3' ont été vérifiées chez *N. crassa*. Les résultats obtenus chez *N. crassa* peuvent être généralisés à *S. macrospora* et *P. anserina* compte tenu du fait que les trois espèces sont étroitement apparentées (**Fig. I. 6**) avec des cycles de vie très similaires (92-94).

III. 1. 1 La modélisation de la structure secondaire des ARN

L'analyse bio-informatique, faite avec RNAweasel (section I. 3. 4. 1), a montrée la présence de deux copies du gène nucléaire *rnpB* chez *N. crassa*, *P. anserina* et *S. macrospora*, respectivement les copies Nc1, Nc2, Pa1, Pa2, Sm1 et Sm2. Les séquences sont détectées en se basant sur des valeurs statistiques (E-values) significatives, comprises entre 1.65e-23 et 2.73e-40. Ces copies présentent une différence assez importante en séquence (33% de différence entre Nc1 et Nc2, 40% entre Pa1 et Pa2 et 30% entre Sm1 et Sm2) indicatrice d'une possible spécialisation de fonction de la RNase P. Dans ce contexte, nous avons construit des modèles de structures secondaires pour Nc1, Nc2, Pa1, Pa2, Sm1, Sm2 (**Fig. III. 1**, **Fig. III. 2**, **Fig. III. 3**) qui servent à vérifier l'état de conservation des copies par rapport au consensus universel. Nous avons regardé les différences/similitudes structurales existantes entre ces trois paires de copies et nous avons comparé les structures secondaires de Nc1, Nc2, Pa1, Pa2, Sm1, Sm2 avec celle de l'ARN de la RNase P nucléaire d'*A. nidulans* (AN_{nuc}) (**Fig. III. 4**) ; cette comparaison est faite pour identifier les homologues structuraux d'AN_{nuc} parmi les paires de copies; le modèle d'AN_{nuc} a été réalisé à partir de la séquence d'ARN retrouvée sur <http://rna.tbi.univie.ac.at/bcheck> (95). Pour la modélisation de toutes ces structures, nous avons pris en considération les éléments de structure primaire conservés à travers les espèces, CRI-V (**Fig. I. 3**) et le consensus universel de la sous-unité ARN de la RNase P (**Fig. I. 4**).

Chez *N. crassa*, les régions de structure primaire CRI-V sont présentes chez Nc1 et Nc2. Concernant leurs structures secondaires, les hélices P1, P2-P12, existant chez le consensus universel restent conservées ainsi que les hélices P15 et P19, présentes dans la structure secondaire d'AN_{nuc} (**Fig. III. 1**). La comparaison entre Nc1 et Nc2 démontre peu de variabilité au niveau des hélices P2, P3, P4, P5/7, P15, dans la région de jonction entre P7-P10, ainsi que dans la boucle interne retrouvée entre les hélices P10/11 et P12 (peu de nucléotides en vert sur la **Fig. III. 1**). La tétraboucle GNRA (N pour n'importe quel nucléotide et R pour une purine, A ou G) est maintenue chez les deux copies (**Fig. III. 1**). Cependant, plus de variation (en termes de contenu nucléotidique et de taille) est observée dans les nucléotides retrouvés avant l'hélice P5/7, ainsi que dans les hélices P12 et P19 des deux copies (**Fig. III. 1**). Plus précisément, Nc1 est plus riche en G, C que Nc2 et elle possède des hélices P12 et P19 plus grandes et plus abondantes en G et C. L'hélice P19 de Nc1 se termine par une tétraboucle UNCG (N pour n'importe quel nucléotide), un motif de structure conservé, particulièrement très stable et très commun dans les motifs d'ARN (96,97) (en gris sur la **Fig. III. 1**). Par contre, l'hélice P19 de Nc2 est plus courte, plus riche en A et U et la tétraboucle n'est pas présente (**Fig. III. 1**). Elle ressemble plus à l'hélice P19 retrouvée dans la structure secondaire d'AN_{nuc} (**Fig. III. 4**).

Chez *P. anserina* et *S. macrospora*, les modèles de structure secondaire de Pa1/Pa2 et Sm1/Sm2 montrent les mêmes particularités que celles retrouvées chez Nc1/Nc2. Les régions CRI-V et les hélices P1, P2, ...P12, P15 et P19 sont présentes. Il y a aussi peu de variation dans les hélices P2, P3, P4, P5/7, P15, dans la région de jonction entre P7-P10, ainsi que dans la boucle interne retrouvée entre les hélices P10/11 et P12 (peu de nucléotides en vert, la tétraboucle GNRA reste présente chez les deux paires de copies). On constate aussi plus de variation dans les hélices P12 et P19 (**Fig. III. 2** et **Fig. III. 3**). Comme chez Nc1 et Nc2, Pa1 et Sm1 sont plus stables que Pa2 et Sm2, et elles possèdent des P19 plus riches en G, C qui finissent avec une tétraboucle UNCG. Alors que, les P19 de Pa2 et Sm2 sont moins stables (riche en A et U) et la tétraboucle a été perdue (**Fig. III. 2**) ou remplacée par une autre tétraboucle beaucoup moins stable thermodynamiquement (96) (**Fig. III. 3**). Comme dans le cas de Nc2, ces hélices se rapprochent plus de celle retrouvée dans le modèle de structure secondaire d'AN_{nuc}.

En conclusion, cette analyse démontre que Nc1, Nc2, Pa1, Pa2, Sm1 et Sm2 restent conservées par rapport au consensus universel et que Nc2, Pa2 et Sm2 sont des homologues structuraux d'AN_{nuc}. De plus, la comparaison structurale faite entre les deux copies de chaque espèce, respectivement Nc1 et Nc2, Pa1 et Pa2, Sm1 et Sm2, révèle de variations significatives en séquence et structure du point de vue évolutif.

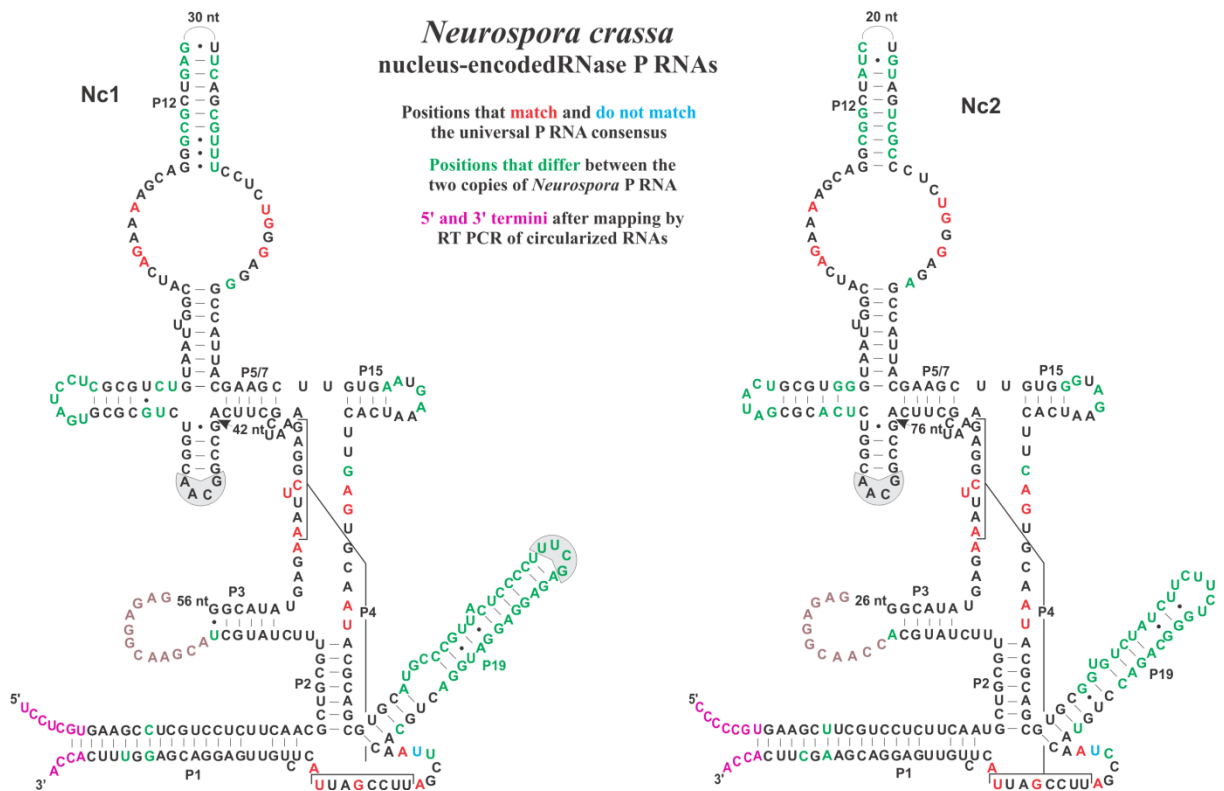


Figure III. 1 Modèle de structure secondaire pour les deux P-ARN de la RNase P, Nc1 et Nc2, chez *N. crassa*. Ces P-ARN sont encodés par deux gènes *rnpB* retrouvés dans le génome nucléaire. Rouge marque les nucléotides retrouvés dans la structure consensus universelle de P-ARN. Bleu marque les nucléotides qui ne sont pas retrouvés dans la structure consensus universelle de P-ARN. En vert sont représentés les nucléotides différents entre les deux copies. Les tétraboucles sont marquées en gris. Les liaisons U-G sont représentées par des points en noir. Les nucléotides ajoutés après cartographie aux extrémités de Nc1 et Nc2 sont marqués en rose.

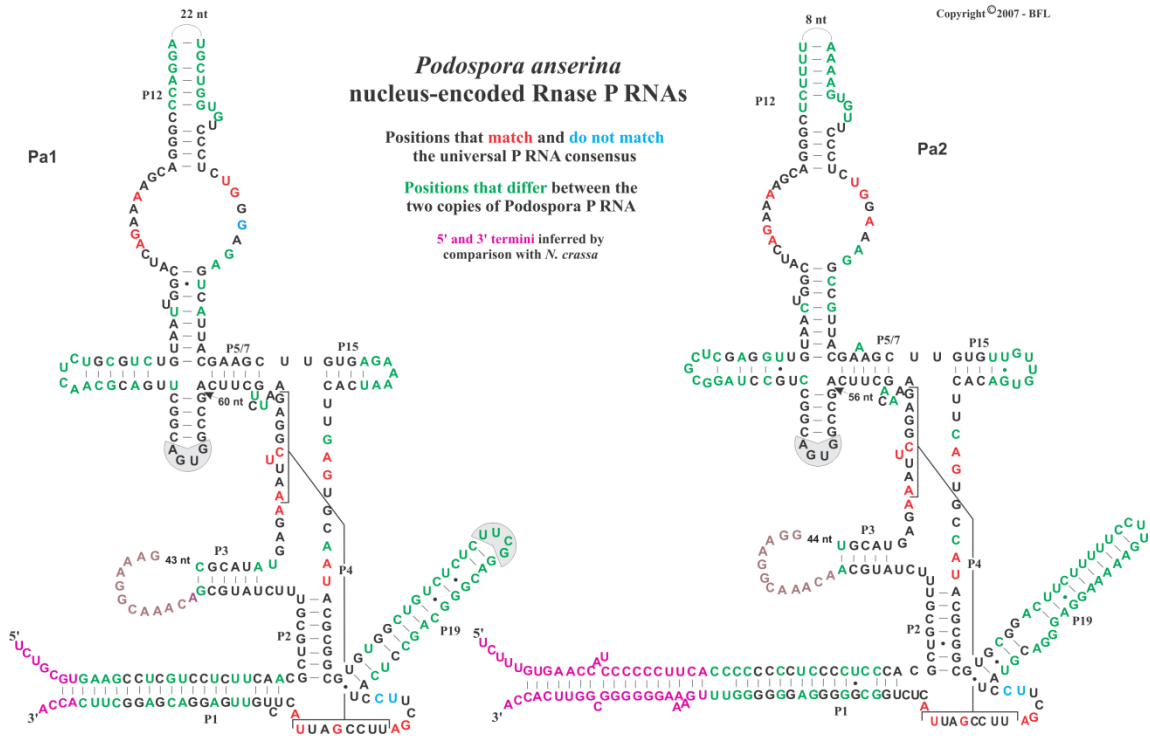


Figure III. 2 Modèle de structure secondaire pour les deux P-ARN de la RNase P, Pa1 et Pa2, chez *P. anserina*. Ces P-ARN sont codés par deux gènes *rnpB* retrouvés dans le génome nucléaire. Rouge marque les nucléotides retrouvés dans la structure consensus universelle de P-ARN. Bleu marque les nucléotides qui ne sont pas retrouvés dans la structure consensus universelle de P-ARN. En vert sont représentés les nucléotides différents entre les deux copies. Les tétraboucles sont marquées en gris. Les liaisons U-G sont représentées par des points en noir. Rose marque les nucléotides inférés en 5', 3' à partir des résultats obtenus chez *N. crassa*.

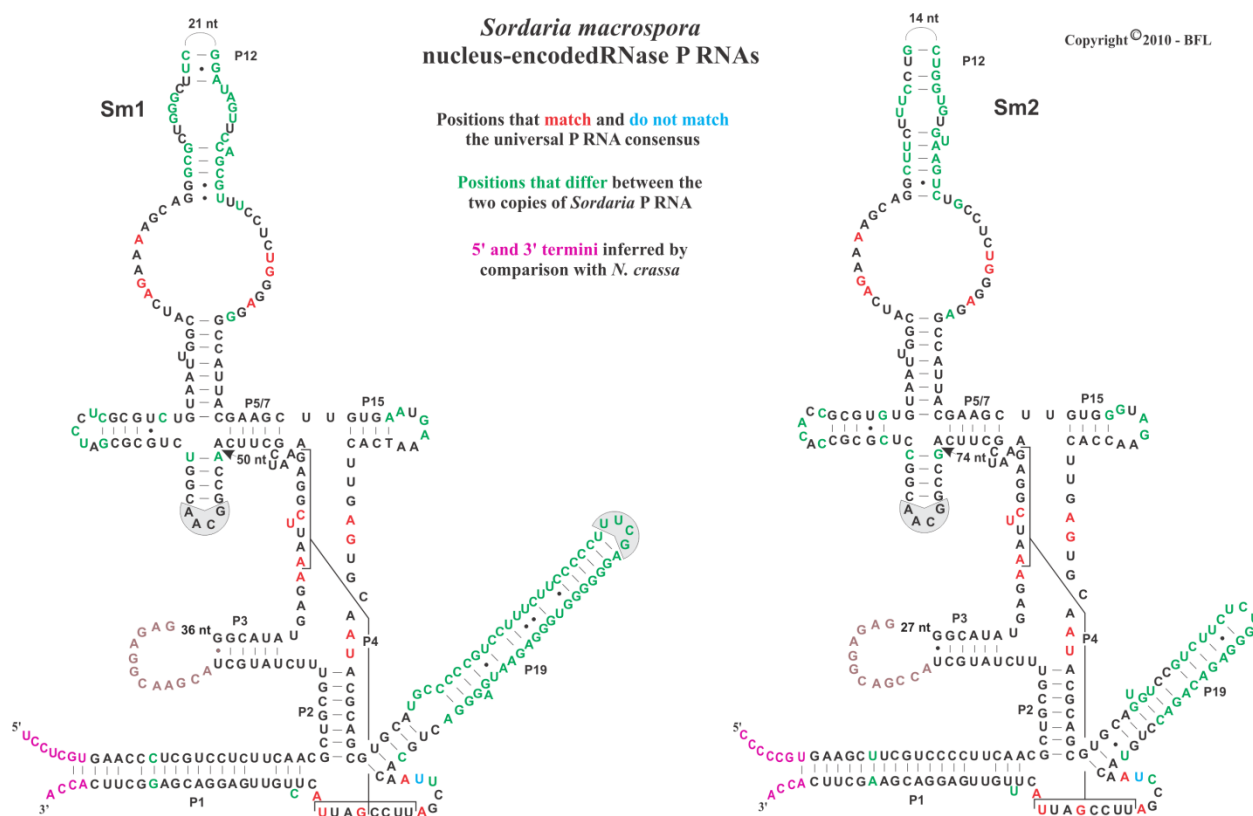


Figure III. 3 Modèle de structure secondaire pour les deux P-ARN de la RNase P, Sm1 et Sm2, chez *S. macrospora*. Ces P-ARN sont codés par deux gènes *rnpB* retrouvés dans le génome nucléaire. Rouge marque les nucléotides retrouvés dans la structure consensus universelle de P-ARN. Bleu marque les nucléotides qui ne sont pas retrouvés dans la structure consensus universelle de P-ARN. En vert sont représentés les nucléotides différents entre les deux copies. Les tétraboucles sont marquées en gris. Les liaisons U-G sont représentées par des points en noir. Rose marque les nucléotides inférés en 5', 3' à partir des résultats obtenus chez *N. crassa*.

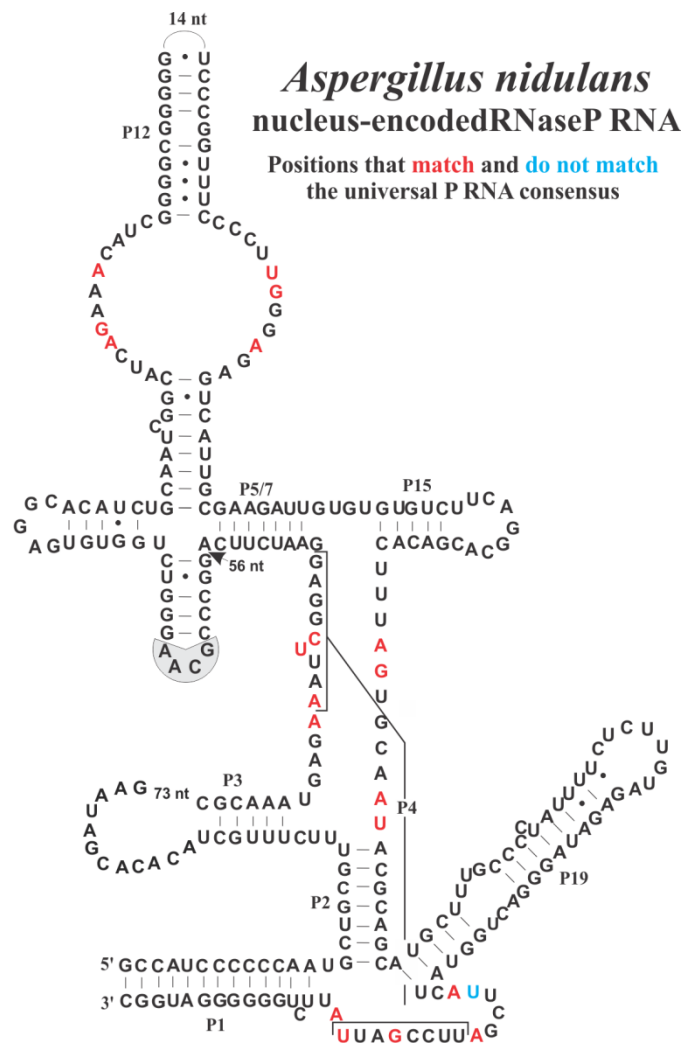


Figure III. 4 Modèle de la structure secondaire pour le P-ARN de la RNase P nucléaire, AN_{nuc}, chez *A. nidulans*. Rouge marque les nucléotides retrouvés dans la structure consensus universelle de P-ARN. Bleu marque les nucléotides qui ne sont pas retrouvés dans la structure consensus universelle de P-ARN. Les tétraboucles sont marquées en gris. Les liaisons U-G sont représentées par des points en noir.

III. 1. 2 L'expression de Nc1 et Nc2 chez *N. crassa*

L'expression de gènes Nc1 et Nc2 a été vérifiée par RT-PCR à partir de l'ARN total. Des amorces internes communes présentant une efficacité d'amplification comparable pour Nc1 et Nc2 sont utilisées (**Fig. II. 4**, Détails - Matériels et méthodes). La confirmation de la transcription, ainsi que la localisation simultanée de chacune des deux copies dans divers compartiments cellulaires sont établies à l'aide de ces amorces. Les produits RT PCR ainsi obtenus sont de tailles différentes (307 nt pour Nc1 et 319 nt pour Nc2) et peuvent être séparés et analysés sur un gel d'agarose permettant la visualisation de fragments ayant minimalement une différence de taille de 2%.

Dans ce cas, l'analyse sur l'extrait d'ARN total montre deux produits RT PCR bien distincts et ayant la bonne taille. Comme prévu, la bande plus petite, correspondant à la copie Nc1, migre plus bas que la plus grande, correspondant à la copie Nc2. Leurs taux d'expression sont comparables (**Fig. III. 5**). Ces résultats prouvent que Nc1 et Nc2 sont exprimées chez *N. crassa*.

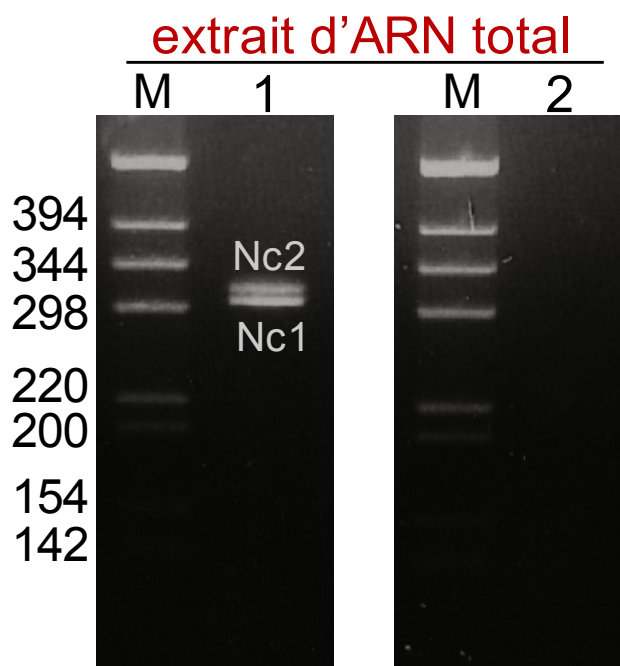


Figure III. 5 Présence des transcrits Nc1 et Nc2 dans l'ARN total chez *N. crassa*. L'analyse est faite à partir des produits RT PCR obtenus pour les deux copies en utilisant des amorces communes internes. Les échantillons sont déposés sur un gel d'agarose MetaPhore 3%, dans les conditions de migration suivantes, 3 heures à 120 V. Les produits de réaction sont visualisés par bromure d'éthidium (1µg/ml) et comparés au marqueur de poids moléculaire M (1Kb). La quantité d'ARN utilisée pour chaque PCR (avec ou sans RT) est ~200 ng. Les quantités de produits RT PCR chargées sur gel : 1 µl. Le nombre de cycles PCR : 30. Puit 1 : ADNc généré par RT PCR à partir des ARN_{tot}, puit 2 : ARN_{tot} sans RT.

III. 1. 3 La cartographie de Nc1 et Nc2

La cartographie de Nc1 et Nc2 sert à vérifier que les transcrits présentent des structures fonctionnelles concordant aux modèles *in silico* (**Fig. III. 1** – sans les nucléotides en rose), avec des extrémités 5' et 3' qui permettent le repliement d'un site catalytique actif intact (hélice P4) et d'une hélice P1 stable qui protège ce site contre la digestion par des nucléases.

Comme stratégie expérimentale, les ARN sont circularisés et amplifiés par RT PCR. Les produits obtenus sont clonés et séquencés. De plus, vu que Nc1 et Nc2 sont nucléaires et qu'une des copies est apparemment exportée vers la mitochondrie, la présence d'autres modifications post transcriptionnelles chez ces transcrits (possiblement des structures protectrices comme une coiffe et/ou une queue) est prise en considération, et par la suite vérifiée. Cette vérification appuie sur deux observations : (i) les preuves existant jusqu'à maintenant chez certaines levures et l'humain (Introduction - section I. 4. 1), nous indiquent que, chez *N. crassa*, les copies nucléaires du P-ARN, Nc1 et Nc2, peuvent être des transcrits de Pol III et (ii) les transcrits de Pol III qui subissent l'exportation vers le cytoplasme sont protégés par une coiffe (ex. l'ARN 7K chez l'humain et l'ARN B2 chez la souris, voir Introduction - section I. 4. 1)

III. 1. 3. 1 La protection en 5' chez Nc1 et Nc2

L'existence d'une protection en 5' chez les transcrits Nc1 et Nc2 est démontrée en examinant si le traitement par l'enzyme Tobacco Acid Pyrophosphatase (TAP) fait ou non une différence. La pyrophosphatase est utilisée car, elle coupe les deux phosphates, γ et β , d'une coiffe, en laissant l'extrémité 5' monophosphorylée; celle-ci peut être liguée avec le groupement hydroxyle de l'extrémité 3' à l'aide d'une RNA ligase. Après ligation des ARN (traités et non traités par TAP), le RT PCR est fait en utilisant des amorces spécifiques à Nc1 et Nc2, pointées vers les extrémités 5' et 3' de la molécule et couvrant entièrement les régions de structure primaire des hélices P1 et P4 (**Fig. II. 5**, Matériels et méthodes). Les produits obtenus pour chaque copie, à partir de l'ARN traité par TAP, circularisé et traité avec la DNase (ARN_{did}), de l'ARN non traité par TAP, circularisé et traité avec la DNase (ARN_{nld}) et de l'ARN non traité par TAP, non

circularisé, mais traité avec la DNase (ARN_{nd}), sont ensuite analysés. Les résultats consistent en quatre produits, **a**, **b**, **c** et **d** dont les tailles (entre 400 pb et 300 pb - en jaune sur la **Fig. III. 6**) se compare à celles attendues (autour de 338 pb pour Nc1 et 307 pb pour Nc2, **Fig. II. 5**, Matériels et méthodes). Une différence de taille est observée pour les produits provenant de la même copie de gène, mais correspondant à l'ADNc obtenu à partir des ARN traités de façon différente (l'ARN_{did} versus l'ARN_{nd}). On note que l'ARN traité par TAP et circularisé donne un produit plus long que celui de l'ARN circularisé seulement (fragments **a** vs **b** ou fragments **c** vs **d**, **Fig. III. 6**). Cette différence de taille, validée par le séquençage subséquent des produits **a**, **b**, **c** et **d**, confirme la présence d'une protection en 5', probablement une coiffe, chez les transcrits Nc1 et Nc2 (**Fig. III. 6. 1**).

III. 1. 3. 2 La présence des formes fonctionnelles chez Nc1 et Nc2

L'identification des formes fonctionnelles de transcrits Nc1 et Nc2 est faite à travers le clonage et le séquençage des produits **a**, **b**, **c** et **d** (en jaune sur la **Fig. III. 6**). Les séquences de clones sont comparées avec le modèle de structure secondaire (**Fig. III. 1**) et avec la séquence génomique de chaque copie (Matériels et méthodes). Pour chaque produit, nous avons analysé 42 clones. Pour les fragments **b** et **d**, la majorité des molécules (pour lesquelles une analyse a été possible) présente une structure secondaire tronquée ayant une partie des hélices P4 et P1 manquante (un exemple de molécule à droite sur la **Fig. III. 6. 1**). Cependant pour les fragments **a** et **c**, tous les clones ont montré une structure secondaire ayant une hélice P4 (site actif) intacte et pour la plupart d'entre eux, une hélice P1 complète (**Tableau. I**, un exemple de molécule à gauche **Fig. III. 6. 1**).

Pour Nc1, les clones analysés affichent des extrémités plus ou moins variables qui peuvent présenter (i) un manque d'un ou deux nucléotides de la séquence génomique avec ou sans ajout d'un à trois A qui ne font pas partie de la séquence génomique (ii) une partie de P1 dégradée en 3' ou (iii) un complément de nucléotides de la séquence génomique - en 5', la séquence 5'CCTCGT 3' plus ou moins quelques nucléotides et en 3', la séquence 5'ACCA 3' (**Tableau I**).

Pour Nc2, les clones analysés possèdent des extrémités allongées de quelques nucléotides de plus qui font partie de la séquence génomique (**Tableau I**). Les séquences de ces clones donnent le même consensus avec certaines variations dans la zone de ligation : en 5', l'ajout de la séquence 5'CCCCCTG3', plus ou moins quelques nucléotides et en 3', la ligation se fait à peu près à la même place, après la séquence 5'ACCA3'.

En résumé, la forme fonctionnelle de chaque copie intègre plus de nucléotides que le modèle de structure secondaire; en 5', au moins les nucléotides indiqués en rose sur la **Fig. III. 1**; en 3', la séquence 5'ACCA3', majoritairement intégrée pour les deux copies (en rose, **Fig. III. 1**). Les résultats obtenus chez *N. crassa* sont ensuite extrapolés chez *P. anserina* et *S. macrospora* et les formes matures de Pa1, Pa2, Sm1 et Sm2 sont inférés (nucléotides en rose, **Fig. III. 2** et **Fig. III. 3**). Deux arguments se trouvent à la base de cette extrapolation. Premièrement, Nc1, Pa1, Sm1 sont des homologues structuraux, ainsi que Nc2, Pa2, Sm2. Deuxièmement, comme déjà mentionné, *N. crassa*, *S. macrospora* et *P. anserina* sont de très proches voisines (**Fig. I. 6**); il y a environ 70% de conservation de séquence entre les gènes orthologues de *N. crassa* et *P. anserina* (92,93) et environ 90% de conservation en acides aminés entre celles de *N. crassa* et *S. macrospora* (94).

En conclusion, les résultats obtenus après la détermination des extrémités 5' et 3' chez *N. crassa* nous permettent de confirmer l'existence des formes fonctionnelles de Nc1 et Nc2 parmi les clones provenant de produits RT PCR obtenus à partir des ARN traités par TAP et, par conséquent, la présence d'une protection à l'extrémité 5' (probablement une coiffe) chez ces copies. Ces résultats démontrent que, *in vivo*, les formes fonctionnelles de Nc1 et Nc2 présentent des extrémités 5' et 3' un peu plus longues que celles prévues par nos modèles. Aussi, le contenu nucléotidique des extrémités 5' et 3' de Nc1 montre un peu plus d'hétérogénéité, et ce, comparativement à Nc2.

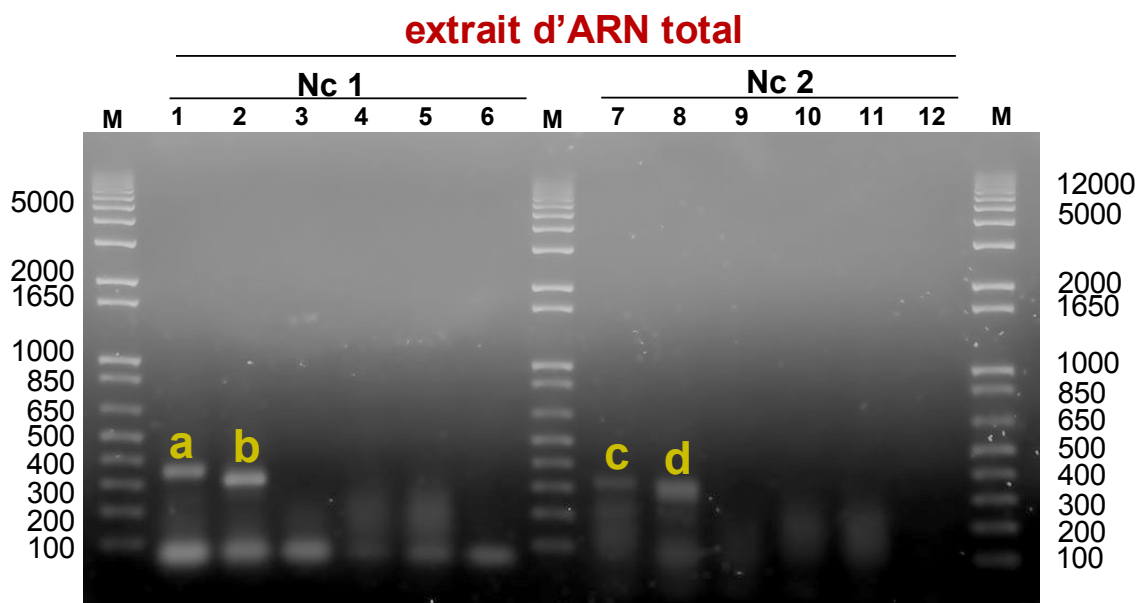


Figure III. 6 Protection à l'extrémité 5' pour les transcrits Nc1 et Nc2. L'analyse des produits RT PCR obtenus à partir des ARN circularisés de Nc1 et Nc2 a été faite sur un gel d'agarose de 1.1%. La migration des fragments s'est poursuivie ~ une heure à 95 V. Les bandes sont visualisées avec bromure d'éthidium (1µg/ml) et comparées au marqueur de poids moléculaire M (1Kb+). La quantité d'ARN utilisée pour chaque PCR (avec ou sans RT) est ~200 ng. Les puits 1, 2, 3, 4, 5, 6 sont attribués à Nc1 et les puits 7, 8, 9, 10, 11, 12 à Nc2. Puits 1 et 7 : ADNc généré par RT PCR à partir des ARN_{dld}, puits 2 et 8 : ADNc généré par RT PCR à partir des ARN_{nld}, puits 3 et 9 : ADNc généré par RT PCR à partir des ARN_{nnd}; puits 4 et 10 : ARN_{dld} sans RT; puits 5 et 11 : ARN_{nld} sans RT, puits 6 et 12 : ARN_{nnd} sans RT; ARN_{dld} : ARN traité par TAP, ligué et traité avec la DNase; ARN_{nld} : ARN non traité par TAP, mais ligué et traité avec la DNase; ARN_{nnd} : non traité par TAP, non ligué, mais traité avec la DNase;

Tableau I. Analyse par séquençage, après le clonage des produits RT PCR (les fragments a et c) obtenus à partir des ARN traités par TAP et circularisés de Nc1 et Nc2. Les séquences clonées sont comparées aux modèles de structure secondaire (Fig. III. 1) et à la séquence primaire génomique de Nc1 et Nc2 (voir Matériels et méthodes).

Gène <i>rnpB</i>	Nombre de clones analysés	NA _{SG}		NM _{SG}		NA _{NSG}
		en 5'	en 3'	en 5'	en 3'	
Nc1	5	-	-	G	C	A
	2	-	-	G	C	5' AA 3'
	2	-	-	G	C	5' AAA 3'
	1	-	-	G	C	-
	2	-	-	5'GA 3'	5' ACGAGGTTTC 3'	-
	2	5' TCCTCGT 3'	5' ACCA 3'	-	-	-
	2	5' CTCCTCGT 3'	5' ACCA 3'	-	-	-
	1	5' CCTCGT 3'	5' ACCA 3'	-	-	-
	1	5' GT 3'	5' ACCA 3'	-	-	-
	1	5' TTTTTCCTCTCCTCGT 3'	-	-	5' ACGAGGTTTC 3'	-
Nc2	9	5' CCCCCTG 3'	5' ACCA 3'	-	-	-
	5	5' CCCCTG 3'	5' ACCA 3'	-	-	-
	2	5' CCTCCCCCGT 3'	5' ACCA 3'	-	-	-
	1	5' CTCCCCCGT 3'	5' ACCA 3'	-	-	-
	1	5' TCCCCCGT 3'	5' ACCA 3'	-	-	-
	2	5' CCCTG 3'	5' ACCA 3'	-	-	-
	1	5' TG 3'	5' ACCA 3'	-	-	-
	1	5' CCCCCTG 3'	5' AC 3'	-	-	-

Légende :

NA_{SG} : Nucléotides ajoutés aux extrémités de la structure secondaire putative, faisant partie de la séquence génomique.

NM_{SG} : Nucléotides qui font partie de la séquence génomique, mais qui manquent aux extrémités de clones séquencés.

NA_{NSG} : Nucléotides ajoutés aux extrémités de la structure secondaire putative sans faire partie de la séquence génomique.

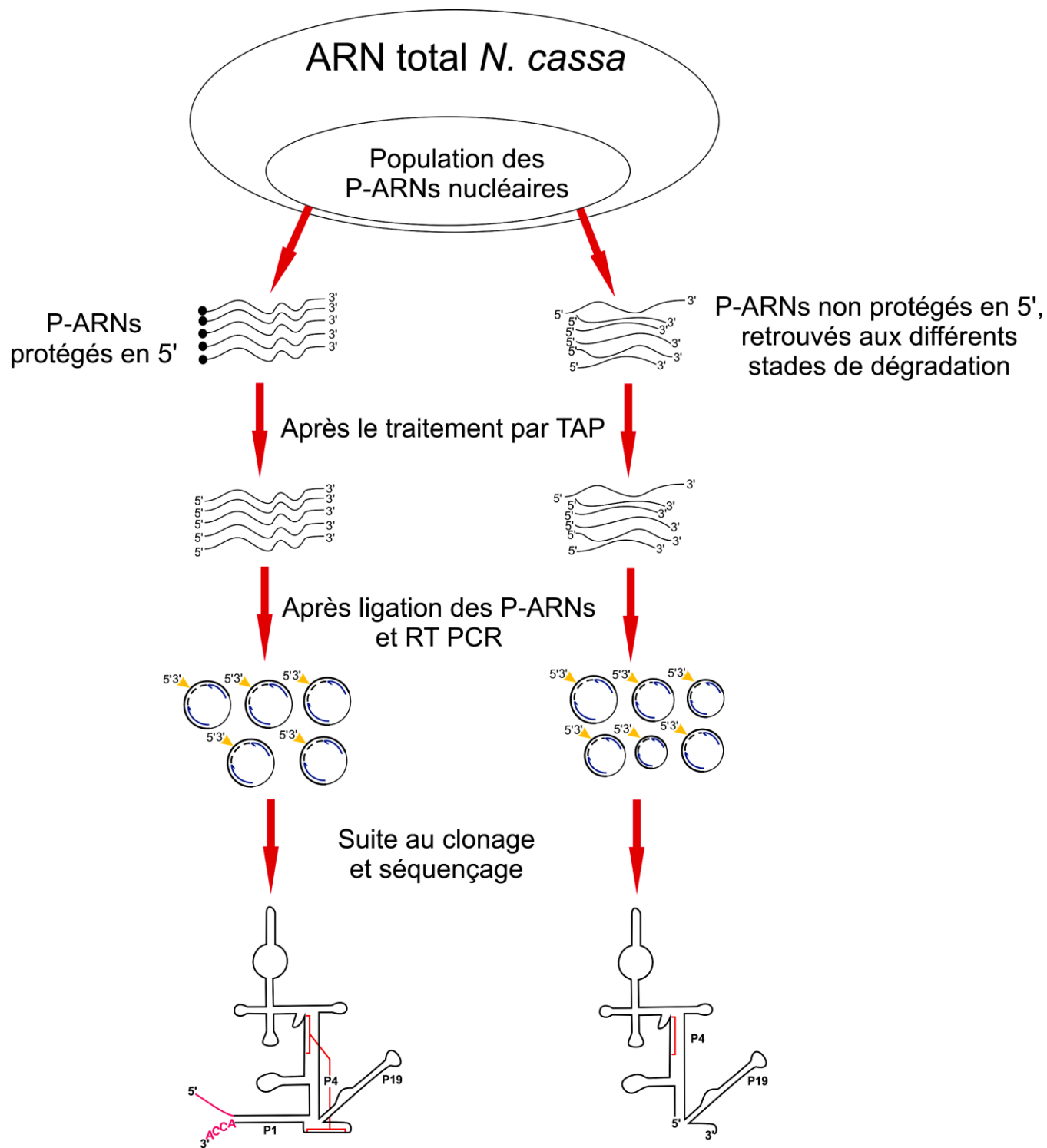


Figure III. 6. 1 Modèle illustrant la présence des molécules fonctionnelles et non fonctionnelles chez Nc1 et Nc2 dans l'ARN total de *N. crassa*. Ce modèle est conçu en fonction des données obtenues après séquençage des produits **a**, **b**, **c** et **d**. La stratégie expérimentale utilisée pour cette partie de l'étude est représentée avec le modèle. Comme indiqué dans la figure, parmi une population hétérogène des P-ARNs nucléaires on peut retrouver des ARN protégés en 5' (probablement une coiffe - cercle noire), des ARN matures (sans protection et fonctionnels) et des ARN aux divers états de dégradation. Si le traitement par TAP n'est pas fait, on suppose que la ligation est accomplie majoritairement sur des ARN en état divers de dégradation. Comme résultat, après clonage de produits RT PCR et séquençage, pour la plupart des clones analysés on trouve des molécules P-ARN non fonctionnelles - sans hélice P1 et sans site catalytique intact (exemple de molécule à droite sur la figure). Par contre, si le décoiffage des P-ARN est fait, la ligase a accès à des molécules complètes d'ARN. Comme résultat, après clonage et séquençage, pour la majorité de clones analysés on obtient des molécules fonctionnelles - avec des extrémités 5' et 3' qui permettent le repliement d'un site catalytique intact et d'une hélice P1 protectrice (exemple de molécule à gauche sur la figure); la flèche en jaune indique la ligation des extrémités; les amorces pour RT PCR, ainsi que leur direction, sont représentées par les flèches bleues; les produits RT PCR sont les doubles brins dessinés en gros (ils sont délimités par : les amorces, la ligne pointée et la ligne en continu).

III. 2. 1 La localisation des transcrits Nc1 et Nc2

La localisation des ARN de Nc1 et Nc2 dans diverses fractions cellulaires ainsi que leur concentration semi-quantitative sont déterminées par RT PCR (détails sur l'approche expérimentale dans la section III. 1. 2) (**Fig. III. 7** et **Fig. III. 8**).

Une comparaison de l'abondance de Nc1 et Nc2 est faite dans le lysat cytoplasmique vs l'extrait matriciel mitochondrial aux différents moments de la réaction RT PCR. À cet effet, des aliquotes de la réaction PCR sont prélevées à différents cycles de réaction, déposées sur gel d'agarose et analysées (**Fig. III. 7**). Les résultats obtenus à partir des transcrits Nc1 et Nc2 révèlent des concentrations semi-quantitatives équivalentes de ces deux copies dans l'extrait cytoplasmique et ce, dans les quatre aliquotes prélevées (ARN_{cyt} - cycle 30, 33, 36 et 38 - **Fig. III. 7**). Par contre, dans l'extrait matriciel mitochondrial, leurs concentrations semi-quantitatives sont inégales; on note une abondance plus grande de Nc1 versus la présence en trace de Nc2 dans les deux derniers prélèvements (ARN_{mitEM} - cycles 36 et 38 - **Fig. III. 7**).

La présence et l'abondance de Nc1 et Nc2 sont aussi vérifiées dans différents fractionnements mitochondriaux (mitochondries entières, membranes mitochondriales, extrait matriciel soluble, ainsi que dans les fractions de l'extrait matriciel mitochondrial purifiées par PNGS PAGE) (**Fig. III. 8**). L'analyse des produits RT PCR obtenus démontre que Nc1 est enrichie par rapport à Nc2, notamment dans la matrice soluble mitochondriale. Nc1 est présente dans la majorité des fractions de la matrice soluble. Nc2 se retrouve seulement dans les deux dernières fractions, F9 et F10 (**Fig. III. 8**).

III. 2. 2 L'isolement de l'activité RNase P dans la matrice soluble mitochondriale

On a cherché à identifier dans la matrice soluble mitochondriale la ou les fractions actives parmi les dix fractions (F1-F10) purifiées par PNGS PAGE. Mettant en présence un substrat typique de la RNase P (un pré-ARNt^{Proline-CCA} marqué) avec chacune de ces fractions, l'apparition de l'ARNt^{Proline-CCA} mature et du 5' leader démontre l'existence de cette activité. Ce profil on l'observe dans la fraction F4 (entre 10% et 11% du PNGS PAGE, en rouge **Fig. III. 9**). D'autre part, on n'exclue pas l'existence d'autres fractions actives mais, impossibles à identifier car le substrat a été dégradé (présence d'autres

bandes que celles attendues sur gel, **Fig. III. 9**). Cette dégradation peut être générée par la présence d'autres activités enzymatiques dans les fractions; on observe qu'elle est très importante dans la plupart des fractions (ex. F5). Ainsi, le substrat mature et le 5' leader, si existants dans ces fractions, sont impossibles à détecter (**Fig. III. 9**). Dans ces conditions, quantifier l'activité a été aussi difficile à faire puisque les autres activités enzymatiques interfèrent avec le test. Ces activités peuvent être le résultat de l'action des endonucléases non spécifiques existantes dans la matrice soluble mitochondriale (par exemple : il y a la nucléase S1 dans la fraction F4, **Tableau II**).

III. 2. 2. 1 L'association de la copie nucléaire Nc1 avec le complexe protéique actif

L'identification de Nc1 comme constituant de la mtRNase P chez *N. crassa* est faite par la purification d'un complexe protéique actif. Lors du suivi du P-ARN par RT PCR dans les fractions F2-F10, Nc1 se retrouve dans la fraction pour laquelle le profil de l'activité RNase P est observé (**Fig. III. 8** et **Fig. III. 9**). Une partie des fractions F2-F10 a été analysée sur un gradient continu non dénaturant de polyacrylamide (4%-14%). Sur ce gel de séparation, dans la fraction active F4, une seule bande est observée, correspondant à un complexe protéique (C4, marqué en rouge sur la **Fig. III. 10**).

III. 2. 2. 2 La composition protéique du complexe contenant l'activité mtRNase P

L'analyse protéique par LC MS/MS du complexe contenant l'activité de la RNase P a révélé la présence d'au moins 87 protéines (obtenues après le chevauchement de trois analyses différentes) chez *N. crassa* (**Tableau II**). Pour 73 des protéines la localisation est déjà connue comme mitochondriale selon (98,99) ou d'autres bases de données (MIPS¹⁶, BROAD Institute¹⁷, MITOP2¹⁸). Pour les 14 autres, 9 n'ont pas une localisation antérieure connue, 2 ont été prédites comme cytoplasmiques, 2 comme étant sécrétées et une présente trois autres localisations (le noyau, le cytosol et le cytoplasme). Certaines protéines n'ont pas été identifiées trois fois, mais leur score est considéré significatif, soit \geq à 20 (seuil à partir duquel les résultats obtenus après analyse protéique LC MS/MS seront encore considérés significatifs selon <http://www.matrixscience.com>)

¹⁶ Institute of Bioinformatics and Systems Biology (<http://mips.helmholtz-muenchen.de>)

¹⁷ <http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/neurospora/neurospora>

¹⁸ Mitochondrial Proteome (<http://www.mitop.de:8080/mitop2/>)

et la majorité ont été détectées avec deux peptides ou plus (**Tableau II**). Cette impossibilité d'identification peut être attribuée à l'abondance du complexe qui a fluctué d'une expérience à l'autre à cause des possibles variations des volumes chargés sur gel, ainsi qu'à la limite de détection de la technique utilisée. Dans les deux cas, les protéines très abondantes sont avantagées plus que celles peu et très peu abondantes étant donné que lors de l'analyse par LC MS/MS elles sont plus facilement détectées.

Les protéines du complexe sont impliquées dans plusieurs fonctions cellulaires comme le processing de l'ADN/ARN, le métabolisme, la traduction, la protéolyse, le repliement des protéines, l'apoptose et la maintenance du génome mitochondrial (**Tableau II**, colonne 3 et **Fig. III. 11**). Pour trois protéines, la fonction n'est pas déterminée. De plus, aucune protéine faisant partie du complexe de la RNase P nucléaire n'est détectée parmi les composants de ce complexe mitochondrial (**Tableau II**).

En conclusion, nous avons identifié la composition protéique du complexe mitochondrial contenant l'activité mtRNase P. La localisation mitochondriale de 73 des 87 protéines est cohérente avec les résultats d'autres équipes et nos analyses prédisent l'adressage de 14 protéines supplémentaires. Nos résultats indiquent également qu'en conditions natives la voie de maturation des mtARNt est associée avec d'autres voies métaboliques mitochondriales.

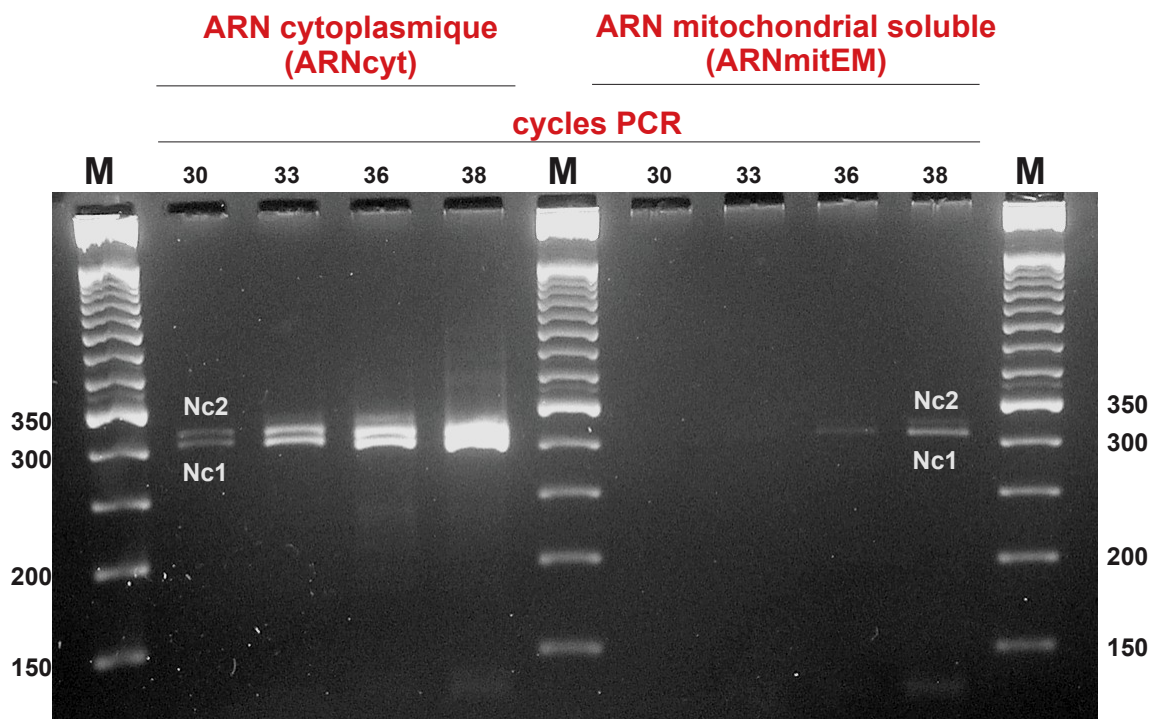


Figure III. 7 Localisation des transcrits Nc1 et Nc2 dans le lysat cytoplasmique vs l'extrait mitochondrial soluble. Cette analyse a été faite en comparant l'abondance de Nc1 par rapport à Nc2 au niveau de l'ARN_{cyt} et de l'ARN_{mitEM}. La séparation et la visualisation ont été faites dans les mêmes conditions qu'auparavant (**Fig. III. 5**). La quantité d'ARN_{cyt} utilisée pour le RT correspond à une quantité équivalente à ~3 µg mitochondries pures. La quantité d'ARN_{mitEM} utilisée pour le RT correspond à une quantité équivalente à ~1 mg mitochondries pures. Des volumes de 2 µl sont chargés sur gel. Des aliquotes ont été prélevées à différents cycles, respectivement : 30, 33, 36, 38, en permettant le suivi de la réaction RT PCR. (M) : le marqueur de poids moléculaire « 50 pb DNA ladder ».

extraits d'ARN mitochondrial

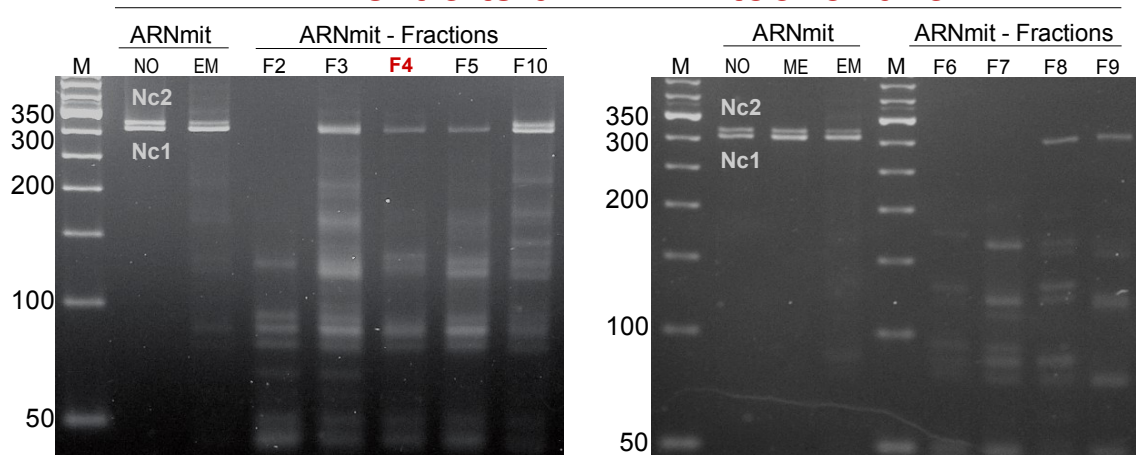


Figure III. 8 Localisation des extraits Nc1 et Nc2, dans différents compartiments mitochondriaux et dans les fractions mitochondriales F2-F10. Analyse faite par RT PCR. La séparation et la visualisation ont été faites dans les mêmes conditions qu'auparavant (**Fig. III. 5**). ARN_{mitNO} : ARN mitochondrial purifié de mitochondries pures intactes, ARN_{mitME} : ARN mitochondrial purifié de membranes mitochondriales, ARN_{mitEM} : ARN mitochondrial extrait de la matrice mitochondriale soluble, ARN_{mitF2-F10} : ARN de fractions F2-F10, issues de l'extrait matriciel mitochondrial et obtenues par PNGS PAGE. La quantité d'ARN_{mitNO} utilisée pour le RT correspond à une quantité équivalente à ~0.2 mg mitochondries pures. Les quantités, d'ARN_{mitEM} et d'ARN_{mitME}, utilisées pour le RT, correspondent à une quantité équivalente à ~ 1 mg mitochondries pures chacune; les quantités d'ARN_{mitF2-F10} utilisées pour le RT correspondent à une quantité équivalente à ~ 2 mg mitochondries pures chacune. Avant de charger sur gel, les volumes de réaction ont été réduits à 8 µl pour ARN_{mitNO}, ARN_{mitME}, ARN_{mitEM} et à 12 µl pour ARN_{mitF2-F10}. Volumes chargés sur gel: 0.3 µl (ARN_{mitNO} et ARN_{mitME}), 1.2 µl (ARN_{mitEM}) et 4 µl (ARN_{mitF2-F10}). Cycles PCR : 38. (M) : le marqueur de poids moléculaire « 50 pb DNA ladder ».

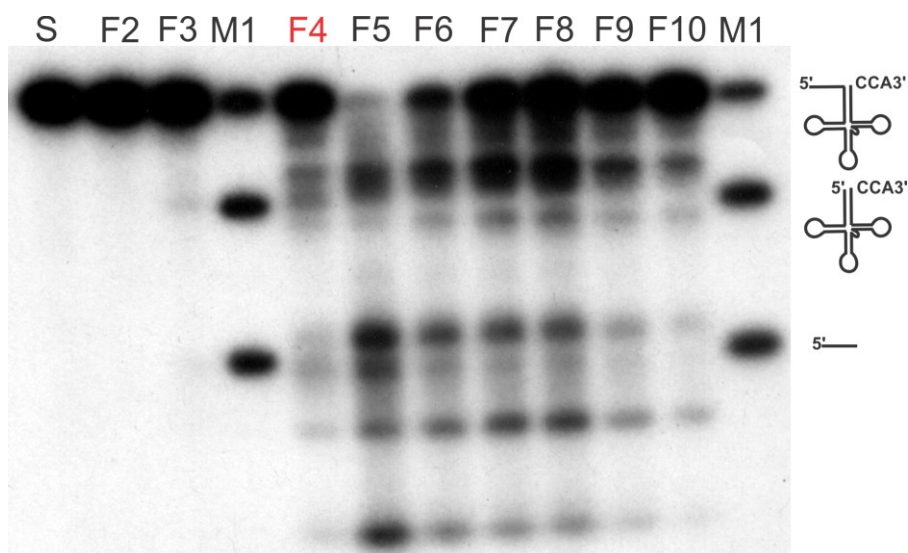


Figure III. 9 Test d'activité de la RNase P, fait sur les fractions purifiées par PNGS PAGE à partir de l'extrait matriciel mitochondrial, chez *N. crassa*. Le pré-ARNt^{Proline-CCA} (117 nt) a été utilisé comme substrat. La présence de l'ARNt^{Proline-CCA} mature (78 nt) et de la séquence leader en 5' (39 nt) sont des indicateurs de l'activité RNase P dans la fraction F4 (en rouge sur la figure). D'autres bandes représentent l'ARN coupé probablement par des endonucléases non spécifiques qui interfèrent avec le test d'activité. F2-F10: diverses fractions de l'extrait matriciel mitochondrial, prélevées après migration sur le gel préparatif PNGS PAGE. M1 : le contrôle positif, le P-ARN autocatalytique d'*E. coli*. Neg : le contrôle négatif, le substrat seul sans fractions ou P-ARN autocatalytique d'*E. coli*.

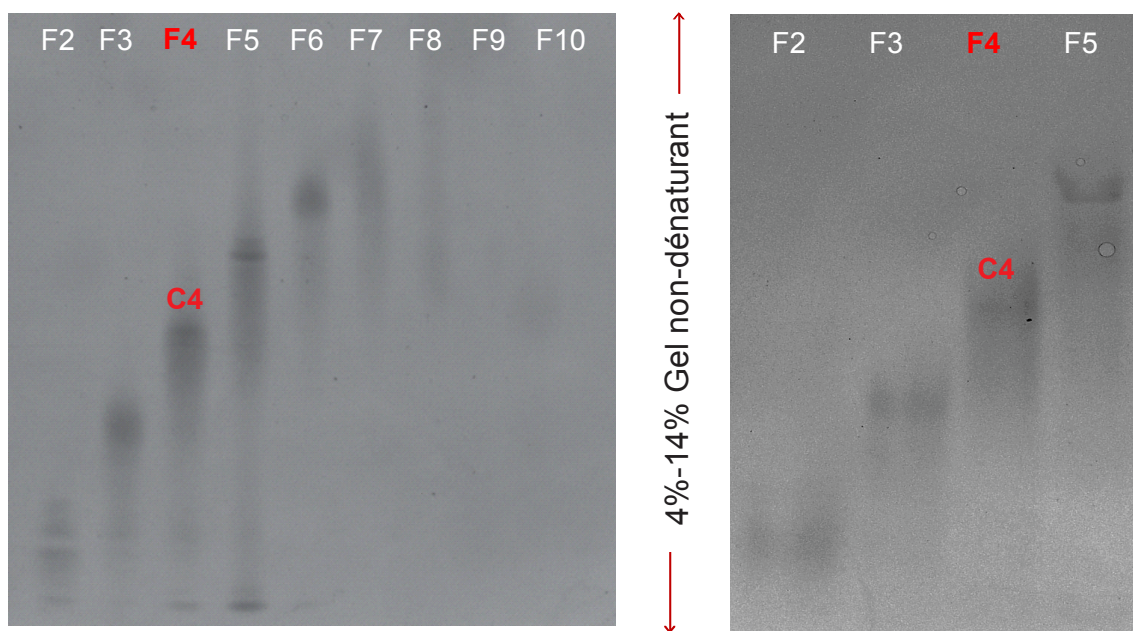


Figure III. 10 Purification d'un complexe protéique mitochondrial actif de la RNase P chez *N. crassa*. Le complexe associé avec l'activité RNase P présente dans la fraction F4 (indiqué C4, en rouge sur la figure) a été séparé sur un gel gradient continu (4%-14%) de polyacrylamide non dénaturant. Après migration de 24 heures, le complexe a été coloré avec SYPRO Ruby et visualisé par UV.

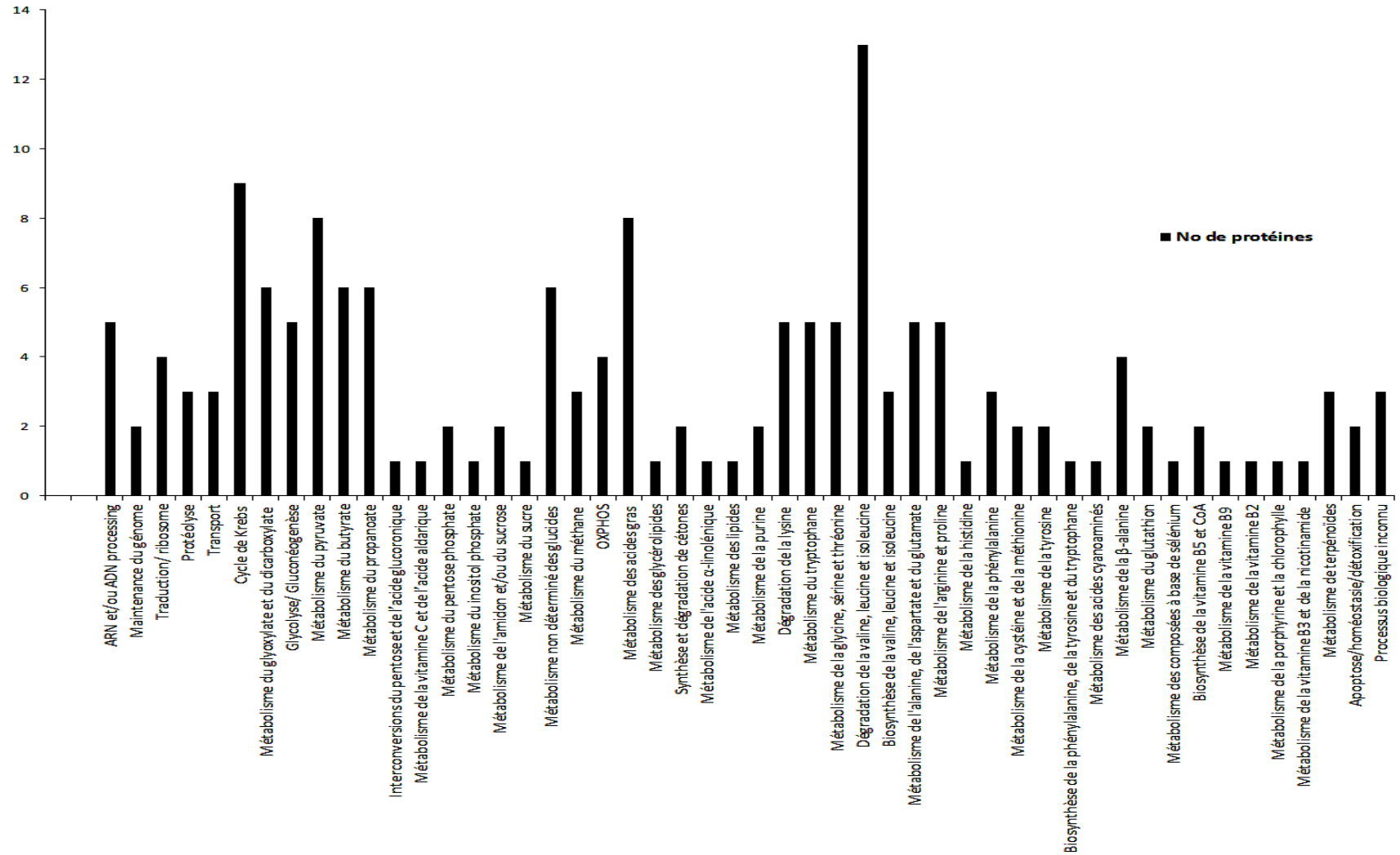


Figure III. 11 Sommaire de fonctions biologiques, retrouvées au niveau du complexe mitochondrial actif de la RNase P chez *N. crassa*.

Tableau II. Composition protéique du complexe mitochondrial actif de la RNase P chez *N. crassa*. Trois analyses LC MS/MS différentes ont été faites pour le complexe. Bleu marque les protéines identifiées trois fois. Vert marque les protéines identifiées deux fois. Noir marque les protéines retrouvées une fois à partir d'au moins deux peptides.

No protéine	Identité protéine (NCBI)	Symbole du gène	Processus biologique ^a	Description de la protéine ^b	Localisation déjà connue ^c (chez <i>N. crassa</i> et/ou d'autres espèces)	Score protéine	No des peptides
1	gi 127289	NCU02549 (pep)	Protéolyse; phosphorylation oxydative	sp P11913.1 Mitochondrial-processing peptidase subunit beta and ubiquinol cytochrome c reductase core protein I	Matrice et membrane interne mitochondriale <i>N. crassa</i> (IDA);	21, 59, 29	14
2	gi 168841	NCU06270 (mpp)	Protéolyse	gb AAA33597.1 matrix processing peptidase [Neurospora crassa]/mitochondrial processing peptidase alpha subunit	Matrice mitochondriale <i>N. crassa</i> (IDA);	81, 60, 32	13
3	gi 157071631	NCU03290	Protéolyse	gb EAA34980.2 hypothetical protein NCU03290 [Neurospora crassa OR74A]/ dipeptidyl peptidase	ND	29, 45, 71	10
4	gi 28921241	NCU02366	Cycle de Krebs; métabolisme du glyoxylate et du dicarboxylate	gb EAA30551.1 hypothetical protein NCU02366 [Neurospora crassa OR74A]/aconitate hydratase, mitochondrial	Matrice et membrane mitochondriale mitochondriale chez <i>N. crassa</i> (IDA, MIPS) .	139, 219, 187	22
5	gi 7800823	NCU01692 (cit1)	Cycle de Krebs; métabolisme du glyoxylate et du dicarboxylate	emb CAB91282.1 mitochondrial citrate synthase	Matrice et membrane interne mitochondriale <i>N. crassa</i> (IDA, MIPS); <i>N. crassa</i> (IDA, MIPS).	404, 176, 87	19
6	gi 28926878	NCU02482 (cit-3)	Cycle de Krebs; métabolisme du glyoxylate et du dicarboxylate	gb EAA35840.1 2-methylcitrate synthase mitochondrial precursor	Mitochondrie chez <i>N. crassa</i> ;	56, 38, 32	5
7	gi 16416078	NCU05425	Cycle de Krebs; dégradation de la lysine; métabolisme du tryptophane	emb CAB91484.2 probable oxoglutarate dehydrogenase precursor [Neurospora crassa]/2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component	Matrice mitochondriale chez <i>N. crassa</i> (IDA, MIPS);	1196, 384, 581	48

8	gj 28920866	NCU02438	Cycle de Krebs; dégradation de la lysine	gb EAA30207.1 hypothetical protein NCU02438 [Neurospora crassa OR74A]/ 2-oxoglutarate dehydrogenase complex E2 component	Matrice et membrane interne mitochondriale chez <i>N. crassa</i> (IDA, MIPS);	51, 54, 30	4
9	gj 157071603	NCU02407	Cycle de Krebs; glycolyse/Gluconéogenèse; métabolisme du pyruvate; dégradation de la valine, leucine et isoleucine	gb EAA30299.2 dihydrolipoyl dehydrogenase mitochondrial precursor [Neurospora crassa OR74A]/ dihydrolipoamide dehydrogenase component E3/ dihydrolipoyl dehydrogenase	Matrice mitochondriale chez <i>N. crassa</i> (IDA, MIPS);	982, 1424, 449	42
10	gj 28918208	NCU06482	Cycle de Krebs; glycolyse/gluconéogenèse; métabolisme du pyruvate; métabolisme du butyrate; biosynthèse de la valine, leucine et isoleucine	gb EAA27886.1 pyruvate dehydrogenase E1 component alpha subunit mitochondrial [Neurospora crassa OR74A]	Matrice mitochondriale (IDA, MIPS).	544, 1037, 600	46
11	gj 9367270	NCU03004	Cycle de Krebs; glycolyse/gluconéogenèse; métabolisme du pyruvate; métabolisme du butyrate; biosynthèse de la valine, leucine et isoleucine	emb CAB97287.1 probable pyruvate dehydrogenase (lipoamide) beta chain precursor / pyruvate dehydrogenase (lipoamide) beta chain precursor	Matrice mitochondriale (IDA, MIPS).	667, 1414, 694	28
12	gj 28923885	NCU07697	Cycle de Krebs	gb EAA33047.1 isocitrate dehydrogenase subunit 2 mitochondrial precursor	Matrice mitochondriale (IDA, MIPS);	165, 171, 67	11
13	gj 7635789	NCU01227	Cycle de Krebs; métabolisme du propanoate	emb CAB88555.1 probable atp-specific succinyl-coa synthetase alpha subunit [Neurospora crassa]/ succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit alpha, mitochondrial	Matrice mitochondriale (IDA, MIPS).	109, 135, 81	11
14	gj 7981341	NCU08471	Cycle de Krebs; métabolisme du propanoate	gj 7981341 emb CAB92021.1 probable beta-succinyl CoA synthetase precursor [Neurospora crassa]/ succinyl-CoA ligase [GDP-forming] subunit beta, mitochondrial	Matrice mitochondriale (IDA, MIPS);	175, 339, 156	22

15	gij28924571	NCU06211	Cycle de Krebs; métabolisme du pyruvate; métabolisme du glyoxylate et du dicarboxylate	gb EAA33691.1 malate dehydrogenase mitochondrial precursor [Neurospora crassa OR74A]	Mitochondrie chez <i>N. crassa</i> (IDA, MIPS).	242, 375, 99	19
16	gij168822	NCU03608 (iv-2)	Biosynthèse de la valine, leucine et isoleucine; biosynthèse de la vitamine B5 et CoA	gi 168822 gb AAB00797.1 alpha- keto-beta-hydroxylacyl reductoisomerase [Neurospora crassa]/ ketol-acid reductoisomerase, mitochondrial precursor	Matrice mitochondriale (IDA, MIPS).	48, 132, 34	9
17	gij28923484	NCU08272	Métabolisme du pyruvate	gb EAA32664.1 cytochrome b2 mitochondrial precursor [Neurospora crassa OR74A]	Mitochondrie chez <i>N. crassa</i> (IDA, MIPS);	127, 26, 37	5
18	gij28925939	NCU03076	Métabolisme de l'alanine, de l'aspartate et du glutamate; métabolisme de l'arginine et proline	gb EAA34933.1 delta-1-pyrroline- 5-carboxylate dehydrogenase [Neurospora crassa OR74A]	Matrice mitochondriale chez <i>N. crassa</i> (IDA, MIPS);	48, 35, 52	8
19	gij28921524	NCU05805	Métabolisme du méthane; métabolisme de la glycine, serine et thréonine; métabolisme des acides cyanoaminés; métabolisme de la vitamine B9	gb EAA30829.1 serine hydroxymethyltransferase mitochondrial precursor [Neurospora crassa OR74A]/ serine hydroxymethyltransferase, mitochondrial precursor	Matrice mitochondriale chez <i>N. crassa</i> (IDA, MIPS);	35, 160, 18	9
20	gij18376350	NCU03415	Glycolyse/gluconéogenèse; interconversion du pentose et de l'acide glucoronique; métabolisme de la vitamine C et de l'acide aldarique; métabolisme du pyruvate; métabolisme du propanoate; métabolisme des acides gras; métabolisme des glycérolipides; dégradation de la valine, leucine et isoleucine; dégradation de la lysine; métabolisme de l'arginine et proline; métabolisme de la histidine; métabolisme du tryptophane	emb CAD21128.1 probable aldehyde dehydrogenase [Neurospora crassa]/aldehyde dehydrogenase	Mitochondrie chez <i>N. crassa</i> (IDA, MIPS);	50, 44, 81	10

21	gij157070859	NCU06187	Métabolisme de la purine; métabolisme de l'alanine, de l'aspartate et du glutamate	gb EAA33763.2 adenylosuccinate lyase [Neurospora crassa OR74A]	Mitochondrie chez <i>N. crassa</i> (par similarité); matrice mitochondriale <i>S. cerevisiae</i> (IDA); cytoplasme/mitochondrie chez l'humain, souris et rat.	47, 39, 35	6
22	gij157070776	NCU06460	Métabolisme de la vitamine B2	gb EAA28115.2 hypothetical protein NCU06460 [Neurospora crassa OR74A]/ acid phosphatase	Mitochondrie chez <i>N. crassa</i> (MITOP2); mitochondrie chez <i>S. pompe</i> et mammifères;	354, 440, 167	24
23	gij18376156	NCU01546	Métabolisme de la porphyrine et la chlorophylle	emb CAD21231.1 probable coproporphyrinogen oxidase precursor [Neurospora crassa]/ coproporphyrinogen III oxidase/ strong similarity to coproporphyrinogen oxidase precursor, mitochondrial, <i>Mus musculus</i>	Matrice mitochondriale chez <i>N. crassa</i> (IDA, MIPS);	45, 60, 23	7
24	gij28920156	NCU09553	Métabolisme du butyrate; métabolisme de la phénylalanine; métabolisme de lipides; métabolisme des acides gras et terpénoïdes	gb EAA29536.1 hypothetical protein NCU09553 [Neurospora crassa OR74A]/ 3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase	Matrice mitochondriale chez <i>N. crassa</i> (IDA, MIPS);	1768, 85,342	29
25	gij28926877	NCU11238	Métabolisme du glyoxylate et du dicarboxylate	gb EAA35839.1 mitochondrial 2-methylisocitrate lyase [Neurospora crassa OR74A]	Matrice mitochondriale chez <i>N. crassa</i> (IDA, MIPS).	73, 37, 48	4
26	gij157069961	NCU08998	Métabolisme du propanoate; métabolisme du butyrate; métabolisme de l'alanine, de l'aspartate et du glutamate; dégradation de la valine, leucine et isoleucine; métabolisme de la β-alanine	gb EAA29790.2 4-aminobutyrate aminotransférase [Neurospora crassa OR74A]	Matrice mitochondriale chez <i>N. crassa</i> (IDA).	149, 372, 193	20
27	gij28926758	NCU03100	Métabolisme du pentose phosphate; métabolisme du glutathion	gb EAA35723.1 6-phosphogluconate dehydrogenase [Neurospora crassa OR74A]	Mitochondrie chez <i>N. crassa</i> (ISS); cytoplasme, mitochondrie chez <i>S. cerevisiae</i> et <i>S. pompe</i> (IDA);	92, 55, 69	10
28	gij28926060	NCU02126	Dégradation de la valine, leucine et isoleucine	gb EAA35048.1 isovaleryl-CoA dehydrogenase mitochondrial precursor [Neurospora crassa OR74A]	Mitochondrie chez <i>N. crassa</i> (IDA, MIPS).	257, 610, 114	24

29	gij28919934	NCU09058	Métabolisme des acides gras et terpénoïdes; dégradation de la valine, leucine et isoleucine; ARN processing	gb EAA29326.1 hypothetical protein NCU09058 [Neurospora crassa OR74A]/ similar to mitochondrial methylglutaconyl-CoA hydratase Auh/ AU-specific RNA-binding enoyl-CoA hydratase	Mitochondrie chez <i>N. crassa</i> (IDA, MIPS).	400, 505, 175	25
30	gij38567018	NCU09266	Métabolisme du propanoate; métabolisme du inositol phosphate; dégradation de la valine, leucine et isoleucine; métabolisme de la β-alanine	emb CAE76317.1 probable methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase (acylating) [Neurospora crassa]/ methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase, mitochondrial precursor	Matrice mitochondriale chez <i>N. crassa</i> (IDA, MIPS).	184, 62, 55	11
31	gij157069720	NCU09864	Dégradation de la valine, leucine et isoleucine	gb EAA30945.2 2-oxoisovalerate dehydrogenase alpha subunit mitochondrial precursor [Neurospora crassa OR74A]	Mitochondrie chez <i>N. crassa</i> (IDA, MIPS).	28, 23, 31	2
32	gij17385934	NCU06512	Métabolisme de la cystéine et de la méthionine; métabolisme des composés à base de sélénium	gb AAL38508.1 AF404820_1 methionine synthase [Neurospora crassa]/ 5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine methyltransferase	Mitochondrie chez <i>N. crassa</i> (MITOP2).	205, 284, 145	20
33	gij157070523	NCU07027	Métabolisme de l'amidon et du glucose	gb EAA32930.2 glycogen phosphorylase [Neurospora crassa OR74A]	ND	82, 37, 109	7
34	gij157070155	NCU08132	Transport des glucides; métabolisme de l'amidon	gb EAA30439.2 hypothetical protein NCU08132 [Neurospora crassa OR74A]/ alpha-1,3-glucan synthase	ND	20, 30, 54	3
35	gij28927214	NCU03020	Métabolisme et transport des glucides	gb EAA36170.1 hypothetical protein NCU03020 [Neurospora crassa OR74A]/ Indigoidine synthase A like protein/ IdgA domain-containing protein	Mitochondrie chez <i>N. crassa</i> (MIPS).	16, 47, 27	6
36	gij157071302	NCU08693 (hsp 70-5)	Transport/chaperons	gb EAA32517.2 heat shock 70 kDa protein mitochondrial precursor [Neurospora crassa OR74A]	Matrice et membrane interne mitochondriale chez <i>N. crassa</i> (IDA, MIPS);	432, 500, 193	31

37	gij28920631	NCU06881	Métabolisme du butyrate; synthèse et dégradation de cétones; dégradation de la valine, leucine et isoleucine	gb EAA29992.1 succinyl-CoA:3-ketoacid-coenzyme A transferase subunit A [Neurospora crassa OR74A]	Mitochondrie chez <i>N. crassa</i> (IDA, MIPS).	37, 42, 52	7
38	gij28921392	NCU02291	Métabolisme des acides gras; dégradation de la lysine; métabolisme du tryptophane	gb EAA30699.1 glutaryl-CoA dehydrogenase mitochondrial precursor [Neurospora crassa OR74A]	Mitochondrie chez <i>N. crassa</i> (IDA, MIPS).	128, 208, 28	9
39	gij16944696	NCU03777	Métabolisme du propanoate; dégradation de la valine, leucine et isoleucine; métabolisme de la β -alanine; Traduction mitochondriale	emb CAC28821.2 related to enoyl-CoA-hydratase [Neurospora crassa]/mitochondrial 3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase	Ribosome mitochondrial chez <i>N. crassa</i> (IDA, MIPS).	85, 81, 44	9
40	gij28923851	NCU06543	Métabolisme des acides gras; dégradation de la valine, leucine et isoleucine	gb EAA33014.1 acyl-CoA dehydrogenase mitochondrial precursor [Neurospora crassa OR74A]/homolog with ACADs in human	Mitochondrie chez <i>N. crassa</i> (IDA, MIPS).	33, 79, 35	9
41	gij28922013	NCU05558	Métabolisme des acides gras; métabolisme de l'acide α -linoléique; dégradation de la valine, leucine et isoleucine	gb EAA31284.1 3-ketoacyl-CoA thiolase [Neurospora crassa OR74A]	Mitochondrie chez <i>N. crassa</i> (IDA); membrane mitochondriale interne chez <i>S. cerevisiae</i> ;	107, 124, 77	7
42	gij28923732	NCU07281	Glycolyse/gluconéogenèse; métabolisme du pentose phosphate; métabolisme de l'amidon et sucrose; métabolisme du sucre	gb EAA32899.1 Glucose-6-phosphate isomerase [Neurospora crassa OR74A] (pgi1)	Mitochondrie chez <i>N. crassa</i> (ISS); mitochondrie chez <i>S. cerevisiae</i> (IDA).	95, 322, 204	24
43	gij168759	NCU02514 (atp-1)	Phosphorylation oxydative	gb AAA33560.1 mitochondrial ATPase alpha-subunit [Neurospora crassa]	Matrice et membrane mitochondriale interne chez <i>N. crassa</i> (IDA, MIPS) - protéine membranaire périphérique;	58, 30, 37	14
44	gij3087842/gij18376040	NCU03559 (qcr-2)	Phosphorylation oxydative	emb CAA70067.1 core protein II [Neurospora crassa]/Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial / cytochrome c reductase core protein II	Matrice et membrane mimitochondriale interne chez <i>N. crassa</i> (IDA, MIPS);	68, 178, 110	11

45	gi 157073590/gi 28925745/gi 28918625	NCU02128 / NCU02097 / NCU03893	Métabolisme des glucides	gb EAA35050.2 hypothetical protein NCU02128 [Neurospora crassa OR74A]/ D-arabinitol dehydrogenase	Mitochondrie chez <i>N. crassa</i> (IDA, MIPS).	65/98/330	9.5,18
46	gi 28881191	NCU06844	ND	emb CAD70372.1 putative protein [Neurospora crassa]	ND	134, 42, 25	5
47	gi 38566807	NCU11027	Protéolyse	emb CAE76115.1 conserved hypothetical protein [Neurospora crassa]/ zinc metalloprotease	ND	61, 31	10
48	gi 29150086	NCU09194	ADN/ARN processing	emb CAD79647.1 probable nuclease S1 precursor [Neurospora crassa]/nuclease S1: simple strand RNA non-specific endonuclease	Voie de sécrétion chez <i>N. crassa</i> (MIPS).	61, 47	1
49	gi 28918100	NCU00030	Maintenance du génome; ADN/ARN processing	gb EAA27781.1 mitochondrial nuclease [Neurospora crassa OR74A]/ DNA/RNA non-specific endonuclease/exonuclease activity	Matrice et membrane interne mitochondriale chez <i>N. crassa</i> (IDA, MIPS).	28, 33	2
50	gi 38566839	NCU01473 (mrp-51)	Traduction mitochondriale	emb CAE76145.1 related to ribosomal protein YmL35 [Neurospora crassa]/mitochondrial large ribosomal subunit YmL35	Mitochondrie chez <i>N. crassa</i> (IDA, MIPS).	71, 23	4
51	gi 157070730	NCU11321	Traduction; ARN processing	gb EDO65101.1 conserved hypothetical protein [Neurospora crassa OR74A]/ribosomal L1 domain-containing protein 1	ND	33, 34	1
52	gi 28917242	NCU11171	Maintenance du génome/réplication de l'ADN	gb EAA26954.1 conserved hypothetical protein [Neurospora crassa OR74A]/ ssDNA-binding protein (SSB)/ similarity with rim1 (Single-stranded DNA-binding protein essential for mitochondrial genome maintenance);	Mitochondrie chez <i>N. crassa</i> (IDA, MIPS).	42, 31	1
53	gi 157070700	NCU08336	Cycle de Krebs; phosphorylation oxydative	gb EDO65095.1 succinate dehydrogenase flavoprotein subunit mitochondrial precursor [Neurospora crassa OR74A]	Matrice et membrane interne mitochondriale chez <i>N. crassa</i> (IDA, MIPS).	30, 32	2

54	gij28919768	NCU04899	Cycle de Krebs; métabolisme du pyruvate; métabolisme du glyoxylate et du dicarboxylate	gb EAA29172.1 malate dehydrogenase mitochondrial precursor [Neurospora crassa OR74A]	Matrice et membranes mitochondriales chez <i>N. crassa</i> (IDA, MIPS).	221, 141	16
55	gij28927523	NCU02580	Cycle de Krebs	gb EAA36475.1 hypothetical protein NCU02580 [Neurospora crassa OR74A]/ fumarate reductase OSM1	Mitochondrie chez <i>N. crassa</i> (IDA).	35, 23	3
56	gij157071455	NCU04078	Métabolisme des glucides	gb EAA28457.2 hypothetical protein NCU04078 [Neurospora crassa OR74A]/ similar to fe- containing alcohol dehydrogenase/ hydroxyacid-oxoacid transhydrogenase/ NAD-dependent methanol dehydrogenase	Mitochondrie chez <i>N. crassa</i> (IDA, MIPS).	27, 30	2
57	gij157070323	NCU10383	Métabolisme de l'alanine, de l'aspartate et du glutamate; métabolisme de la cystéine et de la méthionine; métabolisme de l'arginine et proline; métabolisme de la tyrosine; métabolisme de la phénylalanine; biosynthèse de la phénylalanine, de la tyrosine et du tryptophane	gb EDO65019.1 aspartate aminotransferase mitochondrial [Neurospora crassa OR74A]	Mitochondrie chez <i>N. crassa</i> (IDA, MIPS).	140, 51	8
58	gij28919625	NCU04579	Biosynthèse de la valine, leucine et isoleucine; biosynthèse de la vitamine B5 et CoA	gb EAA29044.1 dihydroxy-acid dehydratase [Neurospora crassa OR74A]	Mitochondrie chez <i>N. crassa</i> (IDA, MIPS).	46, 55	5
59	gij38567114	NCU02475	Métabolisme de la glycine, serine et thréonine	emb CAE76410.1 probable glycine decarboxylase P subunit [Neurospora crassa]/glycine dehydrogenase	Mitochondrie chez <i>N. crassa</i> (IDA, MIPS).	140, 56	10
60	gij157072245	NCU00936	Métabolisme du butyrate; métabolisme de l'alanine, de l'aspartate et du glutamate; métabolisme de la tyrosine;	gb EAA35526.2 succinate semialdehyde dehydrogenase [Neurospora crassa OR74A]/ mitochondrial succinate- semialdehyde dehydrogenase	Mitochondrie chez <i>N. crassa</i> (IDA, MIPS).	134, 41	7

61	gij28926023	NCU02179	Métabolisme du pyruvate	gb EAA35013.1 D-lactate dehydrogenase mitochondrial precursor [Neurospora crassa OR74A]	Mitochondrie chez <i>N. crassa</i> (IDA, MIPS);	25, 19	2
62	gij16945431	NCU03913	Dégradation de la valine, leucine et isoleucine	emb CAB91689.2 probable 3-methyl-2-oxobutanoate dehydrogenase (lipoamide) E1 beta chain precursor [Neurospora crassa]/2-oxoisovalerate dehydrogenase beta subunit, mitochondrial precursor	Mitochondrie chez <i>N. crassa</i> (IDA, MIPS).	37, 81	7
63	gij28927544	NCU00591	Dégradation de la valine, leucine et isoleucine	gb EAA36495.1 methylcrotonoyl-CoA carboxylase alpha chain mitochondrial precursor [Neurospora crassa OR74A]	Mitochondrie chez <i>N. crassa</i> (IDA, MIPS);	31, 31	3
64	gij28950097	NCU10468 (arg-7)	Métabolisme de l'arginine et proline	emb CAD70860.1 probable glutamate N-acetyltransferase precursor [Neurospora crassa]/ Arginine biosynthesis bifunctional protein ArgJ, mitochondrial	Matrice mitochondriale in <i>N. crassa</i> (IDA).	34, 43	3
65	gij25284963	NCU03339	Métabolisme du glutathion	pir T51908 glutathione-disulfide reductase (EC 1.8.1.7) [similarity] - Neurospora crassa/glutathione reductase	Mitochondrie chez <i>N. crassa</i> (IDA);	32, 68	7
66	gij16945374	NCU02998	Métabolisme de la vitamine B3 et de la nicotinamide	emb CAB97281.2 probable nicotinate-nucleotide pyrophosphorylase (carboxylating) [Neurospora crassa]/ nicotinate-nucleotide pyrophosphorylase	ND	22, 28	2
67	gij28926399/ gij309581	NCU02084 / NCU02333	Métabolisme de l'arginine et proline	gb EAA35375.1 conserved hypothetical protein [Neurospora crassa OR74A] / Arginase	Mitochondrie chez <i>N. crassa</i> (MIPS);	47, 49	2
68	gij28917038	NCU01439	Métabolisme du méthane; métabolisme de la glycine, serine et thréonine	gb EAA26763.1 D-3-phosphoglycerate dehydrogenase 1 [Neurospora crassa OR74A]	Cytoplasme chez <i>N. crassa</i> (ISS).	26, 26	2
69	gij28926775	NCU03117	Métabolisme de la purine	gb EAA35740.1 inosine-5--monophosphate dehydrogenase IMD2 [Neurospora crassa OR74A]	Cytoplasme chez <i>N. crassa</i> (ISS).	43, 44	1

70	gij28926594	NCU00884	Métabolisme et transport des glucides	gb EAA35564.1 predicted protein [Neurospora crassa OR74A]/ NAD dependent epimerase/dehydratase	ND	27, 28	2
71	gij28927302	NCU01861	Métabolisme des lipides	gb EAA36256.1 hypothetical protein NCU01861 [Neurospora crassa OR74A]/ similar to short chain dehydrogenase/reductase family/3-ketoacyl-(acyl-carrier-protein) reductase / ortholog in <i>S. cerevisiae</i> (oar1);	Mitochondrie chez <i>N. crassa</i> (par similarité).	38, 25	3
72	gij28921388	NCU02287 (acd-1)	Métabolisme des acides gras et terpénoïdes	gb EAA30695.1 hypothetical protein NCU02287 [Neurospora crassa OR74A]/ acyl-CoA dehydrogenase 1	Mitochondrie chez <i>N. crassa</i> (IDA).	73	7
73	gij157069808	NCU09732	Métabolisme du pyruvate; métabolisme du glyoxylate et du dicarboxylate; métabolisme du propanoate; métabolisme du butyrate; métabolisme des acides gras; synthèse et dégradation de cétones; dégradation de la valine, leucine et isoleucine; dégradation de la lysine; métabolisme du tryptophane	gb EAA35198.2 acetyl-CoA acetyltransferase [Neurospora crassa OR74A]/ ortholog in mammals ACAT1 and in yeast Erg10	Mitochondrie chez <i>N. crassa</i> (IDA, MIPS).	95, 50	11
74	gij14126	NCU05430 (atp-2)	Phosphorylation oxydative	emb CAA37756.1 unnamed protein product [Neurospora crassa]/ ATP synthase subunit beta, mitochondrial	Membrane interne mitochondriale chez <i>N. crassa</i> (IDA, MIPS) -protéine membranaire périphérique.	25, 38	2
75	gij39979170	NCU08044	Métabolisme des glucides; métabolisme des acides gras et terpénoïdes; métabolisme de la sérine	emb CAE85543.1 conserved hypothetical protein [Neurospora crassa]/similar to NADP(+)-dependent dehydrogenase	Mitochondrie chez <i>N. crassa</i> (IDA, MIPS).	53, 43	2
76	gij28920641	NCU06891	Dégradation de la lysine	gb EAA30002.1 predicted protein [Neurospora crassa OR74A]/ gamma-butyrobetaine hydroxylase	Mitochondrie chez <i>N. crassa</i> (IDA, MIPS).	111, 24	9

77	gij157070920	NCU05850	Apoptose	gb EAA30605.2 hypothetical protein NCU05850 [Neurospora crassa OR74A]/ rubredoxin-NAD(+) reductase	Mitochondrie chez <i>N. crassa</i> (IDA, MIPS).	68, 33	2
78	gij28926575	NCU00865	Métabolisme des glucides	gb EAA35545.1 oxalate decarboxylase oxdC [Neurospora crassa OR74A]	Voie de sécrétion chez <i>N. crassa</i> (MIPS).	194, 30	16
79	gij28919780	NCU07418	ND	gb EAA29183.1 conserved hypothetical protein [Neurospora crassa OR74A]/ containing : nucleic acid binding domain, Smr protein/MutS2 C-terminal and a domain of unknown function (DUF1771)	ND	45, 27	1
80	gij16944643	NCU04171 (mrp-21)	Traduction mitochondriale	emb CAD11403.1 related to ribosomal protein L5 precursor mitochondrial [Neurospora crassa]/mitochondrial ribosomal protein-21	Matrice mitochondriale chez <i>N. crassa</i> (IDA, MIPS).	53	3
81	gij28920880	NCU10008	Cycle de Krebs	gb EAA30218.1 fumarate hydratase mitochondrial precursor [Neurospora crassa OR74A]/ fumarate hydratase, mitochondrial precursor;	Mitochondrie chez <i>N. crassa</i> (IDA, MIPS).	41	2
82	gij28919710	NCU09770 (acu 8)	Métabolisme du pyruvate	gb EAA29118.1 acetyl-CoA hydrolase [Neurospora crassa OR74A]/	Mitochondrie chez <i>N. crassa</i> (IDA).	25	3
83	gij22773423	NCU05770 (cat2)	Métabolisme du méthane, métabolisme de la phénylalanine, métabolisme du tryptophane	gb AAL66352.2 catalase-peroxidase [Neurospora crassa]/peroxidase-catalase 2	Mitochondrie chez <i>N. crassa</i> (IDA).	80	5
84	gij28925995	NCU03297 (ccp-1)	Détoxification/apoptose	gb EAA34987.1 cytochrome c peroxidase mitochondrial precursor [Neurospora crassa OR74A]	Matrice et membrane interne mitochondriale chez <i>N. crassa</i> (IDA, MIPS).	26	5
85	gij28926366	NCU03173	ND	gb EAA35343.1 hypothetical protein NCU03173 [Neurospora crassa OR74A]/ HAD superfamily hydrolase	Matrice mitochondriale <i>N. crassa</i> (IDA, MIPS).	26	2

86	gi 28922328	NCU08936	Cycle cellulaire; ADN processing	gb EAA31567.1 predicted protein variant [Neurospora crassa OR74A]/ clock-controlled gene-15	Mitochondrie chez <i>N. crassa</i> (IDA).	79	3
87	gi 293948	NCU02193 / NCU02397	Glycolyse/gluconéogenèse	gb AAA33567.1 pyruvate decarboxylase [Neurospora crassa]	Noyau, cytosol et cytoplasme chez <i>N. crassa</i> (ISS).	60	2

Légende: ^a: processus biologiques existants sur NCBI et/ou KEGG et/ou MIPS;
^b: description de la protéine retrouvée sur NCBI et BROAD Institute;
^c: localisation sous-cellulaire de la protéine (selon Keeping et ces collègues (98), les données existantes sur NCBI/BROAD Institute et les prédictions faites par MIPS/MITOP2) et sa présence dans d'autres espèces; **ND** : non déterminé; **IDA** : inféré à partir d'une expérience directe; **ISS**:inféré par similarité de séquence.

Chapitre IV : Discussion

Nous avons démontré que la mtRNase P chez *N. crassa* se retrouve sous forme d'un grand complexe ARN-protéines comme déjà montré pour la levure (32). Contrairement à la levure, sa sous-unité ARN est encodée dans le génome nucléaire et, en conséquence, importée dans la mitochondrie. Selon nos résultats, la mtRNase P chez *N. crassa* est probablement attachée aux membranes comme déjà vu chez la levure (32), ainsi que chez *A. nidulans* (88).

IV. 1 La caractérisation des Nc1/Nc2, Pa1/Pa2 et Sm1/Sm2, pointe vers une spécialisation de fonction de la RNase P

Suite à l'identification par RNAweasel de deux copies nucléaires, Nc1/Nc2 chez *N. crassa*, Pa1/Pa2 chez *P. anserina* et Sm1/Sm2 chez *S. macrospora*, qui peuvent coder pour le gène *rnpB*, nous nous sommes intéressés à les caractériser. D'abord, nous avons modélisé les structures secondaires pour chacune (**Fig. III. 1**, **Fig. III. 2** et **Fig. III. 3**) en plus de celle de la copie nucléaire de *A. nidulans* (**Fig. III. 4**). L'analyse structurale de ces modèles nous a permis de faire deux observations :

Premièrement, à l'intérieur de chaque espèce, les paires de copies, Nc1/Nc2, Pa1/Pa2 et Sm1/Sm2 sont conservées par rapport au consensus universel et ce, malgré leurs différences en séquence et en structure (pour plus de détails voir section résultats). Nos résultats indiquent que les régions de séquence primaire CRI-V, conservées à travers l'évolution, sont présentes chez les paires de copies, Nc1/Nc2, Pa1/Pa2 et Sm1/Sm2. Pour ce qui est des structures secondaires, plusieurs hélices restent conservées par rapport au consensus universel, notamment les hélices P1 et P4 essentielles à l'activité RNase P (**Fig. III. 1**, **Fig. III. 2** et **Fig. III. 3**). L'analyse comparative structurale faite entre Nc1 et Nc2, Pa1 et Pa2, Sm1 et Sm2 a révélé qu'elles sont aussi variables en structure, les différences les plus importantes étant les changements survenus aux hélices P19. Pour Nc1, Pa1 et Sm1, l'hélice P19 est plus grande et plus stable; elle a gagné une tétraboucle UNCG, un motif de structure particulièrement stabilisateur. Ainsi, de façon globale, Nc1, Pa1 et Sm1 sont plus stables tandis que Nc2, Pa2 et Sm2 sont plus riches en A, U et ressemblent plus au P-ARN nucléaire d'*Aspergillus*.

Deuxièmement, les copies restent conservées entre *N. crassa*, *P. anserina* et *S. macrospora* et ce, malgré le fait que leur divergence est survenue il y a des millions d'années (92). Nos résultats démontrent que Nc1 est homologue à Pa1 et Sm1 tandis que Nc2 est homologue à Pa2, Sm2 et avec le P-ARN nucléaire d'*A. nidulans*.

Ces observations indiquent qu'au cours de l'évolution pour l'activité de la mtRNase P chez l'ancêtre commun de *N. crassa*, *P. anserina* et *S. macrospora*, comparativement à *A. nidulans*, il y a eu perte du gène *rnpB* mitochondrial, duplication du gène *rnpB* nucléaire et probablement la substitution du gène *rnpB* mitochondrial manquant par une de ces deux copies nucléaires. En prenant en considération que pour pouvoir accomplir sa fonction la copie mitochondriale doit être transportée, nous avons spéculé que les copies plus stables, Nc1, Pa1 et Sm1 sont destinées à la mitochondrie, car le gain des motifs UNCG fournit plus de stabilisation et permet la fixation de protéines supplémentaires (100,101). Les trois autres copies, homologues avec le *rnpB* nucléaire d'*Aspergillus*, plus grandes en taille et avec moins de tétraboucles fonctionnelles (**Fig. III. 1**, **Fig. III. 2**, **Fig. III. 3** et **Fig. III. 4**), s'occupent probablement de la maturation des ARNt nucléaires et d'autres petits ARN (voir introduction - section I. 1). Le remplacement du gène *rnpB* mitochondrial manquant par une copie dupliquée du gène nucléaire n'a pas été observé jusqu'à maintenant chez aucune autre espèce. Par contre, l'importation d'un transcrit du gène *rnpB* nucléaire dans la mitochondrie a été déjà rapportée chez l'humain; la présence de l'ARN nucléaire dans la mitochondrie humaine étant nécessaire pour accomplir la maturation de transcrits pré-ARNt polycistoniques (64).

IV. 1. 1 Le processing de transcrits Nc1 et Nc2

Après l'analyse structurale des modèles nous avons voulu savoir si expérimentalement on trouve des formes fonctionnelles de ces copies et si cela implique une protection en 5'. La cartographie des copies a été faite chez *N. crassa*. Nos résultats démontrent que Nc1 et Nc2 sont transcrites *in vivo* (**Fig. III. 5**) et que ces transcrits sont protégés à l'extrémité 5' (**Fig. III. 6**), probablement par une coiffe, comme déjà vu pour certains transcrits de Pol III (ex. l'ARN splicéosomal U6, l'ARN 7K chez l'humain ou l'ARN B2 chez la souris) (70). La structure de cette protection et sa fonction restent

encore à déterminer. Pourtant, comme fonction, on peut suggérer qu'elle fournit plus de stabilité aux P-ARNs ou encore, qu'elle est impliquée dans l'export nucléaire des copies (comme déjà discuté dans introduction – voir section I. 4. 1).

La recherche de formes fonctionnelles de Nc1 et Nc2, nous a mené à conclure qu'*in vivo* les deux copies présentent des extrémités 5' et 3' plus longues que celles prédites par nos modèles - en 5' au moins les nucléotides indiqués en rose sur la Fig. III. 1, et en 3' la séquence 5'ACCA3' majoritairement intégrée (**Fig. III. 1**). Ces séquences peuvent protéger davantage les ARN matures contre la dégradation par des exonucléases ou même être impliquées dans la reconnaissance des P-ARN par des protéines (ex. comme la séquence CCA en 3' chez les ARNt (71)).

En ce qui concerne la biogenèse et le processing des transcrits Nc1 et Nc2 en tant que produits de Pol III (pour détails voir l'introduction, section I. 4. 1), nos résultats donnent très peu des informations. Selon ces données, on envisage deux possibilités. Soit, la biogenèse et le processing des transcrits Nc1 et Nc2 impliquent un traitement des extrémités 5' et 3' qui n'est pas encore identifié; cela est tout à fait possible, car, la maturation des extrémités pour le P-ARN nucléaire est faite de façon différente d'un système à l'autre (des levures à l'humain - voir l'introduction, section I. 4. 1). Soit, les transcrits primaires de Nc1 et Nc2 sont générés sans précurseur en 5' et avec une queue poly U en 3' (comme la plupart des produits de Pol III) mais on a failli à les identifier; cette hypothèse est soutenue par le fait que dans la séquence génomique de Nc1 et Nc2 en 3' (tout de suite après la séquence 5'ACCA3'), on observe une série de T qui marque peut-être le site de terminaison de la transcription par Pol III en générant la queue des U (**Fig. IV. 1**, marqué avec double ligne rouge); un autre motif transcriptionnel, une boîte TATA, pourrait aussi exister à l'extrémité 5', à l'extérieur de la région transcrite (marquée avec une ligne noire sur la **Fig. IV. 1**).

Par ailleurs, en considérant l'insertion occasionnelle de A au site de ligation des extrémités 5' et 3' pour Nc1 comme le résultat d'une polyadénylation, on pourrait penser que le processing pour les deux copies est différent ou que, dans le cas de Nc1, on observe des molécules en voie de réparation ou de dégradation (ex. l'ARN splicéosomal U6, l'ARN 7K, l'ARN 7SL chez l'humain, ou l'ARN B2 chez la souris –

détails dans l'introduction section I. 4. 1); nos données indiquent au site de ligation, peu de variation dans le cas de Nc2 (la séquence génomique est complète) et plus de variation dans le cas de Nc1 (soit la séquence génomique est complète, soit elle est digérée et il y a un ajout de A) (**Tableau I**). Cet ajout de A au site de ligation pour Nc1, pourrait être aussi indicateur de l'existence d'un processing d'édition ou de réparation, comme celle observée pour les ARNt mitochondriaux des mammifères; par exemple, chez l'escargot ou chez l'humain, l'extrémité 3' tronquée de certains ARNt mitochondriaux est restaurée en ajoutant des A, afin de produire des molécules fonctionnelles (102-105). Si le cas, ce résultat renforce encore l'idée d'une spécialisation de fonction de la RNase P.

>Neurospora.crassa.1

AGTGC GCCGAGCCCCAGGCGGCAGCAGCTGCCCGCTTCCTCAGCATCCGCAATTCTGGGTGGACCTTTGGGACAAAG
 CGTACATCTCATTGGACGAGCCCTCAACGGCACAGAGCCTCAATTCTTTTTCTCTTTATAACCCCCAAACAATTTTCTGGG
 ACTGTTCCACTTTCCTCTCTTTTTCCCTTTTTTCCTCTCCTCGTGAAGCCTCGTCCTCTTCAACGCTGCGTTTCTATG
 CTACGAACGGAGAGACTCGCGCAAGCGTGTCTTTACACCTTTTCCTTCGGGAAAACACTTTCTACCAGGCATA
 TGAGAAATTCGGAGAAATCGCTTCACTTTCAGCCTACAATCATCAGGTCCACCTGGTGTTTGGCTCTGCCGGCA
 ACGGTCTGCGCGTGATCCTCGCGTCTGTAATTGGCATCAGAAAAGCAGGGCGCTGAGCTCCTCTGGTCTGCTG
 CGATCGGGGATAGTTTCAGCGTTTCCTCTGGGAGGGCCATTACGAAGCTTGTGAATGAAATCACTTGAGTGCA
 ATACGCAGCGTGCATGCCCGTTACTCCCCTTTTCGAGAGGAGGATGGACTGCACAATTCGATTCCGATTACTCT
 GTTGAGGACGAGGTTTACCACCCCTTTCATTGCAAACTTGGGCTGCGAGCTCGGGATGCGAGGAAGAACGAGTTT
 GTTACTTGTGCGCCTTCTCTCACGTTGAAGCGATATACACCTTCGTCATCTACCCATAGCGCCCTTCAACCAACGACGA
 AGGGAATCATGCACAACACCTCGGCATCGACCTGGGTAATACAAGGTCCACTCAAGTTTGTCT

>Neurospora.crassa.2

TCCGCCAAGACTGCACAGGTGTTTGTGAGTGTGGGAACGGGAACCTTCAATTGCGGAGCCGGCATTGCAAGCTCAAGT
 GGACCTAGTCTCACGGATCCACTCACGGATTCCAGGTGGGGCCTCAGCATCAGTCAACCCCTCTTATAAAAAGGACCC
 CACAACCTCCAACCTGCAGTACTTCTTTCTCTTTCTCCCCCGTGAAGCTTCGTCTCTTCAATGCTGCGTTTCTA
 TGCACCAACGGAGAGTTCTGCCTCGGCAGTCTTTTCATCATGGCATATGAGAAATTCGGAGAAATCGCTTCAC
 CTTTCAGCCACCCCTCTGATCGCGTCAGGGTCGGCTCACTCCGGTGGCCTGGCTTTGTCAAGATTGAGGAGCTG
 CTGCCGGCAACGGTCTCACGCGATACTGCGTGGGTAATTGGCATCAGAAAAGCAGGCGGCTATCCTAAGCGGA
 CAAGCTGACGGTGTAGTCGCCCTCTGGGAGAGCCATTACGAAGCTTGTGGGTAGAATCACTTCAGTGCAATAC
 GCAGCGTGGCGTGTCTATCTTCTTCTGGGCAGACCTGTACAATCCGATTCCGATTACTCTGTTGAGGACGAAG
 CTTACCACCCCTTTTCTTTCTCAGGTATGAAGTCCACAGTGTGACCCTGAAGAACAAGGATACTACTAACAATGCTG
 TCAACAATCACTCGTCGATGGCAAGCAACCCGCGCACGAATCTCGCCAAAATTATAACCCACCATCTGTAAAGCTGA
 AGTCAACACTTTTTCATTCAACCGCTCCTCCCAAGGATATCGTTATC

Figure IV. 1. Éléments transcriptionnels putatifs – la boîte TATA et le site de terminaison de la transcription (une suite de T génératrice d’une queue poly U) – présents dans les séquences génomiques de Nc1 et Nc2. La séquence transcrite (en gras) correspond à celle déterminée par la cartographie de Nc1 et Nc2. Sur la figure, la boîte TATA et la suite de T putatives, retrouvées à l’extérieur de la séquence transcrite, sont marquées par une ligne noire, respectivement une ligne double en rouge.

IV. 2 La copie Nc1 est associée avec l'activité de la mtRNase P chez *N. crassa*

L'identification de la copie Nc1 comme constituant de la mtRNase P chez *N. crassa* est faite à travers la purification d'un complexe protéique actif de la RNase P. Au départ, la localisation de Nc1 et Nc2 a été vérifiée par RT PCR dans différents sous-compartiments cellulaires (ex. mitochondries) et spécifiquement dans les sous-compartiments mitochondriaux. Par la suite, une fraction active a été déterminée *in vitro* parmi les fractions F1-F10 de la matrice mitochondriale soluble et la présence de la copie associée à cette activité a été dévoilée.

Pour la copie Nc1, deux de nos résultats suggèrent qu'elle est localisée dans la mitochondrie : (i) son abondance dans l'extrait matriciel mitochondrial est beaucoup plus importante par rapport à celle de la copie Nc2, alors que dans l'extrait cytoplasmique, les deux copies sont présentes en quantités équivalentes (**Fig. III. 7**) et (ii) sa présence dans la fraction où l'activité de la mtRNase P a été identifiée (**Fig. III. 8** et **Fig. III. 9**). De plus, la purification de l'activité de la mtRNase P nous a fourni des preuves que cette activité se présente sous forme d'un complexe ARN-protéines, ayant comme sous-unité ARN, la copie nucléaire Nc1; au cours de l'analyse de la fraction active F4 sur un gradient continu, non dénaturant, de polyacrylamide (4%-14%), un seul complexe protéique a été observé (C4, **Fig. III. 10**); aucune protéine du complexe de la RNase P nucléaire respectivement, pop1p, pop4p, pop3p, pop8p, pop7p, rpr2p, rpp1p, n'a pas été identifiée dans le contenu protéique de ce complexe.

Concernant la copie Nc2, nos résultats suggèrent fortement que sa présence dans la matrice mitochondriale soluble est due à la contamination cytoplasmique car, elle est très peu abondante au niveau de la matrice (**Fig. III. 7**). Cette conclusion est consolidée par le fait que sa présence dans la matrice soluble n'est pas associée ni avec l'activité RNase P, ni avec un complexe protéique (fractions F9 et F10 - **Fig. III. 8**, **Fig. III. 9** et **Fig. III. 10**). Cependant, on n'exclut pas la possibilité d'une fonction spécifique pour Nc2 vu sa présence dans le cytoplasme et son abondance relative au niveau de l'extrait mitochondrial total et des membranes mitochondriales (**Fig. III. 7** et **Fig. III. 8**); cette supposition se base sur le fait que la localisation cytoplasmique d'un P-ARN de la

RNase P nucléaire a été déjà observée chez humain. Cependant, sa fonction reste encore inconnue (83).

IV. 3 L'activité de la mtRNase P chez *N. crassa* est associée avec plusieurs autres fonctions cellulaires

L'analyse protéique du complexe mitochondrial contenant l'activité de la RNase P a révélé qu'il contient au moins 87 protéines. Ces protéines sont impliquées dans plusieurs processus biologiques dont le processing de l'ADN/ARN, le métabolisme, la traduction (des protéines ribosomiques), la protéolyse, le repliement des protéines, ainsi que la maintenance du génome mitochondrial (**Fig. III. 11, Tableau II, Annexes - Tableau III, Tableau IV**). L'association de l'activité mtRNase P avec d'autres fonctions biologiques a été aussi observée chez la levure (32) lors de la purification du complexe actif mtRNase P, de même que chez *Aspergillus* et l'humain suite au isolement des fractions enrichies en activité mtRNase P. L'analyse protéique comparative entre nos résultats et les données obtenues chez ces espèces montre certaines similitudes au niveau des protéines et des processus biologiques associés (Annexes – **Tableau III et Tableau IV**).

Au niveau protéique, l'identification des protéines métaboliques est compatible avec les résultats obtenus chez la levure (32) et avec les observations faites chez l'humain (52) et/ou *Aspergillus* (**Tableau II et Annexes -Tableau III, Tableau IV**). Par exemple, on trouve les protéines du cycle de Kreb (la citrate synthase, l'aconitase, l'isocitrate déshydrogénase, la α -oxoglutarate déshydrogénase, la succinyl-CoA synthétase, la succinate déshydrogénase, la fumarase, la malate déshydrogénase), les protéines du complexe de la pyruvate déshydrogénase (la pyruvate déshydrogénase et la dihydrolipoamide acétyltransférase) et des protéines impliquées dans d'autres voies métaboliques (ex. le métabolisme des acides aminés et la phosphorylation oxydative (OXPHOS)) (Annexes - **Tableau III et Tableau IV**).

La présence dans le complexe des protéines impliquées dans la dégradation d'ARN (ex. la nucléase mitochondriale), ainsi que celle des protéases (ex. le complexe mitochondrial qui catalyse la libération du peptide signal N-terminal des précurseurs de

protéines après leur importation dans la mitochondrie) est conforme avec les résultats obtenus chez la levure, l'humain et *Aspergillus* (**Tableau II** et Annexes – **Tableau III**, **Tableau IV**). En conséquence, on pourrait soupçonner une association du processus de dégradation des ARN (par la présence de la nucléase mitochondriale) et de la protéolyse avec l'activité mtRNase P chez *N. crassa*.

On s'attendait aussi à une association du ribosome avec l'activité mtRNase P chez *N. crassa*, vu les résultats chez la levure (où 35 protéines ribosomiques mitochondriales et 2 facteurs de transcription ont été retrouvés avec le complexe contenant l'activité mtRNase P). Pourtant, seulement 4 protéines ribosomiques ont été identifiées au niveau du complexe actif (Annexes - **Tableau III**). Trois hypothèses sont possibles pour interpréter ce résultat :

(i) Nous pouvons spéculer que les protéines ribosomiques n'ont pas été détectées en totalité car, la quantité relative du complexe actif dans la matrice mitochondriale soluble est plutôt faible.

(ii) Le complexe actif de la mtRNase P a été dissocié (par des manipulations expérimentales) d'un plus grand complexe attaché aux membranes mitochondriales, et contenant le ribosome. Selon la littérature, chez les mammifères, il a été démontré qu'une partie des protéines ribosomiques mitochondriales restent avec la membrane interne (106). Keeping et ses collègues ont signalé la présence de certaines protéines ribosomiques mitochondriales au niveau des membranes chez *N. crassa* (98).

(iii) Il est aussi possible que la traduction ne soit pas associée au complexe contenant l'activité de la mtRNase P chez *N. crassa* et qu'en réalité les quatre protéines ribosomiques participent peut-être à d'autres processus cellulaires. Une de ces protéines, la 3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase mitochondriale (NCU03777) est impliquée dans la traduction mitochondriale, mais aussi dans d'autres processus métaboliques (ex. le métabolisme du propanoate ou la dégradation de la valine, leucine et isoleucine) (voir **Tableau II**) (98). Pour les autres protéines (ex. mrp51p et mrp21p), mis à part leur implication dans la biogenèse du ribosome, aucune autre fonction n'est connue jusqu'à maintenant chez *N. crassa*. Pourtant, leurs homologues chez la levure, mrp135p et

mrpl7p, sont essentielles pour une croissance respiratoire normale et pour la maintenance du génome mitochondriale (107,108).

Pour ce qui est des processus biologiques, nos résultats indiquent qu'ils sont généralement les mêmes que chez la levure (32) (Annexes - **Tableau IV**). Certains d'entre eux sont semble-t-il plus complexes que ceux retrouvés chez *S. cerevisiae*. Parfois les protéines qui les accomplissent peuvent être différentes (ex. le processing de l'ARN, Annexes - **Tableau IV**), ou bien plus ou moins nombreuses que celles retrouvées chez la levure (ex. la dégradation et la biosynthèse de la valine, leucine et isoleucine ou le métabolisme de lipides, Annexes - **Tableau IV**). Aussi, il y a certains processus qu'on retrouve seulement dans le complexe mtRNase P de *N. crassa* (ex. le métabolisme du inositol phosphate, le métabolisme de l'amidon et/ou du sucrose ou l'apoptose, Annexes - **Tableau IV**) et d'autres qu'on ne trouve que dans le complexe mtRNase P de la levure (ex. les facteurs de transcription et ceux d'élongation de la traduction, Annexes - **Tableau IV**). Quelques raisons peuvent justifier ces différences. Ainsi, l'absence de certains processus biologiques chez *N. crassa* ou le fait que, si présents, les protéines qui les accomplissent ne sont pas nécessairement les mêmes que chez la levure, peuvent être expliqués par la perte d'une partie du protéome mitochondrial suite à des manipulations expérimentales supplémentaires, effectuées pour purifier les mitochondries (le traitement par digitonine, protéinase K et deux centrifugations différentielles); cette différence dans le contenu protéique a déjà été observée pour les supercomplexes de la chaîne respiratoire chez la souris, à partir de mitochondries purifiées différemment (non purifiées vs purifiées par gradient de sucrose) (109). De manière analogue chez *N. crassa* certaines protéines du complexe seraient perdues ou sont présentes en faible quantité. En conséquence, elles sont impossibles à détecter par LC MS/MS. D'autre part, comme déjà discuté ci-dessus, il existe aussi la possibilité qu'en réalité ces processus ne fassent pas partie du complexe et que les protéines appartenant à ces voies, si présentes dans le complexe, puissent participer à d'autres processus par l'intermédiaire de fonctions qu'on ignore présentement. D'ailleurs, on pourrait spéculer que le complexe purifié chez *N. crassa* représente une forme intermédiaire (une étape d'assemblage spécifique) d'un autre supercomplexe ou d'un mégacomplexe au niveau duquel on pourrait avoir des protéines

qui restent associées, ou des protéines qui se dissocient après qu'elles aient accompli leur fonction.

La présence de processus différents ou plus complexes que ceux retrouvés chez la levure peut être expliquée par d'autres arguments.

(i) Bien que *S. cerevisiae* et *N. crassa* soient des ascomycètes, elles divergent sous plusieurs aspects importants, partagés entre autres par les animaux, comme : la présence du complexe I dans la chaîne respiratoire, un rythme circadien apparent, la méthylation de l'ADN pour contrôler l'expression de gènes (110). De plus, selon la littérature, seulement 33% des gènes exprimés chez *Neurospora* ont des homologues chez *S. cerevisiae* (111) ; ces différences majeurs peuvent expliquer la présence de 21 protéines dans le complexe mtRNase P de *N. crassa* qui n'ont pas d'homologues proches, ou d'orthologues chez la levure.

(ii) Comme *N. crassa* est un organisme multicellulaire qui croît généralement sur la matière végétale morte, elle nécessite des machineries biologiques plus laborieuses et plus diversifiées que celles existantes chez la levure pour accomplir les fonctions biologiques; chez *N. crassa* pour certaines voies métaboliques – comme le métabolisme du butyrate, le métabolisme du propanoate ou le processus de la dégradation de la valine, leucine et isoleucine - il y a plus de protéines qui les accomplissent que chez la levure (ex. le processus de la dégradation de la valine, leucine et isoleucine implique la participation de 26 protéines chez *N. crassa*, tandis que celui présent chez la levure en nécessite 12 (KEGG¹⁹)).

(iii) Comme la sous-unité ARN de la mtRNase P est encodée dans le génome nucléaire et importée dans la mitochondrie chez *Neurospora*, on pourrait soupçonner que la composition protéique du complexe actif est différente de celle de la levure, adaptée à l'environnement et aux nécessités requises.

Finalement, la comparaison des composants du complexe mtRNase P chez *N. crassa* avec ceux retrouvés chez la levure et dans les fractions enrichies en activité

¹⁹ Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes Pathway (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>)

RNase P chez *Aspergillus* et l'humain (Annexes - **Tableau III** et **Tableau IV**) pointe vers l'existence d'un patron commun, un noyau de protéines majoritairement métaboliques (incluant le cycle de Kreb, le complexe de la pyruvate déshydrogénase et des protéines impliquées dans le métabolisme de différents acides aminés) et énergétiques (ex. atp1p, atp2p ou qcr2p); comme fonction, on peut imaginer que ce noyau réagit comme fournisseur des éléments nécessaires (ex. de l'ATP, des acides aminés) pour un bon fonctionnement des autres processus biologiques présents dans le complexe.

La composition du complexe purifié devrait aussi révéler des composants protéiques qui sont essentiels à l'activité mtRNase P. Selon nos données, les fonctions prédites pour la majorité des protéines du complexe ne montrent pas un lien fonctionnel direct avec l'activité de la mtRNase P. Pourtant, l'existence d'un lien fonctionnel encore inconnu avec cette activité n'est pas exclue, surtout pour les protéines dont la fonction reste encore indéterminée (**Tableau II**).

IV. 3. 1 La mtRNase P chez *N. crassa* : une forme probablement attachée aux membranes

L'hypothèse selon laquelle la mtRNase P chez *N. crassa* est possiblement attachée à la membrane interne mitochondriale est soutenue par les résultats obtenus lors de l'identification de la sous-unité ARN associée avec l'activité de la mtRNase P (**Fig. III. 8**). Selon ces résultats, seulement ~20% de la copie associée avec l'activité mtRNase P (Nc1) se retrouve dans la matrice mitochondriale soluble. Le reste est retrouvé en majorité au niveau des membranes mitochondriales, et ce, dans les conditions où la même quantité d'ARN a été utilisée pour faire le RT (quantité équivalente à ~ 2mg mitochondries pures). Ces résultats indiquent que, probablement, il y a plusieurs formes de la mtRNase P et/ou le complexe actif a été dissocié d'un plus grand complexe, attaché aux membranes mitochondriales (déjà discuté ci-dessus). Certaines données appuient la dernière hypothèse. Ainsi, dans le complexe purifié chez *N. crassa*, on trouve des protéines qui localisent aussi au niveau des membranes mitochondriales, respectivement les composantes de la chaîne respiratoire des complexes II, III et V (la succinate déshydrogénase, pepp, qcr-2p, atp1p, atp2p), les protéines du cycle de Kreb

(la succinate déshydrogénase, la malate déshydrogénase, la citrate synthase, l'aconitase, la dihydrolipoamide succinyltransférase), le chaperon hsp70-5p, la nucléase mitochondriale et la cytochrome c peroxidase (ccp1p) (**Tableau II**).

Certaines des enzymes identifiées chez *N. crassa* (ex. les protéines du cycle de Kreb et deux des quatre composantes de la β -oxydation des acides gras, l'acyl-CoA déshydrogénase 1 (acd-1p) et la 3-ketoacyl-CoA thiolase) sont déjà connues pour être associées en complexe aux membranes mitochondriales chez la souris; l'organisation en complexe des protéines du cycle de Kreb et la tendance de cette structure de rester accrochée aux membranes ont été rapportées par Robinson et ces collègues (112); aussi, l'interaction physique entre les protéines impliquées dans la β -oxydation des acides gras et les complexes de la chaîne respiratoire a été prouvée - plus précisément, il y a été démontré que ces protéines forment un supercomplexe qui permet la canalisation métabolique (113).

De plus, lors de la purification du complexe actif chez la levure (32) et chez *A. nidulans* (88), la tendance de la mtRNase P de rester avec les membranes mitochondriales a été observée.

À ces données s'ajoute le fait que l'organisation en supercomplexe attaché aux membranes de l'activité de la mtRNase P, offre certains avantages structuraux et fonctionnels. Concernant l'aspect structural, on peut argumenter que le couplage avec les membranes mitochondriales augmente la stabilité (physique et fonctionnelle) du complexe de la mtRNase P. Pour l'aspect fonctionnel, l'association en supercomplexe peut offrir l'exécution optimale et la régulation plus rapide de l'activité mtRNase P, elle peut assurer une plus grande efficacité catalytique due à la canalisation des substrats et la séquestration des intermédiaires nécessaires à la réaction enzymatique (114).

Conclusions et perspectives

Dans une première étape de cette étude, nous avons caractérisé les paires de copies nucléaires du gène *rnpB* retrouvées par RNAweasel chez *N. crassa*, *P. anserina* et *S. macrospora*. Cette caractérisation suggère une spécialisation de fonctions de ces copies chez les trois espèces, ainsi la plus stable des deux copies est transportée dans la mitochondrie pour remplacer le gène *rnpB* mitochondrial manquant. Chez *N. crassa*, nous avons identifié la présence d'une protection en 5' chez les transcrits des deux copies du gène *rnpB* ainsi que leurs extrémités 5', 3' entières. Chez *P. anserina* et *S. macrospora*, les extrémités 5', 3' d'autres paires de copies ont été extrapolées en fonction de résultats obtenus chez *N. crassa*.

Chez *N. crassa*, nous avons démontré que la mtRNase P se présente sous forme d'un complexe ARN-protéines ayant comme sous-unité ARN, la copie nucléaire la plus stable (Nc1). La caractérisation protéinique de ce complexe a révélé qu'il contient au moins 87 protéines, 73 d'entre elles sont mitochondriales. Comme chez la levure, les protéines de ce complexe sont impliquées dans plusieurs fonctions cellulaires comme le processing de l'ADN/ARN, le métabolisme, dans la traduction, la protéolyse, le repliement des protéines, la maintenance du génome mitochondrial et d'autres. Pour trois protéines, leur fonction est non déterminée. Nos résultats suggèrent la tendance de la mtRNase P chez *N. crassa* de rester attachée aux membranes comme chez la levure et *Aspergillus*.

En perspective, chez *N. crassa*, le mécanisme d'importation du P-ARN de la mtRNase P dans la mitochondrie reste encore à investiguer.

Ce projet soulève la question de la localisation (matricielle ou membranaire) de la mtRNase P chez cette espèce. Pour avoir des réponses plus précises, il sera probablement essentiel d'utiliser des détergents (ex. digitonine) et de trouver des conditions optimales qui permettront la solubilisation de l'éventuel complexe membranaire, contenant l'activité mtRNase P.

L'interférence des endonucléases non spécifiques avec le test d'activité doit être aussi prise en considération. L'ajout de l'ARN total de la levure pour compétitionner

avec le substrat, ainsi que l'addition des inhibiteurs des RNases n'ont pas réussi à supprimer ces activités. Par conséquent, nous proposons faire des délétions de gènes de ces endonucléases (ex. la nucléase S1) ou des mutations dans leur site catalytique pour désactiver totalement ou partiellement leur activité, en permettant ainsi la quantification de l'activité RNase P. Ces travaux sont faisables, car, la séquence du génome de *Neurospora* est complète et des délétions ou des mutations de gènes sont possibles chez cette espèce. De plus, selon les informations disponibles chez BROAD Institute (<http://www.broadinstitute.org>), les mutants nuls pour la nucléase S1 sont viables chez *Neurospora*.

La purification de la mtRNase P chez *P. anserina* et *S. macrospora* est aussi un résultat encore à obtenir. Pour chacune de ces deux espèces, nous avons trouvé deux P-ARN de la RNase P qui sont encodés par des gènes nucléaires. Ainsi, il serait intéressant de voir si, chez ces espèces, la mtRNase P se présente sous forme d'un grand complexe ARN-protéines ayant un P-ARN encodé dans le génome nucléaire. Plus précisément, Pa1, respectivement Sm1, les homologues structuraux de Nc1.

Finalement, cette étude nous a permis d'approfondir nos connaissances sur le profil évolutif de la fonction mtRNase P chez les ascomycètes. Il nous a donnés des indices sur l'évolution du phénomène endosymbiotique du génome mitochondrial et sur l'usage de la duplication de gènes au cours de l'évolution.

RÉFÉRENCES

1. Fraenkel-Conrat, H. and Williams, R.C. (1955) Reconstitution of Active Tobacco Mosaic Virus from Its Inactive Protein and Nucleic Acid Components. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 41, 690-698.
2. Kruger, K., Grabowski, P.J., Zaug, A.J., Sands, J., Gottschling, D.E. and Cech, T.R. (1982) Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of Tetrahymena. *Cell*, 31, 147-157.
3. Guerrier-Takada, C., Gardiner, K., Marsh, T., Pace, N. and Altman, S. (1983) The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell*, 35, 849-857.
4. Daly, T., Chen, X.S. and Penny, D. (2011) How old are RNA networks? *Advances in experimental medicine and biology*, 722, 255-273.
5. Randau, L., Schroder, I. and Soll, D. (2008) Life without RNase P. *Nature*, 453, 120-123.
6. Altman, S., Liu, F. and SpringerLink (Service en ligne). (2010) *Ribonuclease P*. Springer, New York ; London.
7. Chen, J.L. and Pace, N.R. (1997) Identification of the universally conserved core of ribonuclease P RNA. *RNA*, 3, 557-560.
8. Cassano, A.G., Anderson, V.E. and Harris, M.E. (2004) Analysis of solvent nucleophile isotope effects: evidence for concerted mechanisms and nucleophilic activation by metal coordination in nonenzymatic and ribozyme-catalyzed phosphodiester hydrolysis. *Biochemistry*, 43, 10547-10559.
9. Kazantsev, A.V. and Pace, N.R. (2006) Bacterial RNase P: a new view of an ancient enzyme. *Nature reviews. Microbiology*, 4, 729-740.
10. Peck-Miller, K.A. and Altman, S. (1991) Kinetics of the processing of the precursor to 4.5 S RNA, a naturally occurring substrate for RNase P from *Escherichia coli*. *Journal of molecular biology*, 221, 1-5.
11. Hori, Y., Tanaka, T. and Kikuchi, Y. (2000) The catalytic RNA of RNase P from *Escherichia coli* cleaves *Drosophila* 2S ribosomal RNA in vitro: a new type of naturally occurring substrate for the ribozyme. *FEBS letters*, 472, 187-190.
12. Komine, Y., Kitabatake, M., Yokogawa, T., Nishikawa, K. and Inokuchi, H. (1994) A tRNA-like structure is present in 10Sa RNA, a small stable RNA from *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91, 9223-9227.
13. Morrissey, J.P. and Tollervey, D. (1995) Birth of the snoRNPs; the evolution of RNase MRP and the eukaryotic pre-rRNA-processing system. *Trends in biochemical sciences*, 20, 78-82.
14. Altman, S., Wesolowski, D., Guerrier-Takada, C. and Li, Y. (2005) RNase P cleaves transient structures in some riboswitches. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 11284-11289.

15. Li, Y. and Altman, S. (2004) Polarity effects in the lactose operon of *Escherichia coli*. *Journal of molecular biology*, 339, 31-39.
16. Li, Y. and Altman, S. (2003) A specific endoribonuclease, RNase P, affects gene expression of polycistronic operon mRNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 13213-13218.
17. Alifano, P., Rivellini, F., Piscitelli, C., Arraiano, C.M., Bruni, C.B. and Carlomagno, M.S. (1994) Ribonuclease E provides substrates for ribonuclease P-dependent processing of a polycistronic mRNA. *Genes & development*, 8, 3021-3031.
18. Kikuchi, Y., Sasaki, N. and Ando-Yamagami, Y. (1990) Cleavage of tRNA within the mature tRNA sequence by the catalytic RNA of RNase P: implication for the formation of the primer tRNA fragment for reverse transcription in copia retrovirus-like particles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87, 8105-8109.
19. Guerrier-Takada, C., van Belkum, A., Pleij, C.W. and Altman, S. (1988) Novel reactions of RNAase P with a tRNA-like structure in turnip yellow mosaic virus RNA. *Cell*, 53, 267-272.
20. Yang, L. and Altman, S. (2007) A noncoding RNA in *Saccharomyces cerevisiae* is an RNase P substrate. *RNA*, 13, 682-690.
21. Coughlin, D.J., Pleiss, J.A., Walker, S.C., Whitworth, G.B. and Engelke, D.R. (2008) Genome-wide search for yeast RNase P substrates reveals role in maturation of intron-encoded box C/D small nucleolar RNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 12218-12223.
22. Samanta, M.P., Tongprasit, W., Sethi, H., Chin, C.S. and Stolc, V. (2006) Global identification of noncoding RNAs in *Saccharomyces cerevisiae* by modulating an essential RNA processing pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 4192-4197.
23. Jarrous, N. and Reiner, R. (2007) Human RNase P: a tRNA-processing enzyme and transcription factor. *Nucleic acids research*, 35, 3519-3524.
24. Reiner, R., Ben-Asouli, Y., Krilovetzky, I. and Jarrous, N. (2006) A role for the catalytic ribonucleoprotein RNase P in RNA polymerase III transcription. *Genes & development*, 20, 1621-1635.
25. Reiner, R., Krasnov-Yoeli, N., Dehtiar, Y. and Jarrous, N. (2008) Function and assembly of a chromatin-associated RNase P that is required for efficient transcription by RNA polymerase I. *PloS one*, 3, e4072.
26. Ishiguro, A., Kassavetis, G.A. and Geiduschek, E.P. (2002) Essential roles of Bdp1, a subunit of RNA polymerase III initiation factor TFIIIB, in transcription and tRNA processing. *Molecular and cellular biology*, 22, 3264-3275.
27. Stribinskis, V., Heyman, H.C., Ellis, S.R., Steffen, M.C. and Martin, N.C. (2005) Rpm2p, a component of yeast mitochondrial RNase P, acts as a transcriptional activator in the nucleus. *Molecular and cellular biology*, 25, 6546-6558.

28. Stribinskis, V., Gao, G.J., Ellis, S.R. and Martin, N.C. (2001) Rpm2, the protein subunit of mitochondrial RNase P in *Saccharomyces cerevisiae*, also has a role in the translation of mitochondrially encoded subunits of cytochrome c oxidase. *Genetics*, 158, 573-585.
29. Collins, L.J. (2011) The RNA infrastructure: an introduction to ncRNA networks. *Advances in experimental medicine and biology*, 722, 1-19.
30. Kassenbrock, C.K., Gao, G.J., Groom, K.R., Sulo, P., Douglas, M.G. and Martin, N.C. (1995) RPM2, independently of its mitochondrial RNase P function, suppresses an ISP42 mutant defective in mitochondrial import and is essential for normal growth. *Molecular and cellular biology*, 15, 4763-4770.
31. Hiltunen, J.K., Schonauer, M.S., Autio, K.J., Mittelmeier, T.M., Kastaniotis, A.J. and Dieckmann, C.L. (2009) Mitochondrial fatty acid synthesis type II: more than just fatty acids. *The Journal of biological chemistry*, 284, 9011-9015.
32. Daoud, R., Forget, L. and Lang, B.F. (2012) Yeast mitochondrial RNase P, RNase Z and the RNA degradosome are part of a stable supercomplex. *Nucleic acids research*, 40, 1728-1736.
33. Schonauer, M.S., Kastaniotis, A.J., Hiltunen, J.K. and Dieckmann, C.L. (2008) Intersection of RNA processing and the type II fatty acid synthesis pathway in yeast mitochondria. *Molecular and cellular biology*, 28, 6646-6657.
34. Daoud, R. (2011), Thèse (Ph D), Supercomplexes multifonctionnels chez les mitochondries et *E. coli*, Université de Montréal, Montréal pp. 128.
35. Seif, E.R., Forget, L., Martin, N.C. and Lang, B.F. (2003) Mitochondrial RNase P RNAs in ascomycete fungi: lineage-specific variations in RNA secondary structure. *RNA*, 9, 1073-1083.
36. Seif, E., Leigh, J., Liu, Y., Roewer, I., Forget, L. and Lang, B.F. (2005) Comparative mitochondrial genomics in zygomycetes: bacteria-like RNase P RNAs, mobile elements and a close source of the group I intron invasion in angiosperms. *Nucleic acids research*, 33, 734-744.
37. Hartmann, E. and Hartmann, R.K. (2003) The enigma of ribonuclease P evolution. *Trends in genetics : TIG*, 19, 561-569.
38. Ellis, J.C. and Brown, J.W. (2009) The RNase P family. *RNA biology*, 6, 362-369.
39. Kikovska, E., Svard, S.G. and Kirsebom, L.A. (2007) Eukaryotic RNase P RNA mediates cleavage in the absence of protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 2062-2067.
40. Pannucci, J.A., Haas, E.S., Hall, T.A., Harris, J.K. and Brown, J.W. (1999) RNase P RNAs from some Archaea are catalytically active. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 7803-7808.
41. Tsai, H.Y., Pulukkunat, D.K., Woznick, W.K. and Gopalan, V. (2006) Functional reconstitution and characterization of *Pyrococcus furiosus*

- RNase P. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 16147-16152.
42. Houser-Scott, F., Xiao, S., Millikin, C.E., Zengel, J.M., Lindahl, L. and Engelke, D.R. (2002) Interactions among the protein and RNA subunits of *Saccharomyces cerevisiae* nuclear RNase P. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 2684-2689.
 43. Boomershine, W.P., McElroy, C.A., Tsai, H.Y., Wilson, R.C., Gopalan, V. and Foster, M.P. (2003) Structure of Mth11/Mth Rpp29, an essential protein subunit of archaeal and eukaryotic RNase P. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 15398-15403.
 44. Amero, C.D., Boomershine, W.P., Xu, Y. and Foster, M. (2008) Solution structure of *Pyrococcus furiosus* RPP21, a component of the archaeal RNase P holoenzyme, and interactions with its RPP29 protein partner. *Biochemistry*, 47, 11704-11710.
 45. Wilson, R.C., Bohlen, C.J., Foster, M.P. and Bell, C.E. (2006) Structure of Pfu Pop5, an archaeal RNase P protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 873-878.
 46. Marvin, M.C. and Engelke, D.R. (2009) Broadening the mission of an RNA enzyme. *Journal of cellular biochemistry*, 108, 1244-1251.
 47. Hall, T.A. and Brown, J.W. (2004) Interactions between RNase P protein subunits in archaea. *Archaea*, 1, 247-254.
 48. Lang, B.F., Gray, M.W. and Burger, G. (1999) Mitochondrial genome evolution and the origin of eukaryotes. *Annual review of genetics*, 33, 351-397.
 49. Hollingsworth, M.J. and Martin, N.C. (1986) RNase P activity in the mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae* depends on both mitochondrion and nucleus-encoded components. *Molecular and cellular biology*, 6, 1058-1064.
 50. Morales, M.J., Wise, C.A., Hollingsworth, M.J. and Martin, N.C. (1989) Characterization of yeast mitochondrial RNase P: an intact RNA subunit is not essential for activity in vitro. *Nucleic acids research*, 17, 6865-6881.
 51. Gobert, A., Gutmann, B., Taschner, A., Gossringer, M., Holzmann, J., Hartmann, R.K., Rossmann, W. and Giegé, P. (2010) A single Arabidopsis organellar protein has RNase P activity. *Nature structural & molecular biology*, 17, 740-744.
 52. Holzmann, J., Frank, P., Löffler, E., Bennett, K.L., Gerner, C. and Rossmann, W. (2008) RNase P without RNA: identification and functional reconstitution of the human mitochondrial tRNA processing enzyme. *Cell*, 135, 462-474.
 53. Gutmann, B., Gobert, A. and Giegé, P. (2012) PRORP proteins support RNase P activity in both organelles and the nucleus in Arabidopsis. *Genes & development*, 26, 1022-1027.
 54. Miller, D.L. and Martin, N.C. (1983) Characterization of the yeast mitochondrial locus necessary for tRNA biosynthesis: DNA sequence analysis and identification of a new transcript. *Cell*, 34, 911-917.

55. Underbrink-Lyon, K., Miller, D.L., Ross, N.A., Fukuhara, H. and Martin, N.C. (1983) Characterization of a yeast mitochondrial locus necessary for tRNA biosynthesis. Deletion mapping and restriction mapping studies. *Molecular & general genetics : MGG*, 191, 512-518.
56. Lee, Y.C., Lee, B.J., Hwang, D.S. and Kang, H.S. (1996) Purification and characterization of mitochondrial ribonuclease P from *Aspergillus nidulans*. *European journal of biochemistry / FEBS*, 235, 289-296.
57. Bullerwell, C.E., Leigh, J., Forget, L. and Lang, B.F. (2003) A comparison of three fission yeast mitochondrial genomes. *Nucleic acids research*, 31, 759-768.
58. Lang, B.F., Burger, G., O'Kelly, C.J., Cedergren, R., Golding, G.B., Lemieux, C., Sankoff, D., Turmel, M. and Gray, M.W. (1997) An ancestral mitochondrial DNA resembling a eubacterial genome in miniature. *Nature*, 387, 493-497.
59. Turmel, M., Lemieux, C., Burger, G., Lang, B.F., Otis, C., Plante, I. and Gray, M.W. (1999) The complete mitochondrial DNA sequences of *Nephroselmis olivacea* and *Pedinomonas minor*. Two radically different evolutionary patterns within green algae. *The Plant cell*, 11, 1717-1730.
60. Bullerwell, C.E. and Lang, B.F. (2005) Fungal evolution: the case of the vanishing mitochondrion. *Current opinion in microbiology*, 8, 362-369.
61. Seif, E. (2005) Thèse (Ph D), Université de Montréal, Évolution structurale et fonctionnelle de la composante ARN de la RNase P mitochondriale, Université de Montréal, Montréal.
62. Lee, Y.C., Lee, B.J. and Kang, H.S. (1996) The RNA component of mitochondrial ribonuclease P from *Aspergillus nidulans*. *European journal of biochemistry / FEBS*, 235, 297-303.
63. Walker, S.C. and Engelke, D.R. (2008) A protein-only RNase P in human mitochondria. *Cell*, 135, 412-414.
64. Wang, G., Chen, H.W., Oktay, Y., Zhang, J., Allen, E.L., Smith, G.M., Fan, K.C., Hong, J.S., French, S.W., McCaffery, J.M. *et al.* (2010) PNPASE regulates RNA import into mitochondria. *Cell*, 142, 456-467.
65. Puranam, R.S. and Attardi, G. (2001) The RNase P associated with HeLa cell mitochondria contains an essential RNA component identical in sequence to that of the nuclear RNase P. *Molecular and cellular biology*, 21, 548-561.
66. Seif, E., Cadieux, A. and Lang, B.F. (2006) Hybrid *E. coli*--Mitochondrial ribonuclease P RNAs are catalytically active. *RNA*, 12, 1661-1670.
67. Lang, B.F., Laforest, M.J. and Burger, G. (2007) Mitochondrial introns: a critical view. *Trends in genetics : TIG*, 23, 119-125.
68. Gautheret, D. and Lambert, A. (2001) Direct RNA motif definition and identification from multiple sequence alignments using secondary structure profiles. *Journal of molecular biology*, 313, 1003-1011.
69. Dieci, G., Fiorino, G., Castelnuovo, M., Teichmann, M. and Pagano, A. (2007) The expanding RNA polymerase III transcriptome. *Trends in genetics : TIG*, 23, 614-622.

70. Dieci, G., Conti, A., Pagano, A. and Carnevali, D. (2013) Identification of RNA polymerase III-transcribed genes in eukaryotic genomes. *Biochimica et biophysica acta*, 1829, 296-305.
71. Sinha, K.M., Gu, J., Chen, Y. and Reddy, R. (1998) Adenylation of small RNAs in human cells. Development of a cell-free system for accurate adenylation on the 3'-end of human signal recognition particle RNA. *The Journal of biological chemistry*, 273, 6853-6859.
72. Shumyatsky, G.P., Tillib, S.V. and Kramerov, D.A. (1990) B2 RNA and 7SK RNA, RNA polymerase III transcripts, have a cap-like structure at their 5' end. *Nucleic acids research*, 18, 6347-6351.
73. Singh, R. and Reddy, R. (1989) Gamma-monomethyl phosphate: a cap structure in spliceosomal U6 small nuclear RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86, 8280-8283.
74. Gupta, S., Busch, R.K., Singh, R. and Reddy, R. (1990) Characterization of U6 small nuclear RNA cap-specific antibodies. Identification of gamma-monomethyl-GTP cap structure in 7SK and several other human small RNAs. *The Journal of biological chemistry*, 265, 19137-19142.
75. Kramerov, D.A., Lekakh, I.V., Samarina, O.P. and Ryskov, A.P. (1982) The sequences homologous to major interspersed repeats B1 and B2 of mouse genome are present in mRNA and small cytoplasmic poly(A) + RNA. *Nucleic acids research*, 10, 7477-7491.
76. Borodulina, O.R. and Kramerov, D.A. (2008) Transcripts synthesized by RNA polymerase III can be polyadenylated in an AAUAAA-dependent manner. *RNA*, 14, 1865-1873.
77. Kramerov, D.A., Tillib, S.V., Ryskov, A.P. and Georgiev, G.P. (1985) Nucleotide sequence of small polyadenylated B2 RNA. *Nucleic acids research*, 13, 6423-6437.
78. Myslinski, E., Ame, J.C., Krol, A. and Carbon, P. (2001) An unusually compact external promoter for RNA polymerase III transcription of the human H1RNA gene. *Nucleic acids research*, 29, 2502-2509.
79. James Faresse, N., Canella, D., Praz, V., Michaud, J., Romascano, D. and Hernandez, N. (2012) Genomic study of RNA polymerase II and III SNAPc-bound promoters reveals a gene transcribed by both enzymes and a broad use of common activators. *PLoS genetics*, 8, e1003028.
80. Lee, J.Y., Rohlman, C.E., Molony, L.A. and Engelke, D.R. (1991) Characterization of RPR1, an essential gene encoding the RNA component of *Saccharomyces cerevisiae* nuclear RNase P. *Molecular and cellular biology*, 11, 721-730.
81. Tranguch, A.J. and Engelke, D.R. (1993) Comparative structural analysis of nuclear RNase P RNAs from yeast. *The Journal of biological chemistry*, 268, 14045-14055.
82. Lee, B., Matera, A.G., Ward, D.C. and Craft, J. (1996) Association of RNase mitochondrial RNA processing enzyme with ribonuclease P in higher ordered structures in the nucleolus: a possible coordinate role in ribosome biogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93, 11471-11476.

83. Jarrous, N. and Gopalan, V. (2010) Archaeal/eukaryal RNase P: subunits, functions and RNA diversification. *Nucleic acids research*, 38, 7885-7894.
84. Kohler, A. and Hurt, E. (2007) Exporting RNA from the nucleus to the cytoplasm. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8, 761-773.
85. Wang, G., Shimada, E., Koehler, C.M. and Teitell, M.A. (2012) PNPASE and RNA trafficking into mitochondria. *Biochimica et biophysica acta*, 1819, 998-1007.
86. Alfonzo, J.D. and Soll, D. (2009) Mitochondrial tRNA import--the challenge to understand has just begun. *Biological chemistry*, 390, 717-722.
87. Endo, T., Yamano, K. and Yoshihisa, T. (2010) Mitochondrial matrix reloaded with RNA. *Cell*, 142, 362-363.
88. Javadi Khomami, P. (2010). Mémoire (Ms), Purification of mitochondrial RNase P in *A. nidulans*, Université de Montréal, Montréal.
89. Leister, D. and Herrmann, J. (2007) *Mitochondria : practical protocols*. Humana Press, Totowa, N.J.
90. Burger, G., Lavrov, D.V., Forget, L. and Lang, B.F. (2007) Sequencing complete mitochondrial and plastid genomes. *Nature protocols*, 2, 603-614.
91. Gordon, D., Abajian, C. and Green, P. (1998) Consed: a graphical tool for sequence finishing. *Genome research*, 8, 195-202.
92. Espagne, E., Lespinet, O., Malagnac, F., Da Silva, C., Jaillon, O., Porcel, B.M., Couloux, A., Aury, J.M., Segurens, B., Poulain, J. *et al.* (2008) The genome sequence of the model ascomycete fungus *Podospora anserina*. *Genome biology*, 9, R77.
93. Paoletti, M. and Saupe, S.J. (2008) The genome sequence of *Podospora anserina*, a classic model fungus. *Genome biology*, 9, 223.
94. Nowrousian, M., Stajich, J.E., Chu, M., Engh, I., Espagne, E., Halliday, K., Kamerewerd, J., Kempken, F., Knab, B., Kuo, H.C. *et al.* (2010) De novo assembly of a 40 Mb eukaryotic genome from short sequence reads: *Sordaria macrospora*, a model organism for fungal morphogenesis. *PLoS genetics*, 6, e1000891.
95. Yusuf, D., Marz, M., Stadler, P.F. and Hofacker, I.L. (2010) Bcheck: a wrapper tool for detecting RNase P RNA genes. *BMC genomics*, 11, 432.
96. Moore, P.B. (1999) Structural motifs in RNA. *Annual review of biochemistry*, 68, 287-300.
97. Sargsyan, K. and Lim, C. (2010) Arrangement of 3D structural motifs in ribosomal RNA. *Nucleic acids research*, 38, 3512-3522.
98. Keeping, A., Deabreu, D., Dibernardo, M. and Collins, R.A. (2011) Gel-based mass spectrometric and computational approaches to the mitochondrial proteome of *Neurospora*. *Fungal genetics and biology : FG & B*, 48, 526-536.
99. Marques, I., Dencher, N.A., Videira, A. and Krause, F. (2007) Supramolecular organization of the respiratory chain in *Neurospora crassa* mitochondria. *Eukaryotic cell*, 6, 2391-2405.
100. Proctor, D.J., Schaak, J.E., Bevilacqua, J.M., Falzone, C.J. and Bevilacqua, P.C. (2002) Isolation and characterization of a family of stable RNA

- tetraloops with the motif YNMG that participate in tertiary interactions. *Biochemistry*, 41, 12062-12075.
101. Belanger, F., Gagnon, M.G., Steinberg, S.V., Cunningham, P.R. and Brakier-Gingras, L. (2004) Study of the functional interaction of the 900 Tetraloop of 16S ribosomal RNA with helix 24 within the bacterial ribosome. *Journal of molecular biology*, 338, 683-693.
 102. Reichert, A.S. and Morl, M. (2000) Repair of tRNAs in metazoan mitochondria. *Nucleic acids research*, 28, 2043-2048.
 103. Schurer, H., Schiffer, S., Marchfelder, A. and Morl, M. (2001) This is the end: processing, editing and repair at the tRNA 3'-terminus. *Biological chemistry*, 382, 1147-1156.
 104. Tomita, K., Ueda, T. and Watanabe, K. (1996) RNA editing in the acceptor stem of squid mitochondrial tRNA(Tyr). *Nucleic acids research*, 24, 4987-4991.
 105. Yokobori, S. and Paabo, S. (1995) Transfer RNA editing in land snail mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92, 10432-10435.
 106. Liu, M. and Spremulli, L. (2000) Interaction of mammalian mitochondrial ribosomes with the inner membrane. *The Journal of biological chemistry*, 275, 29400-29406.
 107. Dimmer, K.S., Fritz, S., Fuchs, F., Messerschmitt, M., Weinbach, N., Neupert, W. and Westermann, B. (2002) Genetic basis of mitochondrial function and morphology in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular biology of the cell*, 13, 847-853.
 108. Merz, S. and Westermann, B. (2009) Genome-wide deletion mutant analysis reveals genes required for respiratory growth, mitochondrial genome maintenance and mitochondrial protein synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genome biology*, 10, R95.
 109. Reifschneider, N.H., Goto, S., Nakamoto, H., Takahashi, R., Sugawa, M., Dencher, N.A. and Krause, F. (2006) Defining the mitochondrial proteomes from five rat organs in a physiologically significant context using 2D blue-native/SDS-PAGE. *Journal of proteome research*, 5, 1117-1132.
 110. Arnold, J. and Hilton, N. (2003) Genome sequencing: Revelations from a bread mould. *Nature*, 422, 821-822.
 111. Braun, E.L., Halpern, A.L., Nelson, M.A. and Natvig, D.O. (2000) Large-scale comparison of fungal sequence information: mechanisms of innovation in *Neurospora crassa* and gene loss in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genome research*, 10, 416-430.
 112. Robinson, J.B., Jr. and Srere, P.A. (1985) Organization of Krebs tricarboxylic acid cycle enzymes in mitochondria. *The Journal of biological chemistry*, 260, 10800-10805.
 113. Wang, Y., Mohsen, A.W., Mihalik, S.J., Goetzman, E.S. and Vockley, J. (2010) Evidence for physical association of mitochondrial fatty acid oxidation and oxidative phosphorylation complexes. *The Journal of biological chemistry*, 285, 29834-29841.

114. Schafer, E., Seelert, H., Reifschneider, N.H., Krause, F., Dencher, N.A. and Vonck, J. (2006) Architecture of active mammalian respiratory chain supercomplexes. *The Journal of biological chemistry*, 281, 15370-15375.

ANNEXES

Tableau III : Protéines présentes dans le complexe mtRNase P chez *N. crassa*, dans celui de *S. cerevisiae* (32) et/ou dans les fractions enrichies en activité mtRNase P chez *Aspergillus* et l'humain (52,88).

No protéine	Symbole du gène	Processus biologique	Description de la protéine	Présence dans		
				le complexe de la mtRNase P chez <i>S. cerevisiae</i>	les fractions enrichies en activité mtRNase P chez <i>Aspergillus</i>	les fractions enrichies en activité mtRNase P chez l'humain
1	NCU08693 (hsp 70-5)	Transport/chaperons	heat shock 70 kDa protein mitochondrial precursor	non	oui	oui
2	NCU00030	Maintenance du génome; ADN/ARN processing	mitochondrial nuclease / DNA/RNA non-specific endonuclease	non	non	oui
3	NCU03297 (ccp-1)	Détoxification/ apoptose	cytochrome c peroxidase mitochondrial precursor	non	oui	non
4	NCU01473 (mrp-51)	Traduction mitochondriale	related to ribosomal protein YmL35/ mitochondrial large ribosomal subunit YmL35	oui	non	non
5	NCU04171 (mrp-21)	Traduction mitochondriale	related to ribosomal protein L5 precursor mitochondrial /mitochondrial ribosomal protein-21	oui	non	non
6	NCU06270 (mmp)	Protéolyse	matrix processing peptidase /mitochondrial processing peptidase alpha subunit	non	oui	oui
7	NCU02549 (pep)	Protéolyse; OXPHOS	processing enhancing protein / mitochondrial processing peptidase beta subunit et Cytochrome b-c1 complex subunit 1	non	oui	oui
8	NCU03559 (qcr-2)	OXPHOS	core protein II /Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial	oui	non	oui
9	NCU02514 (atp-1)	OXPHOS	mitochondrial ATPase alpha-subunit	oui	oui	oui
10	NCU05430 (atp-2)	OXPHOS	unnamed protein product / ATP synthase subunit beta, mitochondrial	oui	oui	oui
11	NCU08336	Cycle de Krebs; OXPHOS	succinate dehydrogenase flavoprotein subunit mitochondrial precursor	oui	non	oui
12	NCU02366	Cycle de Krebs; métabolisme du glyoxylate et du dicarboxylate	hypothetical protein NCU02366 /aconitate hydratase, mitochondrial	oui	oui	oui
13	NCU01692 (cit-1)	Cycle de Krebs; métabolisme du glyoxylate et du dicarboxylate	mitochondrial citrate synthase	oui	oui	oui
14	NCU02482 (cit-3)	Cycle de Krebs; métabolisme du glyoxylate et du dicarboxylate	2-methylcitrate synthase mitochondrial precursor	non	oui	oui

15	NCU05425	Cycle de Krebs; dégradation de la lysine; métabolisme du tryptophane	probable oxoglutarate dehydrogenase precursor /2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component	oui	non	oui
16	NCU02438	Cycle de Krebs; dégradation de la lysine	hypothetical protein NCU02438/ 2-oxoglutarate dehydrogenase complex E2 component/dihydrolipoamide succinyltransferase	oui	non	oui
17	NCU02407	Cycle de Krebs; glycolyse/Gluconéogenèse; métabolisme du pyruvate; dégradation de la valine, leucine et isoleucine	dihydrolipoyl dehydrogenase mitochondrial precursor / dihydrolipoamide dehydrogenase component E3/ dihydrolipoyl dehydrogenase	oui	non	oui
18	NCU06482	Cycle de Krebs; glycolyse/gluconéogenèse; métabolisme du pyruvate; métabolisme du butyrate; biosynthèse de la valine, leucine et isoleucine	pyruvate dehydrogenase E1 component alpha subunit mitochondrial	oui	non	oui
19	NCU03004	Cycle de Krebs; glycolyse/gluconéogenèse; métabolisme du pyruvate; métabolisme du butyrate; biosynthèse de la valine, leucine et isoleucine	probable pyruvate dehydrogenase (lipoamide) beta chain precursor / pyruvate dehydrogenase (lipoamide) beta chain precursor	non	non	oui
20	NCU07697	Cycle de Krebs	isocitrate dehydrogenase subunit 2 mitochondrial precursor	oui	oui	oui
21	NCU01227	Cycle de Krebs; métabolisme du propanoate	probable atp-specific succinyl-coa synthetase alpha subunit/ succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit alpha, mitochondrial	oui	non	oui
22	NCU08471	Cycle de Krebs; métabolisme du propanoate	probable beta-succinyl CoA synthetase precursor / succinyl-CoA ligase [GDP-forming] subunit beta, mitochondrial	oui	non	non
23	NCU06211	Cycle de Krebs; métabolisme du pyruvate; métabolisme du glyoxylate et du dicarboxylate	malate dehydrogenase mitochondrial precursor	non	oui	oui
24	NCU04899	Cycle de Krebs; métabolisme du pyruvate; métabolisme du glyoxylate et du dicarboxylate	malate dehydrogenase mitochondrial precursor	oui	oui	oui
25	NCU10008	Cycle de Krebs	fumarate hydratase mitochondrial precursor	oui	oui	oui

26	NCU03415	Glycolyse/gluconéogenèse; interconversion du pentose et de l'acide gluconique; métabolisme de la vitamine C et de l'acide aldarique; métabolisme du pyruvate; métabolisme du propanoate; métabolisme des acides gras; métabolisme des glycérolipides; dégradation de la valine, leucine et isoleucine; dégradation de la lysine; métabolisme de l'arginine et proline; métabolisme de la histidine; métabolisme du tryptophane	probable aldehyde dehydrogenase /aldehyde dehydrogenase	oui	non	non
27	NCU03608 (iv-2)	Biosynthèse de la valine, leucine et isoleucine; biosynthèse de la vitamine B5 et CoA	alpha-keto-beta-hydroxylacyl reductoisomerase / ketol-acid reductoisomerase, mitochondrial precursor	oui	non	non
28	NCU08272	Métabolisme du pyruvate	cytochrome b2 mitochondrial precursor	oui	non	non
29	NCU03076	Métabolisme de l'alanine, de l'aspartate et du glutamate; métabolisme de l'arginine et proline	delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase	oui	non	oui
30	NCU05805	Métabolisme du méthane; métabolisme de la glycine, serine et thréonine; métabolisme des acides cyanoaminés; métabolisme de la vitamine B9	serine hydroxymethyltransferase mitochondrial precursor	oui	non	oui
31	NCU06460	Métabolisme de la vitamine B2	hypothetical protein NCU06460/ acid phosphatase	non	oui	oui
32	NCU01546	Métabolisme de la porphyrine et la chlorophylle	probable coproporphyrinogen oxidase precursor / coproporphyrinogen III oxidase/ strong similarity to coproporphyrinogen oxidase precursor, mitochondrial, <i>Mus musculus</i>	non	non	oui
33	NCU09553	Métabolisme du butyrate; métabolisme de la phénylalanine; métabolisme de lipides, des acides gras et terpénoïdes;	hypothetical protein NCU09553 / 3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase	non	non	oui
34	NCU03100	Métabolisme du pentose phosphate; métabolisme du glutathion	6-phosphogluconate dehydrogenase	non	oui	non
35	NCU09058	Métabolisme des acides gras et terpénoïdes; dégradation de la valine, leucine et isoleucine; ARN processing	hypothetical protein NCU09058 / similar to mitochondrial methylglutaconyl-CoA hydratase Auh/ AU-specific RNA-binding enoyl-CoA hydratase	non	non	oui

36	NCU06543	Métabolisme des acides gras; dégradation de la valine, leucine et isoleucine	acyl-CoA dehydrogenase mitochondrial precursor	non	non	oui
37	NCU05558	Métabolisme des acides gras; métabolisme du acide α-linoléique; dégradation de la valine, leucine et isoleucine	3-ketoacyl-CoA thiolase	non	oui	oui
38	NCU10383	Métabolisme de l'alanine, de l'aspartate et du glutamate; métabolisme de la cystéine et de la méthionine; métabolisme de l'arginine et proline; métabolisme de la tyrosine; métabolisme de la phénylalanine; biosynthèse de la phénylalanine, de la tyrosine et du tryptophane	aspartate aminotransferase mitochondrial	oui	oui	oui
39	NCU04579	Biosynthèse de la valine, leucine et isoleucine; biosynthèse de la vitamine B5 et CoA	dihydroxy-acid dehydratase	oui	oui	non
40	NCU02475	Métabolisme de la glycine, serine et thréonine	probable glycine decarboxylase P subunit /glycine dehydrogenase	oui	non	non
41	NCU00936	Métabolisme du butyrate; métabolisme de l'alanine, de l'aspartate et du glutamate; métabolisme de la tyrosine;	succinate semialdehyde dehydrogenase	non	non	oui
42	NCU02179	Métabolisme du pyruvate	D-lactate dehydrogenase mitochondrial precursor	non	oui	non
43	NCU00591	Dégradation de la valine, leucine et isoleucine	methylcrotonoyl-CoA carboxylase alpha chain mitochondrial precursor	non	non	oui
44	NCU03339	Métabolisme du glutathion	glutathione-disulfide reductase	non	non	oui
45	NCU02084/ NCU02333	Métabolisme de l'arginine et proline	conserved hypothetical protein / Arginase	non	non	oui
46	NCU01861	Métabolisme des lipides	hypothetical protein NCU01861 / similar to short chain dehydrogenase/reductase family/3-ketoacyl-(acyl-carrier-protein) reductase / ortholog in <i>S. cerevisiae</i> (oar1);	oui	non	non
47	NCU09732	Métabolisme du pyruvate; métabolisme du glyoxylate et du dicarboxylate; métabolisme du propanoate; métabolisme du butyrate; métabolisme des acides gras; synthèse et dégradation de cétones; dégradation de la valine, leucine et isoleucine; dégradation de la lysine; métabolisme du tryptophane	acetyl-CoA acetyltransferase/ortholog in mammals ACAT1 and in yeast Erg10	non	oui	oui

Tableau IV. Analyse protéique comparative faite entre le complexe mtRNase P chez *N.crassa*, le complexe actif retrouvé chez *S. cerevisiae* (32) et les fractions enrichies en activité mtRNase P chez *Aspergillus* et l'humain (52,88). Cette comparaison est faite en fonction de nombre des protéines partagées par chaque processus biologique pour les deux complexes et les fractions. Le tableau a été fait en tenant compte de tous processus biologiques dans lesquels chaque protéine est impliquée.

Processus biologique	No de protéines trouvées pour chaque processus dans le complexe mtRNase P chez		No de protéines partagées entre le complexe de la mtRNase P chez <i>N. crassa</i> et		
	<i>N. crassa</i>	<i>S. cerevisiae</i>	le complexe mtRNase P chez	les fractions enrichies en activité mtRNase P chez	
			<i>S. cerevisiae</i>	<i>A. nidulans</i>	l'humain
ARN et/ou ADN processing	5	9	0	0	2
Maintenance du génome	2	6	0	0	1
Facteurs de transcription	0	1	0	0	0
Facteurs d'élongation de la traduction	0	3	0	0	0
Traduction/ ribosome	4	35	2	0	0
Traduction/ aminoacyl-tRNA synthétase	0	2	0	0	0
Protéolyse	3	5	0	1	1
Transport	3	7	0	1	1
Cycle de Krebs	9	9	9	5	9
Métabolisme du glyoxylate et du dicarboxylate	6	6	3	3	4
Glycolyse/ Gluconéogenèse	5	12	3	0	2
Métabolisme du pyruvate	8	6	5	2	4
Métabolisme du butyrate	6	2	1	0	4
Métabolisme du propanoate	6	2	2	0	2
Interconversions du pentose et de l'acide glucoronique	1	1	1	0	0

Métabolisme de la vitamine C et de l'acide aldarique	1	1	1	0	0
Métabolisme du pentose phosphate	2	1	0	1	0
Métabolisme du inositol phosphate	1	0	0	0	0
Métabolisme de l'amidon et/ou du sucre	2	0	0	0	0
Métabolisme du sucre	1	1	0	0	0
Métabolisme non déterminé des glucides	6	0	0	0	0
Métabolisme du méthane	3	3	1	0	1
OXPHOS	5	7	4	2	3
Métabolisme des acides gras	8	1	1	1	4
Métabolisme des glycérolipides	1	1	1	0	0
Synthèse et dégradation de cétones	2	0	0	0	1
Métabolisme de l'acide α -linoléinique	1	0	0	1	1
Métabolisme des lipides	1	1	1	0	0
Métabolisme de la purine	2	1	0	0	0
Dégradation de la lysine	5	2	2	0	2
Métabolisme du tryptophane	5	2	2	0	2
Métabolisme de la glycine, sérine et thréonine	5	4	3	0	2
Dégradation de la valine, leucine et isoleucine	13	3	1	1	6
Biosynthèse de la valine, leucine et isoleucine	3	10	3	1	1
Métabolisme de l'alanine, de l'aspartate et du glutamate	5	4	2	1	2
Métabolisme de l'arginine et proline	5	6	3	1	3
Métabolisme de la histidine	1	1	1	0	0
Métabolisme de la phénylalanine	3	2	1	1	2
Métabolisme de la cystéine et de la méthionine	2	2	1	1	1
Métabolisme de la tyrosine	2	4	1	1	2
Biosynthèse de la phénylalanine, de la tyrosine et du tryptophane	1	3	1	1	1
Métabolisme des acides cyanoaminés	1	2	1	0	1
Métabolisme de la β -alanine	4	1	1	0	0

Métabolisme du glutathion	2	0	0	1	1
Métabolisme des composées à base de sélénium	1	0	0	0	0
Biosynthèse de la vitamine B5 et CoA	2	6	2	1	0
Métabolisme de la vitamine B9	1	3	1	0	1
Métabolisme de la vitamine B2	1	0	0	1	1
Métabolisme de la porphyrine et la chlorophylle	1	0	0	0	1
Métabolisme de la vitamine B3 et de la nicotinamide	1	0	0	0	0
Métabolisme de terpénoïdes	3	1	0	0	1
Apoptose/homéostasie/détoxication	2	0	0	1	0
Processus biologique inconnu	3	1	0	N/A	N/A

Légende : N/A : non applicable