



Organisation et structure des génomes mitochondriaux des algues brunes *Pylaiella littoralis* et *Laminaria* *digitata*

Marie-Pierre Oudot-Le Secq

► To cite this version:

Marie-Pierre Oudot-Le Secq. Organisation et structure des génomes mitochondriaux des algues brunes *Pylaiella littoralis* et *Laminaria digitata*. Génomique, Transcriptomique et Protéomique [q-bio.GN]. Rennes 1, 2000. Français. NNT: . tel-01117839

HAL Id: tel-01117839

<https://hal.sorbonne-universite.fr/tel-01117839>

Submitted on 18 Feb 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Avertissement

Au vu de la législation sur les droits d'auteur, ce travail de thèse demeure la propriété de son auteur, et toute reproduction de cette oeuvre doit faire l'objet d'une autorisation de l'auteur. (cf Loi n°92-597; 1/07/1992. Journal Officiel, 2/07/1992)

N° Ordre : de la thèse	2365
---------------------------	------

THÈSE

présentée

DEVANT L'UNIVERSITE DE RENNES 1

pour obtenir

le grade de : *DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE RENNES 1*

Mention : Biologie

PAR

Marie-Pierre OUDOT-LE SECQ

Equipe d'accueil : UMR 1931 CNRS-Goëmar, Station Biologique de Roscoff

Ecole Doctorale : Vie-Santé

Organisation et structure des génomes mitochondriaux
des algues brunes *Pylaiella littoralis* et *Laminaria digitata*

SOUTENUE LE 3 NOVEMBRE 2000 devant la commission d'Examen

Composition du jury :

M. Roland DOUCE	Rapporteur
M. Francis GALIBERT	Président
M. Jean-Michel GRIENENBERGER	Rapporteur
M. Bernard KLOAREG	Examineur
Mme Susan LOISEAUX-DE GÖER	Directrice de thèse
M. Michel PHILIPPE	Examineur

Remerciements

Je tiens à remercier Bernard Kloareg pour m'avoir permis de faire mon stage de DEA d'abord, puis ma thèse, dans son équipe. Grâce à lui, la Bretagne à une nouvelle adepte !

Merci également aux membres du jury d'avoir accepté d'en faire partie.

Un grand merci aux "services communs" de la station que sont le service informatique [que deviendrions-nous sans Claude et Olivier ? !], le service de documentation, le restaurant [si je ne viens pas souvent, ce n'est pas que je n'aime pas, Christian, *au contraire* !].

Merci à Martine, à la laverie, aux porteurs de salopettes rouges et blanches des ateliers, aux pêcheurs, aux personnels administratifs, Nicole, Barbara et les autres.

Un grand merci général aux chercheurs et techniciens de la station, qu'ils soient en poste ou en formation !

Merci à ceux qui m'ont aidé à m'initier à l'algologie, Gwen d'abord (si, si !), puis Marie-Claude, Nathalie et Jacqueline.

Merci à tous les copains et les amis que j'ai pu rencontrer grâce à la station, en particulier à ma correctrice attitrée !

Un merci plus particulier à Susan : si je n'osais pas trop entrer dans ton bureau pendant le DEA, cela a bien changé par la suite ! Merci beaucoup pour tous les moments partagés, les discussions, scientifiques ou non ! Merci de m'avoir inoculé le virus de ces endosymbioses !

Je remercie également ma famille, qui m'a toujours soutenue à sa manière, pendant toutes ces années qui m'ont permis "d'en arriver là" ! Un grand merci aussi à mon mari, que j'ai rencontré ici et qui a surtout eu droit aux mauvais moments de cette thèse ! Je vous dédie ce mémoire.

Pour finir, merci aux innombrables *Pylaiella littoralis*, *Laminaria digitata*, étrilles, crevettes, palourdes et autres huîtres sacrifiées à titres divers !

Résumé

Deux études de génomes mitochondriaux d'algues brunes sont présentées. La 1^{ère} concerne celui d'une algue présumée primitive *Pylaiella littoralis*. La 2^{nde} est le début de la comparaison avec celui de *Laminaria digitata*, considérée comme évoluée. Le contexte de ces études est décrit : la 1^{ère} partie traite des endosymbioses ayant conduit aux mitochondries et aux plastides ; une autre concerne la définition des algues brunes et la 3^e traite des mitochondries et de leur génome.

L'ADN mitochondrial (ADNmt) de *P. littoralis* et de *L. digitata* consiste en molécules circulaires de 58507 pb et de 36k pb, respectivement. Celui de *P. littoralis* contient à la fois des promoteurs de type eubactérien et un gène d'ARN polymérase de type phagique. Ce génome code plusieurs gènes de protéines ribosomiques, dont *rpl31*, identifié avant uniquement dans l'ADNmt d'un protiste primitif, *Reclinomonas americana*. Il code aussi des introns des groupes IIA et IIB, avec des ORFs multidomaines complets. Le gène *nad11* ne comporte que le 1^{er} tiers du gène habituel, soit celui des domaines de liaison aux groupements FeS, dont l'importance a été montrée pour l'activité de l'enzyme. L'autre partie n'est pas codée dans l'ADNmt et n'a pas été détectée dans l'ADN nucléaire. Le gène *cox2*, lui, comporte une insertion de 1006 aa alors qu'il n'en code lui-même que 280.

L'ADNmt de *P. littoralis* a conservé plus de caractères primitifs que ceux des autres eucaryotes tout en ayant plus évolué que celui de *R. americana*.

Les 60 % du génome mitochondrial de *L. digitata* qui sont séquencés ressemblent étonnamment à celui de *P. littoralis*. L'ordre des gènes est presque identique et leurs séquences ont de très fortes homologues. Les principales différences sont l'absence des introns et de la plupart des ORFs.

Nous avons aussi fait plusieurs comparaisons ponctuelles avec d'autres algues brunes qui pourraient être un outil utile dans l'étude des relations phylogénétiques de la lignée des algues brunes, encore peu connue.

Abstract

The mitochondrial genomes of two brown algae have been studied. The 1st is that of *Pylaiella littoralis*, which is thought to be a primitive alga, the 2nd is that of *Laminaria digitata*, which is expected to be an evolved alga, with the aim to compare their genomes. The 1st chapter describes the background of the work: the endosymbiotic events that have given rise to mitochondria and plastids; an insight of what are brown algae and of what we know about mitochondria and their genome.

The mitochondrial genomes of *P. littoralis* and *L. digitata* are circular DNA molecules of 58.507 bp and about 36 kbp respectively. That of *P. littoralis* contains proteobacterial promoter regions and a T7-like RNA polymerase gene, at the same time. This genome also codes for quite a few ribosomal protein genes. One of them, *rpl31*, was only described in the mitochondrial DNA (mtDNA) of the primitive protist *Reclinomonas americana* before. It also codes for group IIA and IIB introns with multidomain encoded ORFs. The *nad11* gene encodes only the 1st domain of the usual protein with the FeS-binding sequences important for the enzyme activity. The other part of the gene is not encoded in the mtDNA of *P. littoralis*, nor detected in the nuclear DNA. The *cox2* gene exhibits an unusual in-frame insertion of 1006 amino acids within the gene, which is 280 aa long only.

P. littoralis mtDNA has conserved more primitive features than those of other eukaryotes, but has evolved beyond the stage represented by that of the protist *R. americana*.

The sequenced part of the mitochondrial genome of *L. digitata* (60 %) is surprisingly similar to that of *P. littoralis*. Gene order is nearly exactly the same, and gene sequences show very high homology. The main differences are the lack of introns and of the majority of ORFs.

We have also made a few limited comparisons using other brown algae, which could produce good tools for phylogenetic studies of the brown algae lineage, still mainly unraveled.

Organisation et structure des génomes

mitochondriaux des algues brunes

Pylaiella littoralis et *Laminaria digitata*

Tables

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	1
CHAPITRE I. D'ENDOSYMBIOSES EN ENDOSYMBIOSES	3
1. LA THEORIE ENDOSYMBIOTIQUE.....	3
1.1. Genèse d'une théorie	3
1.1.1. Les prémisses : "les symbiotes".....	3
1.1.2. La renaissance : la théorie des symbioses en série	5
1.1.3. État actuel de l'art	5
1.2. Les endosymbioses primaires	6
1.2.1. L'origine des mitochondries	6
1.2.2. L'origine des plastes verts et rouges.....	8
1.3. Les endosymbioses secondaires	9
1.4. Les endosymbioses tertiaires	9
1.5. Le temps de l'établissement des endosymbioses	12
1.5.1. Des exemples de cas intermédiaires = processus lent ?	12
1.5.2. Un exemple d'endosymbiose obligatoire établie rapidement	12
2. LES ALGUES BRUNES.....	13
2.1. De la définition des algues	13
2.2. Place phylogénétique des algues brunes	14
2.3. Caractéristiques des algues brunes.....	14
2.3.1. Morphologie.....	14
2.3.2. Physiologie	23
2.3.3. Choix des modèles utilisés	23
3. LES MITOCHONDRIES.....	24
3.1. Caractéristiques des mitochondries	25
3.1.1. Généralités	25
3.1.2. L'enveloppe mitochondriale	25
3.1.3. La matrice	26
3.1.4. Les complexes enzymatiques des mitochondries.....	27
3.1.4.1. Complexe I : NADH : ubiquinone oxydoréductase ou NADH déshydrogénase	28
3.1.4.2. Complexe II : Succinate : ubiquinone réductase ou succinate déshydrogénase.....	29
3.1.4.3. Complexe III : Cytochrome bc1	29
3.1.4.4. Complexe IV : Cytochrome oxydase.....	29
3.1.4.5. Complexe V : ATP synthase.....	29
3.2. Les génomes mitochondriaux	30
3.2.1. Quelques caractéristiques de génomes de protéobactéries.....	30
3.2.2. Caractéristiques générales des génomes mitochondriaux	30
3.2.2.1. Les génomes mitochondriaux des animaux	31
3.2.2.2. Les génomes mitochondriaux des plantes supérieures	31
3.2.2.3. Les génomes mitochondriaux des champignons	32
3.2.2.4. Autres génomes mitochondriaux.....	32
3.3. La transcription et les ARN polymérases	35
4. OBJECTIF DE LA THESE.....	35
5. PUBLICATIONS.....	36

CHAPITRE II. MATERIELS ET METHODES	37
1. MATERIELS.....	37
1.1. <i>Pylaiella littoralis</i> de Roscoff	37
1.2. <i>Laminaria digitata</i>	38
1.3. <i>Pylaiella littoralis</i> d'Helgoland	39
1.4. <i>Sphacelaria</i> sp.....	39
1.5. <i>Fucus serratus</i>	39
1.6. La banque d'ADN génomique organitique	39
2. METHODES EXPERIMENTALES.....	39
2.1. Précisions préliminaires	39
2.1.1. Polysaccharides et composés phénoliques	39
2.1.2. Isolement des organites	40
2.2. Les cultures d'algues	43
2.2.1. Maintien et suivi des cultures.....	43
2.2.2. Cultures pour extractions.....	43
2.3. Isolement des organites	44
2.4. Extraction des acides nucléiques des algues brunes	44
2.4.1. ARNs	45
2.4.2. ADN	45
2.5. Extraction de l'ADN plasmidique des bactéries	47
2.6. Méthodes d'études de l'ADN	48
2.6.1. Clonage.....	48
2.6.2. PCR.....	48
2.6.3. Séquençage	48
2.6.4. Clonage par PCR inverse.....	49
2.6.5. Hybridation sur ADNs transférés sur membrane (<i>Southern blot</i>)	49
2.7. Méthodes d'études des ARNs	49
2.7.1. Hybridation sur ARNs transférés sur membrane (<i>northern blot</i>).....	49
2.7.2. Amplification d'ADNc (RT-PCR).....	50
2.8. Méthodes d'études des protéines	50
2.8.1. Extraction des protéines	50
2.8.2. Migration et transfert des protéines sur membrane.....	50
2.8.3. Immunodétection	50
2.8.3.1. Contrôles positifs	51
2.8.3.2. Contrôles négatifs.....	51
3. TRAITEMENT DES SEQUENCES	51
CHAPITRE III. RESULTATS COMMENTES	53
1. LE GENOME MITOCHONDRIAL DE <i>PYLAIELLA LITTORALIS</i>	53
1.1. Présentation générale	53
1.2. Contenu du génome mitochondrial	59
1.2.1. Les gènes d'ARNs ribosomiques.....	59
1.2.2. Les gènes d'ARN de transfert.....	63
1.2.3. Les gènes codant des protéines	66
1.2.3.1. Les gènes de protéines ribosomiques	66
1.2.3.2. Les gènes des autres protéines mitochondriales	68
1.2.3.3. Les gènes de protéines inconnues	74
1.2.4. Les introns et leurs ORFs.....	74

1.2.5. Motifs particuliers	77
1.2.5.1. Les régions promotrices.....	78
1.2.5.2. Origine de réplication	79
1.2.6. Organisation des gènes entre eux	79
1.2.6.1. Chevauchements de gènes	79
1.2.6.2. Les espaces intergéniques.....	80
1.3. La région comprenant une ARN polymérase de type phagique.....	81
1.3.1. Le jeu de répétitions	81
1.3.2. L'ARN polymérase	82
1.3.3. Les gènes de protéines inconnues.....	85
1.3.4. Les espaces intergéniques	85
1.4. Analyse comparative des différentes régions	86
1.4.1. Pourcentage en bases (A+T).....	86
1.4.2. Usage des codons et biais de la troisième position	88
1.5. Les résultats négatifs	90
1.5.1. Des amplifications	90
1.5.1.1. Second domaine du gène <i>nad11</i>	90
1.5.1.2. ARN polymérase de type phagique.....	90
1.5.1.3. ARN polymérase de type bactérien	91
1.5.2. Détection de la protéine COX2.....	92
1.6. Conclusion sur le génome mitochondrial de <i>P. littoralis</i>	92
2. LE GENOME MITOCHONDRIAL DE <i>LAMINARIA DIGITATA</i>	95
2.1. Présentation générale de l'objectif.....	95
2.2. Caractérisation du génome mitochondrial de <i>L. digitata</i>	95
2.3. Ressemblances entre les génomes mitochondriaux de <i>L. digitata</i> et de <i>P. littoralis</i>	100
2.3.1. Le <i>nad11</i>	101
2.3.2. Le <i>cox2</i>	102
2.3.3. L'ORF127.....	103
2.3.4. Les régions promotrices.....	103
2.3.5. Les ARNt.....	104
2.3.6. Les entre-gènes	104
2.4. Différences entre les génomes mitochondriaux de <i>L. digitata</i> et de <i>P. littoralis</i>	105
2.4.1. Autour du gène de l'ARN polymérase	105
2.4.1.1. Modifications en amont du site d'insertion dans <i>P. littoralis</i>	105
2.4.1.2. Traces d'un gène codant une ARN polymérase	105
2.4.2. Les introns	107
2.4.2.1. Gène de l'ARNr 23S.....	107
2.4.2.2. Gène <i>cox1</i>	109
2.4.3. Les ORFs mitochondriaux 224 et 97-237-261	109
2.4.4. Trois différences au niveau d'ARNt	109
2.5. Conclusion sur le génome mitochondrial de <i>L. digitata</i>	110
3. COMPARAISONS ENTRE DIFFERENTES ESPECES D'ALGUES BRUNES.....	111
3.1. Le <i>nad11</i>	111
3.2. Le <i>cox2</i>	112
3.3. Le 16S.....	114
3.4. Le 23S.....	116
3.5. Conclusion sur les comparaisons entre différentes espèces d'algues brunes	118
CONCLUSION GENERALE	119
BIBLIOGRAPHIE	121

<u>Annexe 1</u>	Milieux de culture des algues	133
<u>Annexe 2</u>	Milieux de culture de bactéries	134
<u>Annexe 3</u>	Caractéristiques des souches bactériennes utilisées	135
<u>Annexe 4</u>	Extraction d'organites de <i>Pylaiella littoralis</i>	136
<u>Annexe 5</u>	Mini-extraction D'ADN plasmidique,	137
<u>Annexe 6</u>	Extraction des protéines à partir des culots d'organites de <i>P. littoralis</i>	138
<u>Annexe 7</u>	Gel SDS-PAGE et transfert sur membrane.....	139
<u>Annexe 8</u>	Conditions d'immunodétection testées	140
<u>Annexe 9</u>	Article 1. Witnessing the evolution of transcription in mitochondria: the mitochondrial genome of the primitive brown alga <i>Pylaiella littoralis</i> (L.) Kjellm. encodes a T7-like RNA polymerase. Rousvoal, S., <u>Oudot, M.-P.</u> , Fontaine, J.-M., Kloareg, B. & Loiseaux-de Goër, S. (1998). J Mol Biol, 277, 1047-1057.	
<u>Annexe 10</u>	Article 2. The mitochondrial <i>Pylaiella littoralis nad11</i> gene contains only the N-terminal FeS-binding domain. <u>Oudot, M.-P.</u> , Kloareg, B. & Loiseaux-de Goër, S. (1999). Gene, 235, 131-137.	
<u>Annexe 11</u>	Article 3. The first completely sequenced brown algal mitochondrial genome, from the Ectocarpale <i>Pylaiella littoralis</i> (L.) Kjellm. <u>Oudot, M.-P.</u> , Fontaine, J.-M., Rousvoal, S., Kloareg, B. & Loiseaux-de Goër, S. (soumis).	

TABLE DES FIGURES

Figure 1	Origine des mitochondries et des plastes par endosymbiose primaire	7
Figure 2	Arbre phylogénétique montrant l'origine α -protéobactérienne des mitochondries	8
Figure 3	Origine des plastes par endosymbiose secondaire	10
Figure 4	Les différentes lignées d'algues, en fonction de l'origine de leurs plastes	11
Figure 5	Les hétérocontophytes : variété et point commun	15
Figure 6	Arbre phylogénétique des hétérocontes basé sur les similitudes de structures des gènes d'ARN de la petite sous-unité ribosomique ($\rightarrow$)	16
Figure 7	Arbre phylogénétique des algues brunes	18
Figure 8	Exemples d'algues brunes	19
Figure 9	Le complexe nucléoplastidial des algues brunes	20
Figure 10	Micrographies de pyrénoides	21
Figure 11	Les cycles de vie de <i>Pylaiella littoralis</i> et de <i>Laminaria digitata</i> ($\rightarrow$)	21
Figure 12	Micrographies de mitochondries	26
Figure 13	Micrographies de fibres d'ADN ($\rightarrow$)	26
Figure 14	Photographies de <i>Pylaiella littoralis</i> à plusieurs échelles	38
Figure 15	Cultures de <i>Pylaiella littoralis</i>	42
Figure 16	Gradients isopycniques de chlorure de césium observés sous UV	47
Figure 17	Carte génique et de restriction du génome mitochondrial de <i>Pylaiella littoralis</i> au début du travail présenté	54
Figure 18	Carte génique et de restriction du génome mitochondrial de <i>Pylaiella littoralis</i>	58
Figure 19	Alignement de séquences mitochondriales (M) et protéobactériennes (α / γ) d'ARNr 5S	60
Figure 20	Structure secondaire potentielle de l'ARNr 5S de <i>Pylaiella littoralis</i>	61
Figure 21	Comparaison de structures secondaires potentielles d'ARNr 5S ($\rightarrow$)	61
Figure 22	Séquences nucléotidiques des 34 gènes d'ARNt du génome mitochondrial de <i>P. littoralis</i>	63
Figure 23	Usage des codons des gènes codants des protéines de la partie mitochondriale et de la région du gène de l'ARN polymérase	64
Figure 24	Alignements de séquences de <i>trnI</i> (GAU), <i>trnI</i> (CAU) et de <i>trnM</i> d'élongation (CAU)	65
Figure 25	Comparaison entre des opérons bactériens de protéines ribosomiques et des groupes des gènes mitochondriaux et plastidiaux correspondants	67
Figure 26	Alignement de la séquence d'acides aminés déduits du gène <i>nad11</i> de <i>P. littoralis</i> avec celles du premier domaine d'autres gènes et de séquences de <i>hoxU</i> d'eubactéries	69
Figure 27	Représentation schématique de l'organisation des gènes relatifs aux gènes <i>nad11</i> mitochondriaux	70
Figure 28	Analyse du transcrit du gène mitochondrial <i>nad11</i> de <i>P. littoralis</i> par amplification d'ADNc (RT-PCR)	71
Figure 29	Alignement de séquences d'ATP8 de différents organismes	72
Figure 30	Hybridations de sondes d'ADN spécifiques au gène <i>cox2</i> de <i>P. littoralis</i> sur ARNs totaux	73
Figure 31	Structure tertiaire du second intron de l'ADNr 23S de <i>P. littoralis</i>	75
Figure 32	Arbre non raciné de valeurs de divergence entre des séquences d'acides aminés d'ORF d'introns de groupe II ($\rightarrow$)	75
Figure 33	Promoteurs de <i>P. littoralis</i>	78
Figure 34	Comparaisons de promoteurs de <i>P. littoralis</i> et d'autres organismes	79
Figure 35	Représentation schématique des répétitions de la région de l'ARN polymérase	82
Figure 36	Alignement des séquences d'acides aminés déduits de l'ARN polymérase de type phagique de <i>P. littoralis</i> avec des gènes homologues d'autres organismes	83
Figure 37	Arbre phylogénétique non raciné construit à partir d'un alignement de régions conservées de séquences d'acides aminés d'ARN polymérases de type phagique	84
Figure 38	Scénario possible de l'évolution de la transcription dans les mitochondries	85
Figure 39	Carte génique du génome mitochondrial de <i>Laminaria digitata</i>	96
Figure 40	Cartes géniques comparatives circulaires des génomes mitochondriaux de <i>Laminaria</i> <i>digitata</i> et de <i>Pylaiella littoralis</i>	97

Figure 41	Alignement des séquences des gènes <i>nad11</i> de <i>L. digitata</i> et <i>P. littoralis</i> et de leur séquence traduite	102
Figure 42	Alignement des séquences traduites des gènes <i>cox2</i> de <i>L. digitata</i> et <i>P. littoralis</i>	103
Figure 43	Alignement des séquences traduites des ORFs127 de <i>L. digitata</i> et de <i>P. littoralis</i>	103
Figure 44	Comparaisons des séquences promotrices putatives des génomes mitochondriaux de <i>Laminaria digitata</i> et de <i>Pylaiella littoralis</i>	104
Figure 45	Comparaison de la région du génome mitochondrial de <i>L. digitata</i> homologue à celle de <i>P. littoralis</i> comprenant le gène de l'ARN polymérase	106
Figure 46	Comparaison de la région du génome mitochondrial de <i>L. digitata</i> comprenant un gène <i>rpo</i> potentielle avec son homologue chez <i>P. littoralis</i>	106
Figure 47	Comparaison de la séquence du gène de l'ARN polymérase du génome mitochondrial de <i>P. littoralis</i> avec son homologue potentiel chez <i>L. digitata</i>	107
Figure 48	Comparaison du gène de l'ARNr 23S des génomes mitochondriaux de <i>L. digitata</i> et <i>P. littoralis</i>	108
Figure 49	Comparaison de la région du gène <i>cox1</i> des génomes mitochondriaux de <i>L. digitata</i> et <i>P. littoralis</i>	108
Figure 50	Alignement des séquences du <i>trnL3</i> de <i>L. digitata</i> et de la région homologue de <i>P. littoralis</i> ..	109
Figure 51	Alignement de la portion de séquences de gènes <i>nad11</i> amplifiée	112
Figure 52	Alignement de la portion de séquences de gènes <i>cox2</i> amplifiée	113
Figure 53	Alignement d'une portion de séquences de gènes d'ARNr 16S de plastes, mitochondries et bactéries	115
Figure 54	Alignement d'une portion de séquences de gènes d'ARNr 23S de cinq algues brunes (autour de l'intron 2 de <i>P. littoralis</i>)	117
Figure 55	Alignements d'une portion de séquences de gènes d'ARNr 23S de trois algues brunes (autour de l'intron 4 de <i>P. littoralis</i>)	117

TABLE DES TABLEAUX

Tableau I	Les sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire et de l'ATP synthase, et leur masse moléculaire	28
Tableau II	Contenu en gènes de différents génomes mitochondriaux	33
Tableau III	Comparaison des différents kits de séquençage utilisés	49
Tableau IV	Les gènes identifiés dans le génome mitochondrial de <i>P. littoralis</i>	55
Tableau V	Tableau analytique de l'ensemble de la molécule (→)	56
Tableau VI	Exemples de déviations de positions conservées similaires à <i>P. littoralis</i> , dans d'autres ARNt	63
Tableau VII	Exemples de déviations de positions conservées similaires à <i>P. littoralis</i> , dans le même ARNt	64
Tableau VIII	Pourcentages en (A+T) par régions du génome mitochondrial de <i>P. littoralis</i>	87
Tableau IX	Distribution des nucléotides TCAG en 3 ^e position dans les codons des gènes et ORFs codés par l'ADN mitochondrial de <i>P. littoralis</i> et les codons stop	89
Tableau X	Espèces testées pour l'amplification d'une partie d'un gène d'ARN polymérase phagique dans Cermakian <i>et al.</i> , 1996.....	91
Tableau XI	Tableau analytique et prévisionnel de l'ensemble de la molécule d'ADN mitochondrial de <i>Laminaria digitata</i> par comparaison avec celui de <i>P. littoralis</i>	98
Tableau XII	Comparaison entre les séquences complètes des gènes mitochondriaux de <i>L. digitata</i> avec celles des protéines homologues de <i>P. littoralis</i>	100
Tableau XIII	Pourcentages d'identité entre les séquences des gènes d'ARNt des génomes mitochondriaux de <i>L. digitata</i> et de <i>P. littoralis</i>	104

Introduction

Introduction

Les travaux qui sont rapportés dans cette thèse s'inscrivent dans le cadre général de l'étude des endosymbioses. Afin de bien appréhender l'ensemble des problématiques, je vais exposer dans un premier chapitre les différents aspects théoriques concernés. Il s'agit en premier lieu de la théorie endosymbiotique, qui explique l'origine des mitochondries et celle des plastes. Puis, je présenterai les modèles sur lesquels se sont portés mes travaux, des algues brunes, en les replaçant dans le monde du vivant. J'exposerai enfin brièvement l'état des connaissances sur les mitochondries elles-mêmes et plus particulièrement sur leur génome.

Le chapitre "matériels et méthodes" qui suit est assez hétérogène, en cela qu'il présente des protocoles détaillés pour certaines techniques, alors que d'autres, plus classiques, ne le sont pas.

Trois parties composeront le chapitre des "résultats", afin de traiter tout d'abord du cas du génome mitochondrial de *Pylaiella littoralis*, dont la séquence est maintenant connue dans son entier, puis de celui de *Laminaria digitata*, dont 60 % sont séquencés. La troisième partie exposera quelques comparaisons réalisées avec plusieurs autres algues brunes.

Enfin, dans la conclusion, je discuterai l'ensemble de ces résultats aussi bien à un niveau théorique qu'au niveau des perspectives qu'ils permettent.

Chapitre I

D'endosymbioses en endosymbioses

Chapitre I. D'endosymbioses en endosymbioses

Telles des poupées gigognes, les organismes vivants sont vraisemblablement le résultat d'endosymbioses successives.

1. La théorie endosymbiotique

La théorie endosymbiotique explique l'origine des organites par une symbiose intracellulaire devenue obligatoire, que l'on pourrait qualifier "d'intégrative".

1.1. Genèse d'une théorie

Je ne parlerai ici que des endosymbioses qui sont en rapport direct avec mon sujet de thèse, c'est à dire celles ayant conduit aux organites que sont les mitochondries et les plastes. Elles sont admises maintenant par la majorité de la communauté scientifique. Je fais donc volontairement abstraction de celles qui suscitent encore des polémiques et qui ont pour objet l'origine des eucaryotes ou celle des flagelles (voir par exemple Brown & Doolittle, 1997 ; Gupta, 1999 ; Lake & Rivera, 1994 ; Lopez-Garcia & Moreira, 1999 ; Mahler, 1981 ; Margulis *et al.*, 1979 ; Margulis *et al.*, 2000 ; Vellai & Vida, 1999).

1.1.1. Les prémisses : "les symbiotes"

Comme c'est bien souvent le cas pour les découvertes importantes, d'un faisceau d'observations, de dénominations et d'explications différentes, surgit finalement une idée qui s'impose et qui sera confirmée par la suite. Avec les méthodes de microscopie dont ils disposaient à l'époque, des chercheurs de la seconde moitié du XIX^e siècle ont fait les premières observations qui aboutirent à la théorie endosymbiotique et à la théorie des endosymbioses en série. Les plastes, naturellement colorés, furent découverts avant les mitochondries. Les premiers rapprochements entre organites et bactéries ont ainsi eu lieu entre les plastes et les cyanobactéries.

Lors d'observations microscopiques, un botaniste suisse (Carl Wilhelm von Nägeli, 1846) et des allemands (Leopold Kny, 1871 ; Friedrich Schmitz, 1883 et Andreas Franz Wilhelm Schimper, 1883 et 1885) suivent des divisions de "gouttelettes à pigment vert", les plastes. Il fut également établi que les plastes n'apparaissaient pas *de novo*, bien que ce soit le cas de la chlorophylle. En 1905, un botaniste russe, Mereschkowsky (*cf* version anglaise de Martin & Kowallik, 1999), cite tous ces travaux et établit "les bases pour [son] interprétation des [plastes] comme symbiontes". Il compare, point par point, ce qui est

connu des plastes avec ce qui est connu des cyanobactéries, montrant l'évidence de leur filiation.

La découverte des mitochondries est beaucoup plus diffuse. Plusieurs méthodes permettent de colorer les mitochondries, mais, dans *Les symbiotes* (1918), Portier note qu'aucune d'elles ne le fait dans tous les cas. De nombreuses observations indépendantes de "granules du cytoplasme" sont rapportées et suscitent de vives polémiques entre leurs différents défenseurs (pour exemple, l'échange entre Delage et Wiesner dans le premier volume de l'Année Biologique, en 1895). En 1897, Benda mit au point une "technique très compliquée qui permet de différencier ces formations d'une manière précise, dans le protoplasma des cellules animales et végétales" (Portier, 1918, pages 58-59). C'est lui qui invente le nom de "mitochondrie", à partir du grec mitos=filament (μῖτος) et chondrion=grain (χονδριον). La division des mitochondries a également été observée et rapprochée de celle des bactéries.

Les débuts des mitochondries sont émaillés de descriptions et d'hypothèses des plus saugrenues, à la lumière de nos connaissances actuelles. Par contre, d'autres se sont avérées.

Portier cite Trécul, qui représentait dès 1858, les mitochondries "dans un grand nombre de cellules végétales ; il leur donne le nom de vésicules ; mais il ne semble pas avoir nettement compris leur rôle". Portier rapporte plus loin plusieurs rôles physiologiques supposés : rôle moteur pour Benda, support de caractères héréditaires pour Meves (1908), support et lieu de formation des oxydations, pour Fauré-Frémiet *et al.* (1909). Il adhère plutôt lui-même à ce qu'ont établi Altmann, Regaud et surtout Guillermond : "ces organites sont des *appareils d'élaboration*". Pour eux, les mitochondries sont à l'origine des plastes. Elles synthétisent amidon et graisses. Quant à la nature et à l'origine des mitochondries, une des premières hypothèses émises les faisaient dériver du noyau (Goldschmidt, cité dans Portier, 1918). Dès 1898, Prenant (cité dans Portier, 1918) voyait les mitochondries comme une chromatine cytoplasmique. En effet, grâce à des colorations de ce que l'on ne connaissait pas encore sous le nom d'acides nucléiques, et qui mettaient en évidence la chromatine des noyaux, ces granules cellulaires étaient observés.

La querelle s'enlisa, faute d'éléments nouveaux, autres que théoriques, jusqu'après la seconde guerre mondiale.

1.1.2. La renaissance : la théorie des symbioses en série

Selon Sapp, 1990, dans son article *Symbiosis in evolution: an origin story*, les avancées décisives furent d'abord la distinction procaryote / eucaryote, puis la mise en évidence que mitochondries et plastes possédaient leur propre ADN, ainsi que les enzymes nécessaires pour la transcription et les synthèses protéiques.

Ces avancées furent permises par le développement de certaines techniques, telles que :

- la microscopie électronique : visualisation des membranes, de l'ADN, et des ribosomes
- la biochimie : caractérisation des membranes, des ribosomes
- la biologie moléculaire : caractérisation de l'ADN par dénaturation / hybridation
- la génétique : hérédité cytoplasmique

Ainsi, le renouveau des théories symbiotiques eut lieu dans les années 1960.

En 1967, Lynn Margulis (alors Sagan) publia une première théorie générale détaillée *On the origin of mitosing cells*, puis *Origin of eukaryotic cells* en 1970. Il s'agit de la théorie des endosymbioses en série (SET : *Serial Endosymbiosis Theory*), qu'elle appuie sur les nouvelles découvertes que je viens d'évoquer, pour expliquer non seulement l'origine des mitochondries et des plastes, mais aussi comme l'indique les titres, celle des eucaryotes.

1.1.3. État actuel de l'art

Si depuis les années 1960, des théories de filiation directe s'opposent à celles des symbioses, je pense que l'on peut considérer qu'aujourd'hui l'origine symbiotique "globale" des mitochondries et des plastes ne fait plus de doute, même s'il subsiste des points de frictions en ce qui concerne le nombre d'événements symbiotiques, ainsi que les hôtes impliqués. En effet, l'origine de la première cellule eucaryote est loin de faire l'unanimité (Andersson *et al.*, 1998 ; Brown & Doolittle, 1997 ; Gupta, 1999 ; Lake & Rivera, 1994 ; Liaud *et al.*, 2000 ; Lopez-Garcia & Moreira, 1999 ; Martin & Schnarrenberger, 1997 ; Smith, 1999 ; Vellai *et al.*, 1998). La définition même de la cellule eucaryote (littéralement "noyau vrai") est parfois remise en cause, en cela que pour certains l'acquisition des mitochondries fait partie intégrante de l'établissement des eucaryotes (Vellai *et al.*, 1998).

Dans un but de simplification, je considérerai pour ma part, pour la suite, que le premier hôte impliqué dans l'origine des mitochondries était un eucaryote.

Après ce détour historique, je vais définir plus précisément les endosymbioses qui nous intéressent ici, celles qui sont à l'origine des mitochondries et des plastes.

1.2. Les endosymbioses primaires

Une endosymbiose est qualifiée de primaire quand le symbionte est une bactérie. C'est le cas des mitochondries ainsi que de certains plastes (Figure 1, page 7).

La phagocytose est un phénomène par lequel certaines cellules eucaryotes englobent des particules dans un but nutritif. C'est vraisemblablement ainsi que la bactérie à l'origine des mitochondries s'est trouvée dans une vacuole d'endocytose au sein du cytoplasme d'un eucaryote. Il n'y a pas eu digestion de la bactérie mais mise à profit de ses potentialités que l'eucaryote n'avait pas (Schnepf, 1992).

Le processus de transformation de la bactérie autonome en un organite consiste en des phénomènes morphologiques et physiologiques conduisant à l'interdépendance des deux acteurs. La perte de la paroi bactérienne peut être expliquée par la nouvelle niche écologique occupée, aux conditions homogènes. Les deux membranes entourant l'organite sont très probablement celle de la vacuole de phagocytose de l'hôte, pour la plus externe et celle dérivant du plasmalemma de la bactérie, pour la plus interne. Un équilibre s'établit alors entre les deux organismes qui viennent à en former un seul, chimérique. Les divisions de l'organite sont nécessaires, en nombre suffisant pour fournir l'hôte en énergie, mais trop nombreuses elles pourraient lui devenir fatales. Un contrôle de l'organite est donc mis en place très tôt, certaines protéines de l'hôte vont se substituer à celles de la bactérie d'origine, les gènes du génome bactérien correspondant sont perdus, d'autres sont transférés dans le noyau. Les ribosomes persistent dans la matrice, servant toujours à la transcription du génome réduit de l'organite. Des mécanismes sont également mis en place pour assurer sa transmission aux descendants (Taylor, 1979 ; Whatley *et al.*, 1979).

1.2.1. L'origine des mitochondries

L'événement endosymbiotique à l'origine des mitochondries a certainement impliqué une bactérie proche des α -protéobactéries actuelles. Toutes les phylogénies moléculaires montrent en effet que les séquences mitochondriales sont plus proches de celles des α -protéobactéries actuelles que des autres bactéries, et en particulier du groupe comprenant les *Rickettsias* et les *Ehrlichias* (Figure 2, page 8). Il est intéressant de constater que parmi elles, beaucoup sont soit des parasites, soit des symbiotes intracellulaires, dont les génomes sont souvent réduits par rapport à ceux des bactéries libres (Andersson & Kurland, 1999).

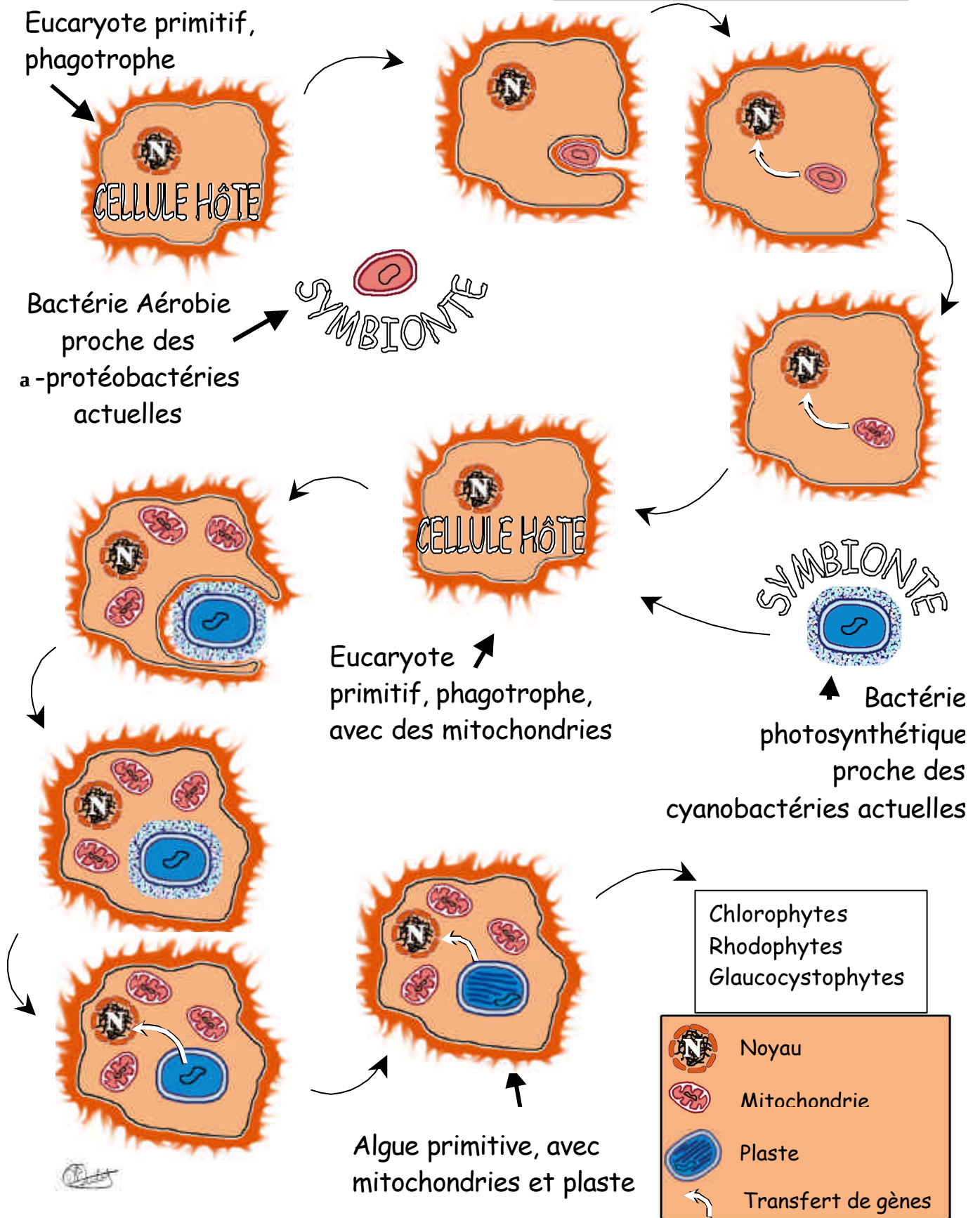


Figure 1 Origine des mitochondries et des plastes par endosymbiose primaire

(Figure extraite de l'article : Origin and evolution of plastids and mitochondria: the phylogenetic diversity of algae. Boyen, C., Oudot, M.-P., & Loiseaux-de Goër, S. (2001). Cahiers de Biologie Marine.)

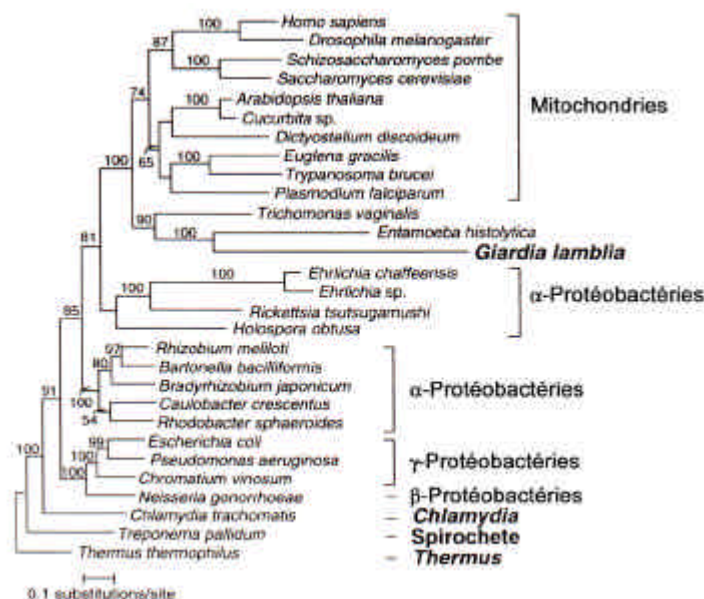


Figure 2 Arbre phylogénétique montrant l'origine α -protéobactérienne des mitochondries

Relations phylogénétiques de séquences d'homologues de *cpn60*. L'arbre a été obtenu par analyse du maximum de probabilité (*maximum likelihood*, ML) d'un alignement de 513 positions d'acides aminés. Les valeurs de *bootstrap* supérieures à 50 % sont indiquées au-dessus de chaque branche (Figure reproduite de Roger *et al.*, 1998).

Dans Whatley *et al.*, 1979, les auteurs proposaient déjà une α -protéobactérie, *Paracoccus*, comme ancêtre plausible des mitochondries. Ils le justifiaient en montrant que certains complexes enzymatiques caractéristiques des mitochondries sont également présents dans *Paracoccus* alors qu'ils sont absents des autres bactéries.

Malgré de grandes différences entre les génomes mitochondriaux des plantes et des animaux, l'idée majoritairement admise aujourd'hui est en faveur d'un événement unique d'endosymbiose (Gray *et al.*, 1999), qui serait survenu il y a 2,4 à 2,8 milliards d'années (Knoll, 1992).

1.2.2. L'origine des plastes verts et rouges

Le cas des plastes est plus complexe. En effet, il en existe plusieurs types, beaucoup plus différents entre eux que ne le sont les mitochondries entre elles. Ces différences furent d'ailleurs à la base de la classification des algues, par "couleur", c'est-à-dire plus

précisément par contenu pigmentaire des plastes, ainsi que par leur structure fine, observée en microscopie électronique.

Les plastes primaires sont ceux de tous les végétaux verts ainsi que ceux des algues rouges. Leur point commun est d'être entourés d'une enveloppe simple, à deux membranes, comme les mitochondries. Ils contiennent tous de la chlorophylle *a*, leur différence vient du pigment secondaire, qui est la chlorophylle *b* chez les végétaux verts alors que les algues rouges contiennent des phycobilisomes. Les glaucocystophytes ont eux aussi des plastes primaires avec les mêmes caractéristiques pigmentaires que les rouges, mais ils ont une paroi de peptidoglycane. La question se pose encore d'une origine unique de ces trois types de plastes ou de leur origine indépendante à partir de cyanobactéries proches (Bhattacharya *et al.*, 1995 ; Delwiche & Palmer, 1997 ; Helmchen *et al.*, 1995 ; Loiseaux-de Goër, 1994 ; Moreira *et al.*, 2000 ; Stiller & Hall, 1997).

1.3. Les endosymbioses secondaires

Une endosymbiose est qualifiée de secondaire quand le symbionte est un eucaryote.

Dans les cas des plastes secondaires qui nous intéressent, les symbiontes furent des algues vertes et rouges.

Le même type de processus de réduction du symbionte évoqué précédemment intervient alors (Figure 3, page 10). Le plaste qui en résulte est entouré de 3 à 4 membranes, selon le niveau d'évolution de l'endosymbiose. La régression de l'algue phagocytée implique ici également la réduction de son noyau et de ses propres mitochondries. En fonction du stade d'avancement du processus, il peut ou non subsister un noyau vestigial, appelé nucléomorphe. Sa découverte fut l'élément décisif pour légitimer l'hypothèse de l'endosymbiose entre deux eucaryotes à l'origine de certains plastes (Delwiche & Palmer, 1997 ; Douglas *et al.*, 1991 ; Gibbs, 1978 ; Gibbs, 1981 ; Gibbs, 1990). Aucun cas de persistance des mitochondries du symbionte n'a été reporté, à ma connaissance.

1.4. Les endosymbioses tertiaires

En suivant la même logique, il s'agit d'endosymbioses dont le symbionte est une algue à plaste secondaire.

C'est le cas de certains dinoflagellés. Pour la plupart d'entre eux, les algues à plastes secondaires sont des haptophytes, pour d'autres, le groupe des Dinophysis, ce sont des cryptophytes, alors que pour les *Peridinium*, il s'agit de diatomées Tengs *et al.*, 2000.

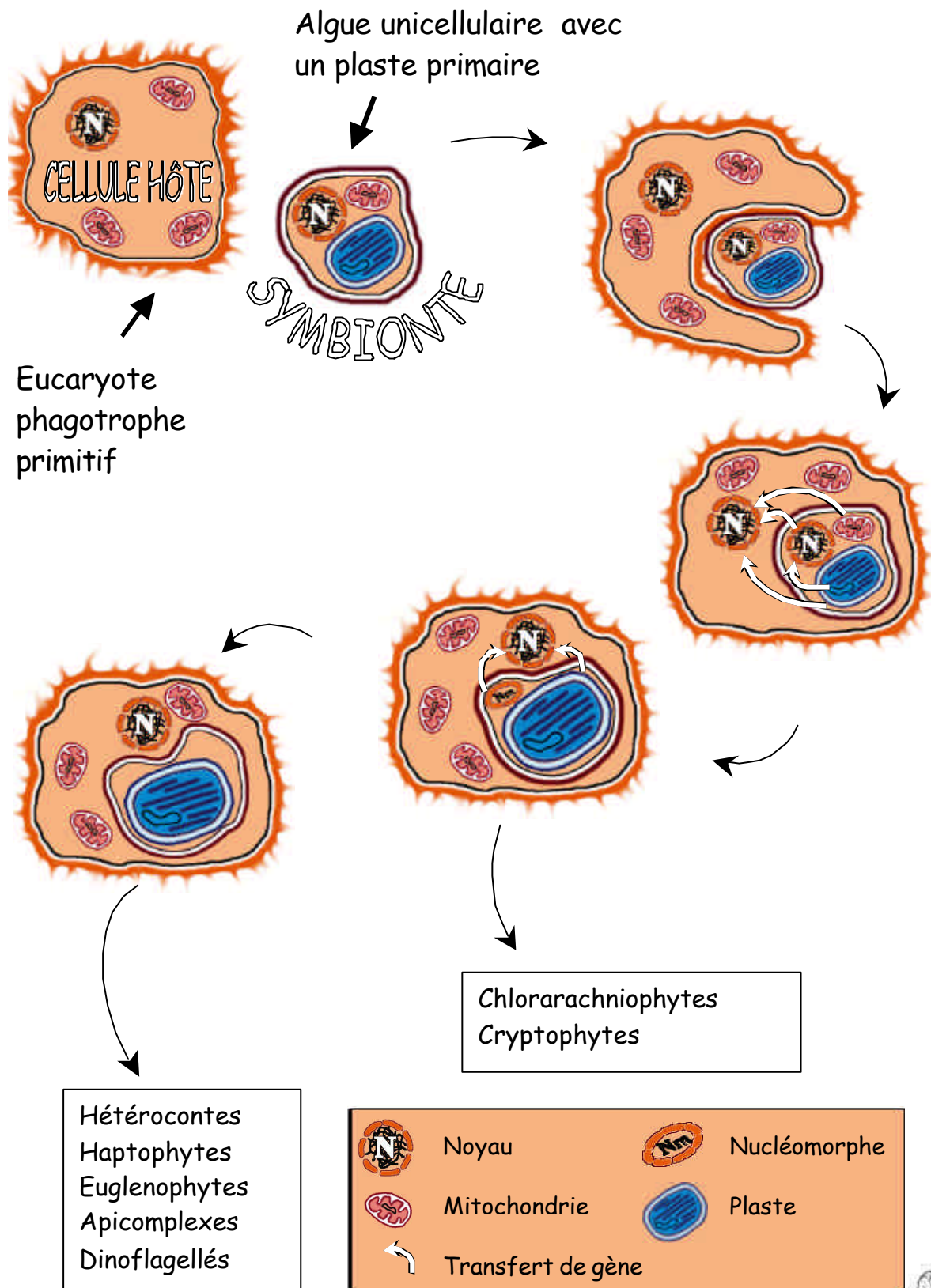


Figure 3 Origine des plastes par endosymbiose secondaire

(Figure extraite de l'article Origin and evolution of plastids and mitochondria: the phylogenetic diversity of algae. Boyen, C., Oudot, M.-P., & Loiseaux-de Goër, S. (2001). Cahiers de Biologie Marine).

La Figure 4 présente un récapitulatif des différentes lignées de plastes.

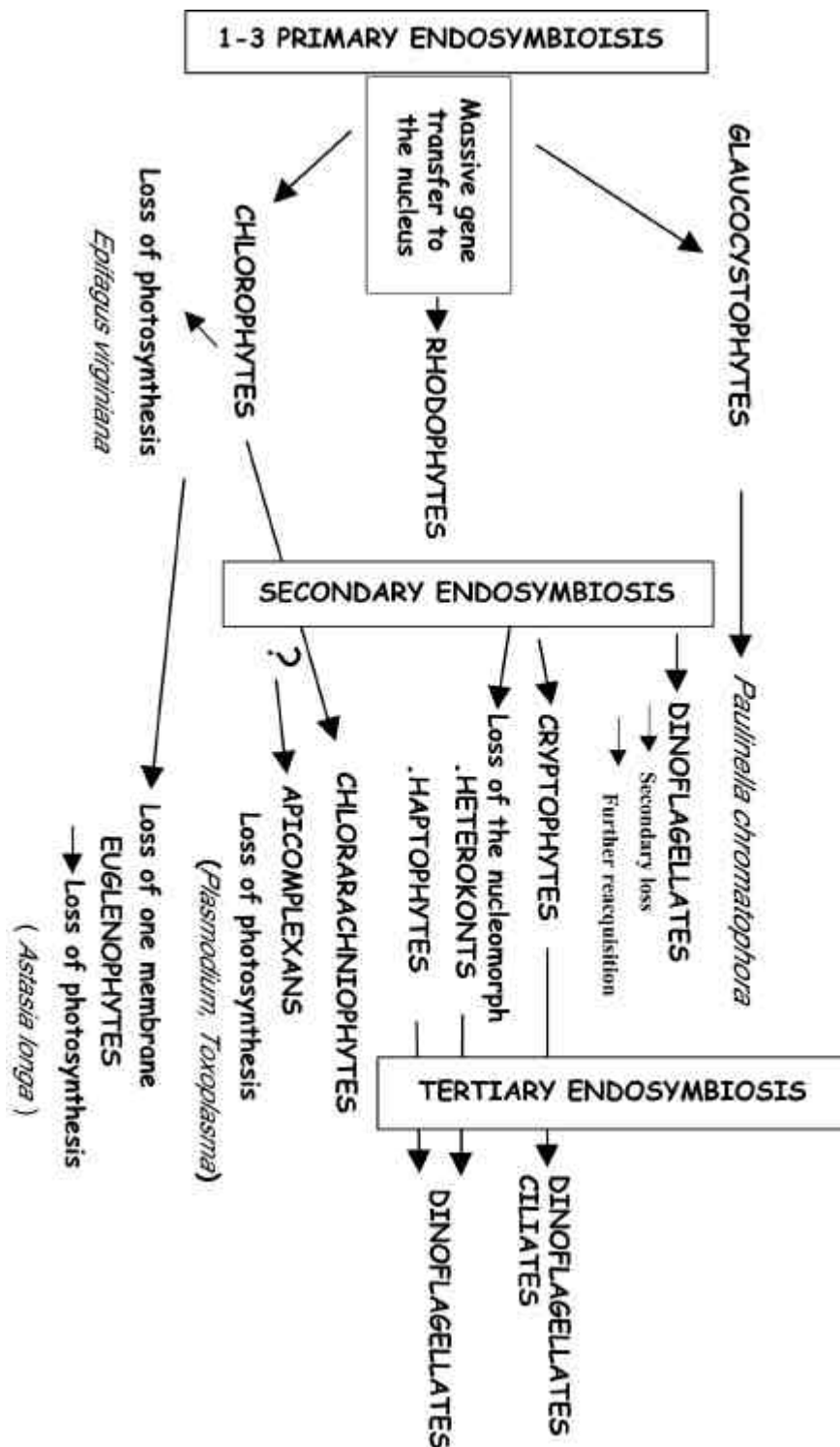


Figure 4 Les différentes lignées d'algues, en fonction de l'origine de leurs plastes

(Figure extraite de l'article Origin and evolution of plastids and mitochondria: the phylogenetic diversity of algae. Boyen, C., Oudot, M.-P., & Loiseaux-de Goër, S. (2001). Cahiers de Biologie Marine).

1.5. Le temps de l'établissement des endosymbioses

1.5.1. Des exemples de cas intermédiaires = processus lent ?

La frontière entre les relations alimentaires strictes (consommation d'algue) et l'établissement d'une relation endosymbiotique "intégrative" n'est pas toujours très nette, montrant par la même que ces processus sont en cours, encore de nos jours.

Ainsi, je citerai le cas des kleptoplastes. Il s'agit de plastes d'algues qui sont gardés dans un état fonctionnel de façon transitoire avant d'être digérés (Schnepf, 1992). Un autre exemple est celui des foraminifères : ils se nourrissent de certaines diatomées, alors que d'autres sont des endosymbiontes, qui perdent leur enveloppe cellulaire dans le cytoplasme de leur hôte (leur frustule) et qui sont transmissibles à leurs descendants. D'autres algues peuvent être des endosymbiontes de foraminifères, des algues rouges unicellulaires, des chlorophytes ou des dinoflagellés. Certains auteurs refusent le terme d'organite pour les décrire, car les cas étudiés jusqu'ici ont montré que ces algues régénèrent leur enveloppe cellulaire, quand elles sont extraites de leur hôte. Par contre, ceux-ci ne survivent pas longtemps ou ne peuvent pas se reproduire sans leurs algues endosymbiotes (Lee, 1995).

Il existe de nombreux autres exemples d'animaux et de champignons vivant avec des plastes provenant d'algues endosymbiontes (ou de cyanobactéries) qui peuvent être conservés dans un état fonctionnel pendant plusieurs mois avant d'être digérés complètement. Plusieurs articles traitant d'exemples différents se trouvent dans le livre *Algae and symbioses. Plants, animals, fungi, viruses, interactions explored* édité par W. Reisser en 1992.

1.5.2. Un exemple d'endosymbiose obligatoire établie rapidement

Alors qu'il était couramment admis que le processus faisant d'un organisme libre un organite ne devait être réalisable qu'à une échelle de temps géologique, un cas d'école a permis de se rendre compte que le phénomène pouvait être rapide. Une culture d'amibe, *Amoeba proteus*, maintenue et étudiée en laboratoire depuis près de 20 ans a été infectée en 1966 par une bactérie inconnue ("X") (Jeon, 1987). Cette infection, qui a pu être suivie de près, a conduit à une endosymbiose obligatoire. Des expériences ont montré qu'une amibe nouvellement infectée devenait dépendante de ses symbiontes en 18 mois, soit en 200 générations (Jeon & Ahn, 1978). Il a été montré qu'une protéine bactérienne était localisée dans le noyau des amibes, où une enzyme vitale n'était plus transcrite. Cette enzyme doit

alors être fournie par le symbionte, illustrant l'établissement d'une dépendance (Choi *et al.*, 1997 ; Pak & Jeon, 1997).

Ce cas montre aussi l'alternative à l'hypothèse phagotrophique, dans le sens nutritif, des théories endosymbiotiques. Des bactéries provoquant une infection, d'abord mortelle pour de nombreuses cellules, peuvent, une fois maîtrisées par quelques-unes seulement d'entre elles, moins sensibles, devenir indispensables et faire partie intégrante des générations suivantes.

Après cette présentation du processus des endosymbioses, nous allons revenir plus en détail d'abord sur les algues brunes, puis sur les mitochondries.

2. Les algues brunes

2.1. De la définition des algues

Comme cela vient d'être montré, il existe plusieurs types d'algues, selon l'origine de leurs plastes. Ce terme "algue" regroupe donc un ensemble d'organismes très différents. Il ne correspond pas à un groupe naturel d'organismes. En reprenant différentes classifications du vivant qui ont eu cours, une définition peut être approchée par restrictions successives (Van den Hoek *et al.*, 1995a).

D'abord, le terme de cryptogame, reproduction cachée, a été utilisé. Il regroupe les algues, les champignons, les mousses et les fougères.

Celui de thallophyte, appareil végétatif non différencié en tissus, est restreint aux seules algues et champignons.

Si on considère la capacité de photosynthèse, on parle bien uniquement des algues, sachant pourtant que certaines l'ont justement perdue.

Les algues sont donc des organismes qui n'ont ni racine, ni feuille, ni système de vascularisation, mais un thalle, photosynthétique (le plus souvent).

Cette définition regroupe bien toutes les algues, qu'elles soient à plastes primaires ou non. La mise en culture peut être nécessaire pour différencier ces secondes des cas où les plastes des algues sont consommés après avoir été maintenus fonctionnels plus ou moins longtemps (Schnepf, 1992).

Au niveau phylogénétique, les algues sont polyphylétiques, car il faut considérer l'histoire de l'hôte, du noyau. Par contre, si l'on considère les plastes, selon le nombre d'endosymbioses primaires, seulement un à trois phylums seraient définis, le phylum des plastes verts étant alors à la base du phylum des plantes.

Remarque : alors que le mot "algue" fait *a priori* penser à l'eau, et surtout à la mer, cet élément n'entre pas dans la définition du terme.

2.2. Place phylogénétique des algues brunes

Les algues brunes font parties des hétérocontes, aussi appelés stramenopiles. Ce groupe comprend plusieurs lignées d'hétérotrophes unicellulaires, qui peuvent être libres, par exemple *Cafeteria roenbergensis*, ou parasites, comme la plupart des oomycètes (*Phytophthora infestans*), ainsi que différentes lignées d'organismes photosynthétiques, unicellulaires comme les diatomées, les xanthophycées et les bolidophycées ou pluricellulaires comme les algues brunes ou fucophycées. Le point commun à tous ces organismes, apparemment très différents, est l'existence à un stade au moins de leur vie, de cellules dont les deux flagelles sont de taille différente (hétérocontés), l'un portant des mastigonèmes tripartites (ou retronèmes) qui inversent le sens de la nage, l'autre étant lisse (Figure 5, page 15).

Les hétérocontes font partie de la "couronne des eucaryotes", bien que leur différenciation soit légèrement antérieure à celle des plantes, des champignons et des animaux.

L'analyse d'arbres phylogénétiques, construits à partir de gènes codant l'ARNr 18S cytoplasmique et l'ARNr 16S plastidial, indique que toutes les lignées d'hétérocontes photosynthétiques sont probablement dérivées d'une seule endosymbiose secondaire entre un hétéroconte hétérotrophe unicellulaire et une algue rouge primitive (Figure 6, page 16).

Les algues brunes sont un groupe solide parmi les hétérocontophytes. Elles comprennent des ordres monophylétiques, les Ectocarpales, les Sphacélariales, et les Fucales, par exemple, alors que d'autres sont polyphylétiques, comme les Laminariales (Figure 7, page 18).

2.3. Caractéristiques des algues brunes

2.3.1. Morphologie

Contrairement aux autres lignées d'algues hétérocontes, les algues brunes sont toutes pluricellulaires. Chez ces algues, les cellules flagellées, caractéristiques, sont toujours des cellules reproductives.

La morphologie du thalle des algues brunes est des plus variable : depuis des filaments vrais (unisériés) à croissance intercalaire, comme *Pylaiella littoralis*, aux algues

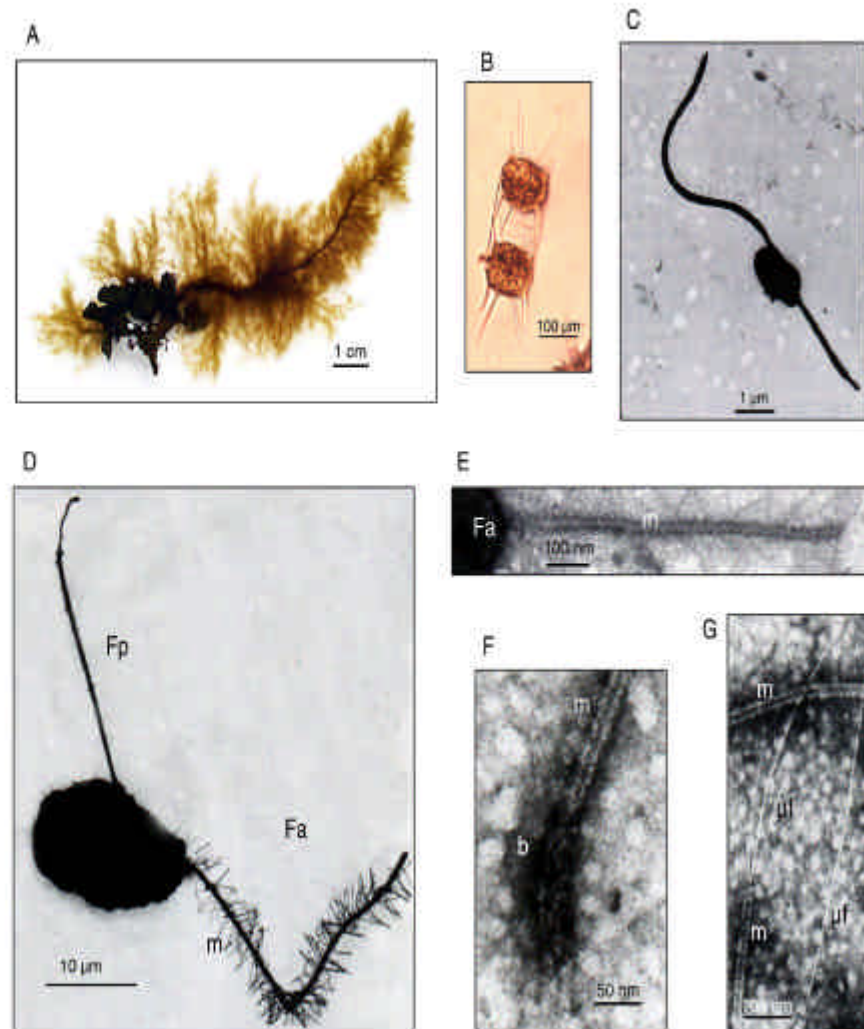


Figure 5 Les hétérocontophytes : variété et point commun

A. Algues brunes : *Pylaiella littoralis* sur un *Fucus* sp., photo M-P. Oudot ; B. Diatomées : Deux *Odontella* sp., photo N. Simon ; C. Bolidophycée : *Bolidomonas mediterranea*, photo extraite de Guillou *et al.*, 1999 ; D. Zoïde d'une algue brune, *Ralfsia verrucosa* (Aresch.), Fp : flagelle postérieur lisse et terminé par un fouet, Fa : flagelle antérieur portant des mastigonèmes, m ; E, F et G. Mastigonèmes en coloration négative : E. Vue générale ; F. Base (b) d'un mastigonème détaché du flagelle antérieur d'un zoïde de *Leptonematella fasciculata* (Reinke) Silva (Phéophyte) ; G. μf : Microfilaments terminaux de mastigonèmes de *Giraudyopsis* sp. (Chrysophyte) ; photos de D à G : S. Loiseaux.

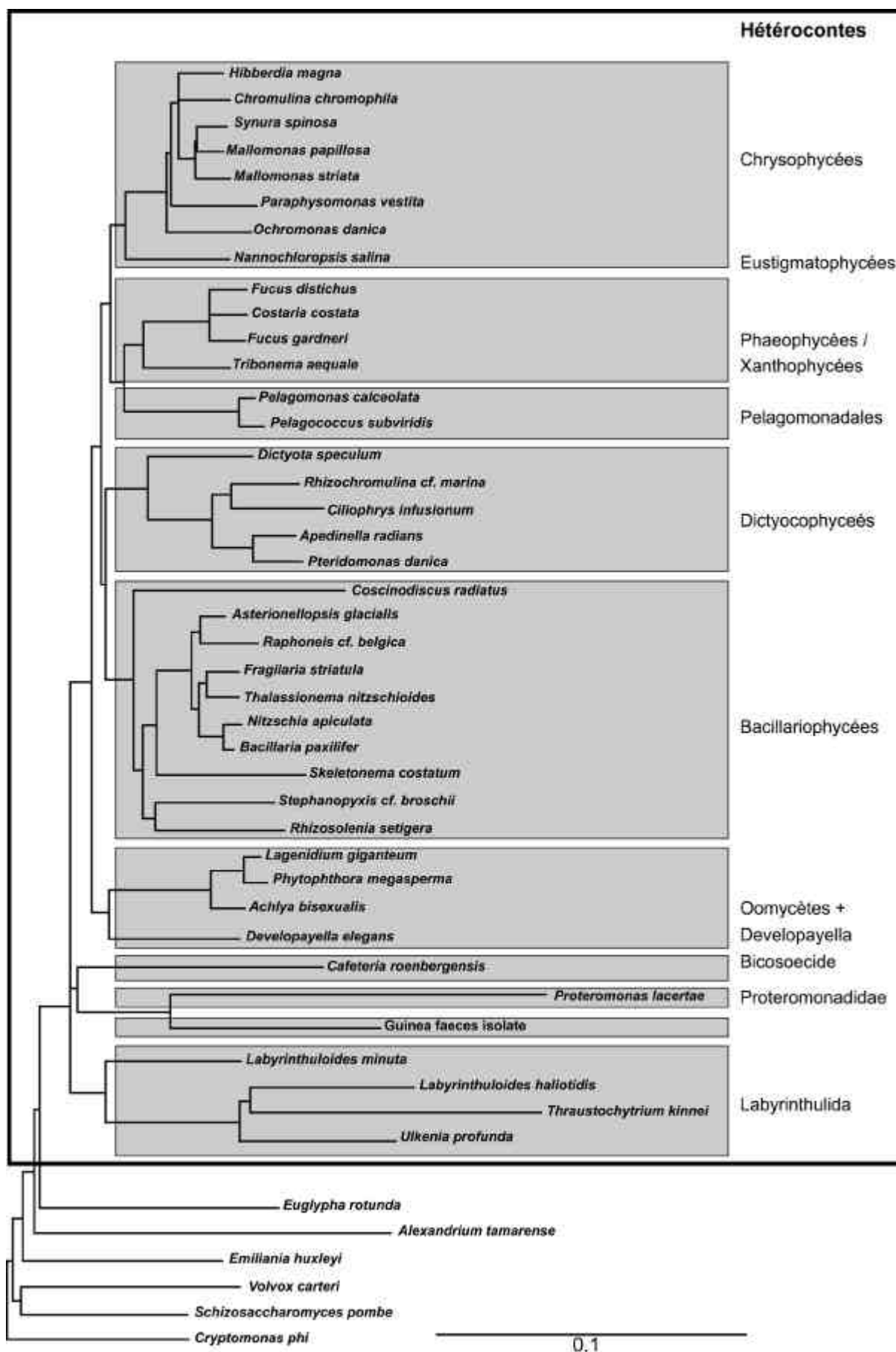
constituées d'un crampon, d'un stipe et d'une fronde, dans lesquelles des cellules de conduction spécialisées existent, comme *Laminaria digitata* (Figure 8, page 19). La taille des phéophycées est tout aussi variable, si certaines ne mesurent que quelques millimètres, les myrionematacées par exemple, d'autres peuvent atteindre plusieurs dizaines de mètres comme *Macrocystis* (40 m) (de Reviers & Rousseau, 1999).

Les plastes sont entourés de quatre membranes, les trois internes étant attribuées à l'algue phagocytée, la plus externe correspondant au réticulum endoplasmique de l'hôte. Chez les algues brunes, on parle de complexe nucléoplastidial (Billard, 1985 ; Gibbs, 1962), car la quatrième membrane est en continuité avec la membrane nucléaire (Figure 9, page 20). Les plastes peuvent être présents sous des formes variées, depuis un seul plaste rubané, jusqu'à de nombreux plastes, plus ou moins ovoïdes, par cellule. Chez les espèces les plus primitives morphologiquement, les plastes portent des pyrénoides caractéristiques, en forme de poire (Figure 10, page 21).

Les thylakoïdes, en lamelles non fusionnées, sont groupés par trois, un de ces ensemble faisant le tour du plaste (Van den Hoek *et al.*, 1995b).

Figure 6 Arbre phylogénétique des hétérocontes basé sur les similitudes de structures des gènes d'ARN de la petite sous-unité ribosomique (→)

L'arbre phylogénétique a été obtenu par *least square distance matrix analyses*. L'analyse était limitée aux 1550 positions qui pouvaient être alignées sans ambiguïté. Les distances horizontales entre les nœuds représentent les distances évolutives relatives. La barre d'échelle correspond à 10 changements pour 100 positions (Figure reproduite de Leipe *et al.*, 1996).



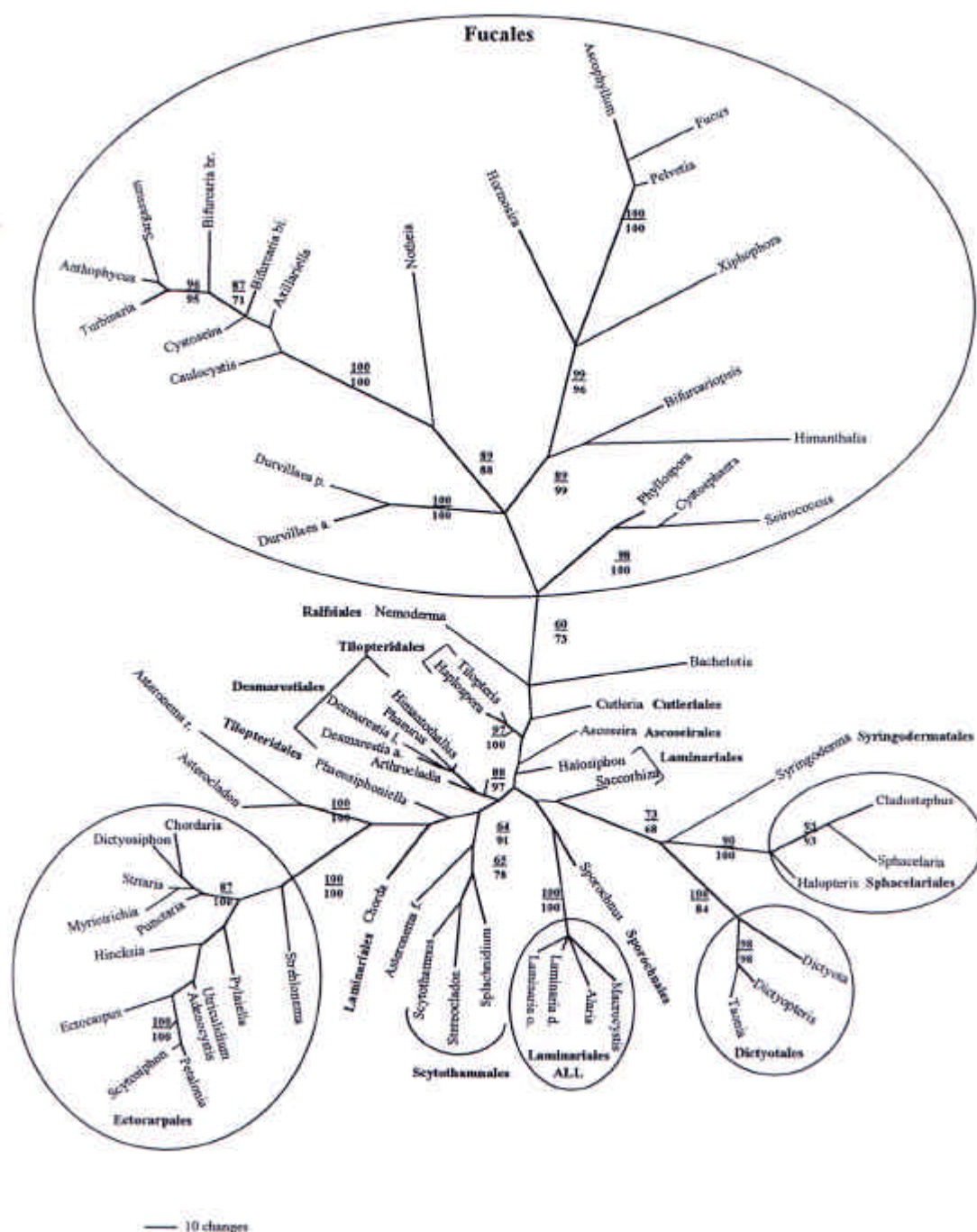


Figure 7 **Arbres phylogénétiques des algues brunes**

Consensus strict de 63 arbres de parcimonie basé sur un alignement de séquences d'ARNr. Les valeurs de *bootstrap* correspondantes (en % pour 1000 répliquats) sont soulignées, alors que celles indiquées en-dessous sont celles de l'arbre obtenu par la méthode du plus proche voisin (*neighbour-joining*, non montré). Seules les valeurs de *bootstrap* supérieures ou égales à 70 sont indiquées (Figure reproduite de De Reviers *et al.*, sous presse, avec autorisation).

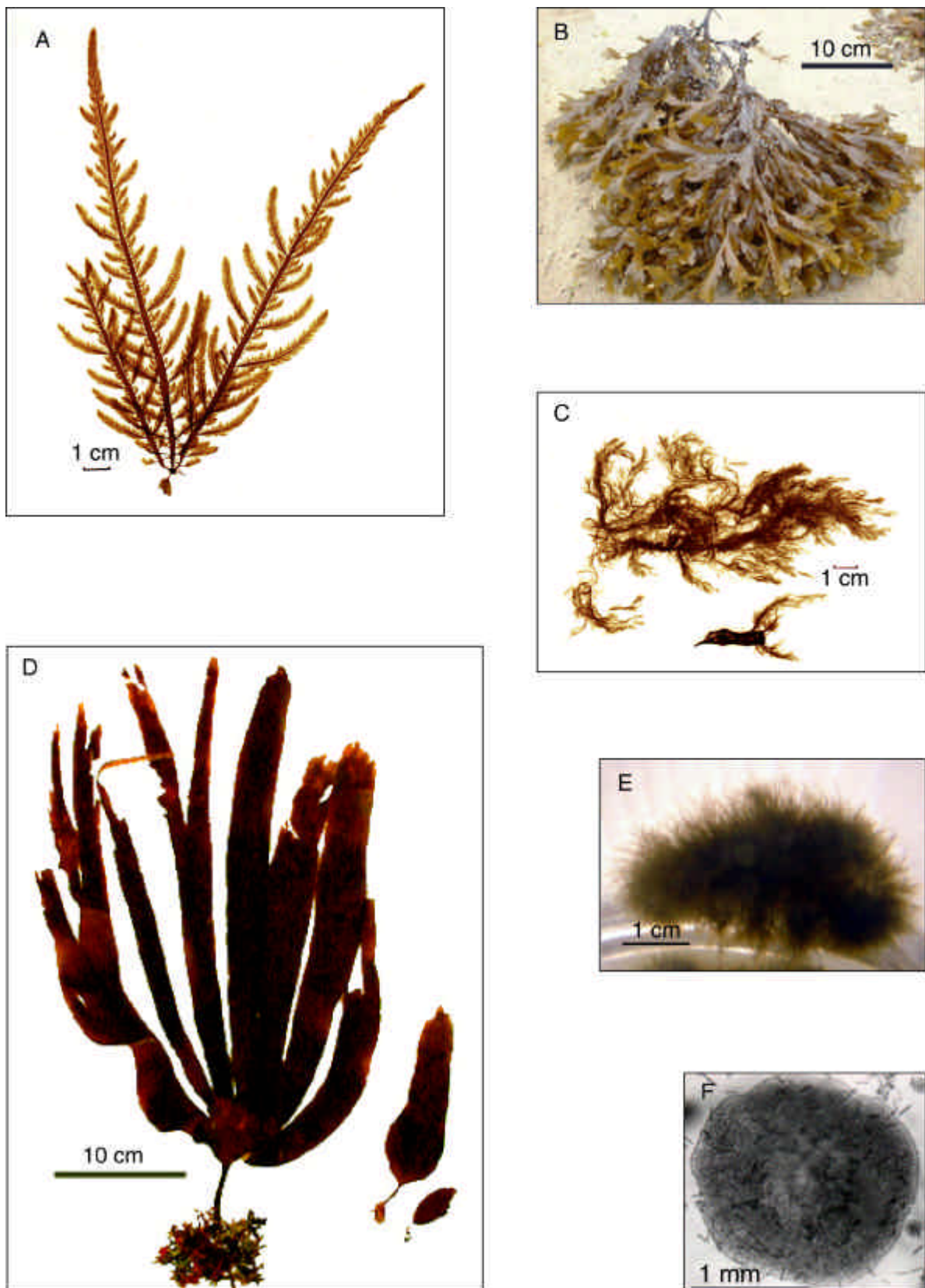


Figure 8 Exemples d'algues brunes

A. *Desmarestia ligulata*, forme juvénile, exemplaire d'herbier scanné, M-P. Oudot ; B. *Fucus serratus*, photo M-P. Oudot ; C. *Pylaiella littoralis*, exemplaire d'herbier scanné, M-P. Oudot ; D. Trois sporophytes de *Laminaria digitata*, photo P. Le Secq ; E. *Sphacelaria* sp. en culture, photo M-P. Oudot ; F. *Myrionema magnusii* (Sauv.) Lois., en culture (entouré de diatomées), photo S. Loiseaux.

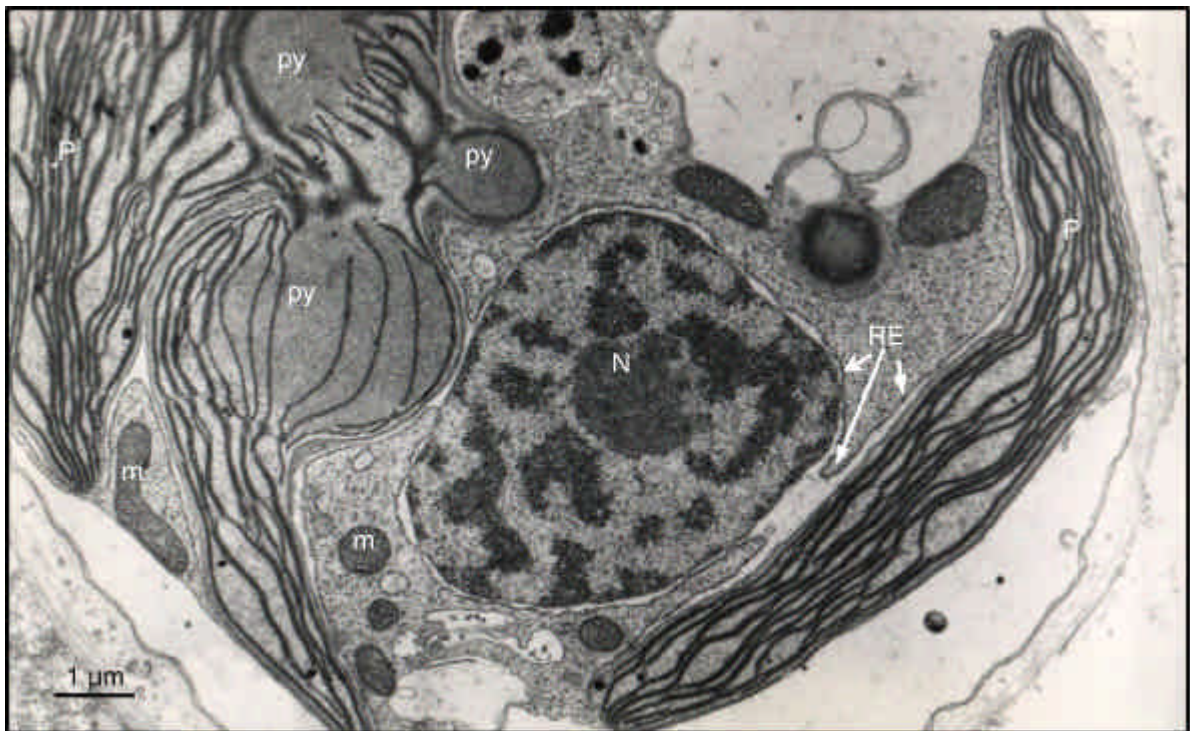


Figure 9 **Le complexe nucléoplastidial des algues brunes**

Micrographie d'une coupe de *Pleurochrysis pseudoroscoffensis*, photo C. Billard. P. : Plastes ; N. : noyau ; RE. : réticulum endoplasmique ; py. : pyrénoïde ; m. : mitochondrie.

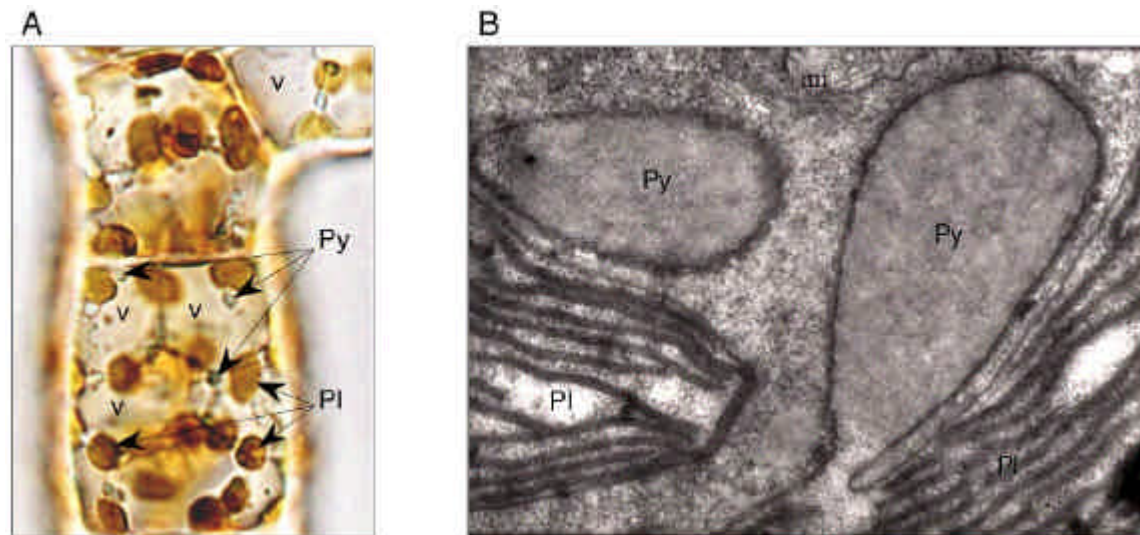
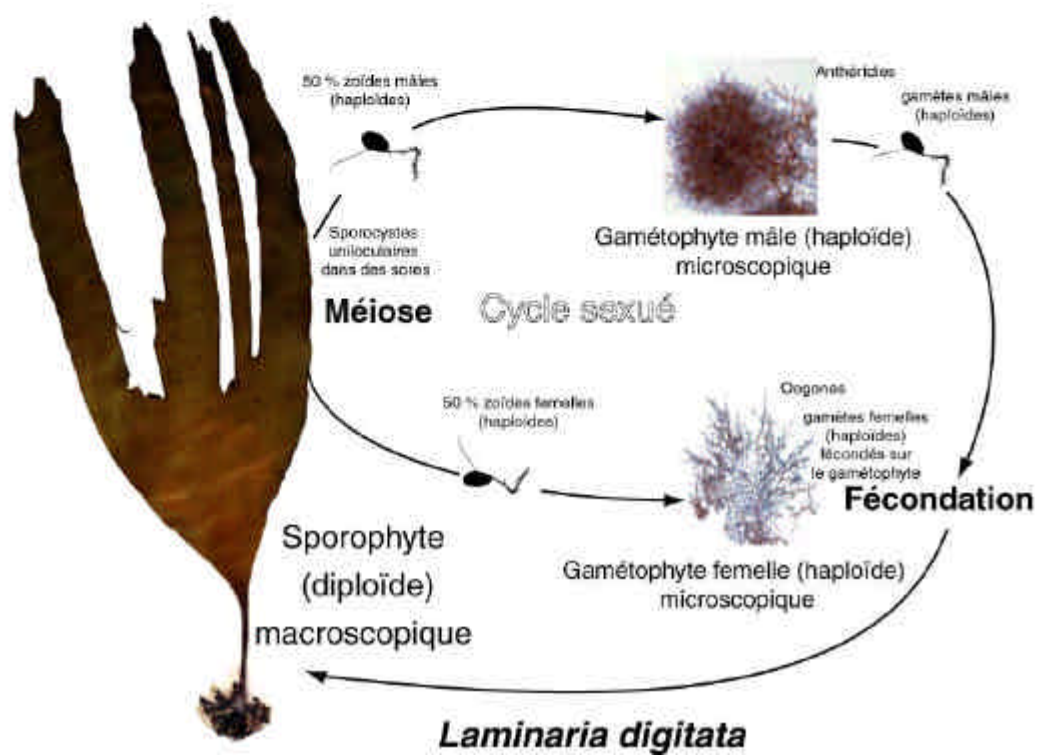
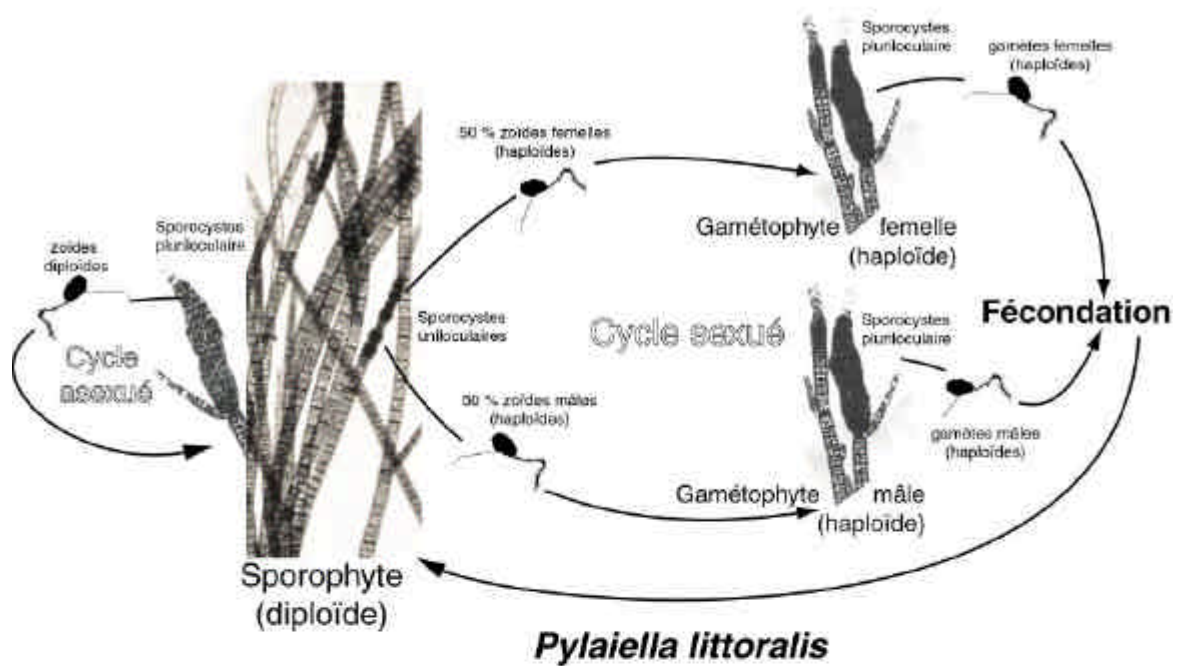


Figure 10 Micrographies de pyrénioï des

A. Filament de *P. littoralis* observé au microscope photonique (Photo A. Asensi). Py. : pyrénioïde ; Pl. : plaste ; v. : vacuole. B. Coupe de *P. littoralis* observée au microscope électronique à balayage. mi. : mitochondrie.

Figure 11 Les cycles de vie de *Pylaiella littoralis* et de *Laminaria digitata* (→)

Le cycle sexué de *P. littoralis* est haplodiplobiotique isomorphe alors que celui de *L. digitata* est haplodiplobiotique hétéromorphe. Le sporophyte de *L. digitata* se développe sur le gamétophyte, après la fécondation, qui a lieu sans libération des oosphères (photos : *P. littoralis* : S. Loiseaux ; *L. digitata* : sporophyte, P. Le Secq, gamétophyte, équipe Kloareg).



2.3.2. Physiologie

En plus de la chlorophylle a, les algues brunes possèdent principalement des chlorophylles c_{1+2} , du β -carotène, de la fucoxanthine et de la violaxanthine (Van den Hoek *et al.*, 1995b).

Les parois cellulaires sont composées de deux types de polysaccharides : une partie fibrillaire, de la cellulose, est baignée dans une matrice amorphe d'alginate. Les alginates sont des polymères d'acides L-guluronique (G) et D-mannuronique (M), liés par des liaisons β -1,4. Selon la proportion des G et des M, les propriétés physiques des alginates, et ici, des parois des algues, sont différentes. Ainsi, dans une laminaire, les alginates présents au niveau du crampon, du stipe et de la fronde sont différents. C'est ce qui explique les propriétés différentes de ces trois parties des algues, de rigide à souple (Kloareg & Quatrano, 1988).

Le polysaccharide de réserve principal des algues brunes est la chrysolaminarine, polymère hydrosoluble de glucanes liés par des liaisons β -1,3 (Van den Hoek *et al.*, 1995b).

Les algues brunes ont des cycles de vie qui présentent généralement une alternance entre des individus haploïdes et des individus diploïdes. Ils peuvent être isomorphes (*Pyraliella littoralis*) ou hétéromorphes (*Laminaria digitata*) (Figure 11). Des cycles asexués peuvent se surajouter. Dans le cas de *P. littoralis*, bien que le cycle sexué ait été décrit par plusieurs auteurs (Knight, 1923 ; Markey & Wilce, 1975 ; Markey & Wilce, 1976a ; Markey & Wilce, 1976b), il n'a pas toujours été observé avec des algues provenant d'autres origines géographiques ; outre le fait que la reproduction sexuée peut être limitée à une courte période de l'année, il semblerait que certaines souches ne se reproduisent que de façon végétative (West, 1967).

2.3.3. Choix des modèles utilisés

Pyraliella littoralis fait partie de l'ordre des Ectocarpales. Elle a été choisie parmi les algues brunes comme modèle d'étude pour ses caractéristiques morphologiques et cytologiques "primitives" : filaments unisériés, croissance diffuse, présence de pyrénoides (Van den Hoek *et al.*, 1995b).

Par la suite, il nous a paru intéressant de comparer le génome mitochondrial de cette algue avec celui des algues brunes d'autres ordres, afin de voir comment il a évolué dans cette lignée. Le choix de *Laminaria digitata* a été motivé par plusieurs considérations. Outre le fait que cette Laminariale était étudiée sous d'autres angles dans l'équipe (Billot *et al.*, 1998), de par l'organisation de son thalle, la présence d'un pseudo-système vasculaire,

L. digitata est vraisemblablement une algue que l'on peut qualifier "d'évoluée" (de Reviers & Rousseau, 1999). De plus, son intérêt économique, tant au niveau des alginates qu'à celui de l'iode, en fait un modèle qu'il est intéressant de connaître. La connaissance du génome mitochondrial de *L. digitata* peut permettre le développement d'outils moléculaires comme des marqueurs servant à l'étude des populations, mais il peut aussi apporter des renseignements précieux, à long terme, pour la mise en place de mutants mitochondriaux aux qualités industrielles exploitables.

D'autres algues ont été testées sur certains points de comparaison précis. Il s'est tout d'abord agi d'une autre souche de *P. littoralis* (venant d'Helgoland). Puis, des phéophycées d'autres ordres, une Sphacelariale, *Sphacelaria* sp., dont les cultures étaient maintenues au laboratoire, ainsi que d'une Fucale, *Fucus serratus*, utilisée comme modèle de développement précoce du zygote (Corellou *et al.*, 2000a ; Corellou *et al.*, 2000b ; Kropf *et al.*, 1988).

3. Les mitochondries

Les mitochondries constituent des compartiments cellulaires de la plus grande majorité des eucaryotes où ont lieu en particulier les réactions de la respiration cellulaire, mais des cofacteurs essentiels comme la biotine et le folate y sont également synthétisés, ainsi que des acides gras (Baldet *et al.*, 1997 ; Rébeillé *et al.*, 1997 ; Wada *et al.*, 1997).

Comme je l'ai précisé plus haut, l'existence d'un eucaryote primitif sans mitochondrie est actuellement mise en doute (voir Chapitre I.1.1.3, page 5). Différentes études ont récemment montré que des organismes amitochondriés l'étaient en réalité par perte secondaire des mitochondries (Germot *et al.*, 1996 ; Germot *et al.*, 1997 ; Hashimoto *et al.*, 1998 ; Horner *et al.*, 1996 ; Lang *et al.*, 1999 ; Tovar *et al.*, 1999). De plus certains de ces organismes possèdent par contre des hydrogénosomes qui seraient vraisemblablement dérivés des mitochondries (Andersson & Kurland, 1999 ; Bui *et al.*, 1996 ; Germot *et al.*, 1996 ; Hausler *et al.*, 1997 ; Horner *et al.*, 1996).

Après avoir rappelé les caractéristiques générales des mitochondries, je décrirai brièvement les complexes enzymatiques qu'elles abritent. Je détaillerai ensuite plus longuement les génomes mitochondriaux, en faisant pour cela un détour par ceux des bactéries.

3.1. Caractéristiques des mitochondries

3.1.1. Généralités

Les mitochondries ont généralement une apparence de cylindres de 0,5 à 1 μm , elles ressemblent à des bactéries, comme nous l'avons vu dans l'historique de leur découverte. Le nombre, la forme et la localisation des mitochondries sont variables (Figure 12, page 26). Elles peuvent occuper une part importante du cytoplasme des cellules eucaryotes. Le plus souvent, leur localisation est guidée par leur fonction. Elles sont nombreuses ou de grande taille à proximité des sites de forte consommation d'énergie, nécessitée par des mouvements (flagelle des spermatozoïdes) ou des sécrétions (néphrons). Chez les organismes pluricellulaires, elles peuvent être en nombre et de formes différentes selon l'organe, le tissu (Alberts *et al.*, 1995).

Les mitochondries se divisent par bipartition ou bourgeonnement. La microcinématographie séquentielle de cellules vivantes a permis de constater que les mitochondries sont extrêmement mobiles et malléables, qu'elles changent constamment de forme, fusionnent et se séparent. Elles sont souvent associées aux microtubules, lors de leurs déplacements (Bereiter-Hahn & Voth, 1994).

3.1.2. L'enveloppe mitochondriale

Les mitochondries sont entourées d'une enveloppe constituée de deux membranes :

- La membrane externe

Elle est semi-perméable, en raison de la présence de protéines formant des pores non sélectifs, les porines, laissant passer les molécules de 5 kD au maximum (Alberts *et al.*, 1995). Elle a vraisemblablement pour origine la membrane de phagocytose de l'hôte. Cette hypothèse est étayée par sa composition, différente de celle de la membrane interne et comportant des similitudes avec les membranes plasmique et/ou du réticulum.

- La membrane interne

Elle forme des crêtes dont la forme et le nombre varient avec l'état physiologique de l'organisme. Elles peuvent être tubulaires, comme chez les hétérocontes ou en plis longitudinaux ou transversaux, chez la plupart des plantes et des animaux. Elle serait le plasmalemmes de l'endosymbionte d'origine. Elle comprend les complexes de la chaîne respiratoire qui seront décrits après (Chapitre I.3.1.4, page 27).

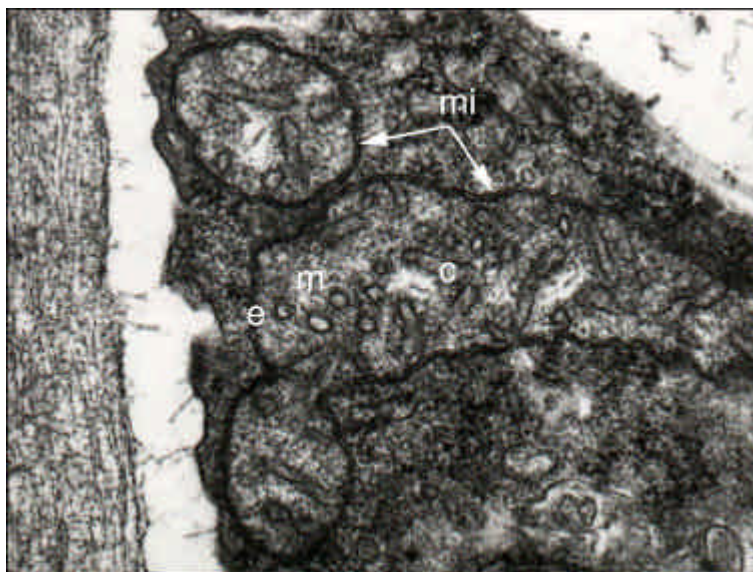


Figure 12 **Micrographies de mitochondries**

Coupe d'une cellule d'*Elachista fucicola* (Vell.) Aresch. observée au microscope électronique à transmission, photo S. Loiseaux. La plus grande des mitochondries est en train de bourgeonner. mi. : mitochondrie ; e. : enveloppe mitochondriale ; c. : crête mitochondriale, tubulaire ; m. : matrice.

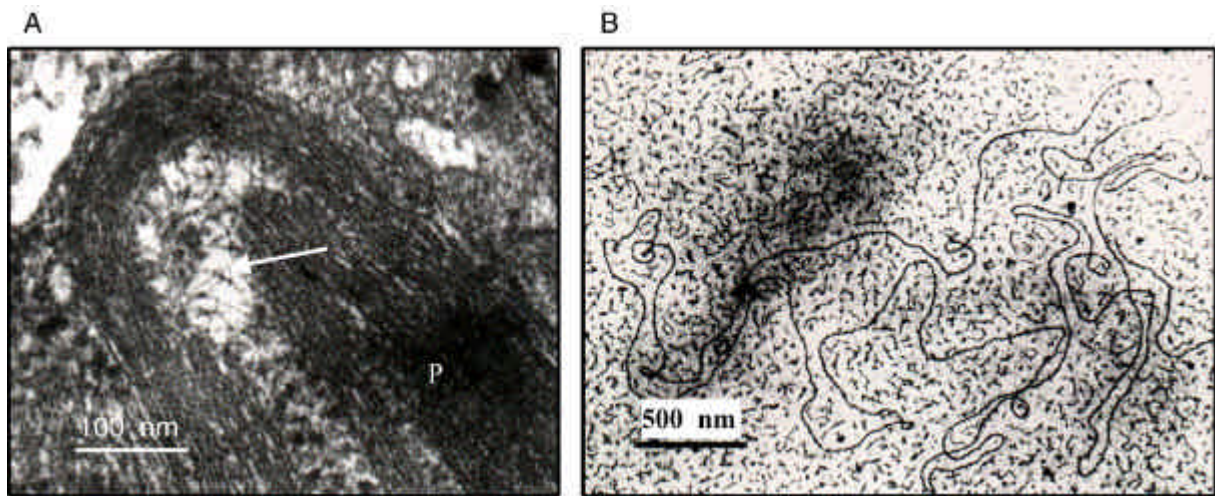
L'espace délimité entre ces deux membranes a une composition en petites molécules proche de celle du cytosol, puisqu'elles peuvent passer par les porines, alors que l'espace matriciel, limité par la membrane interne, peut avoir une composition très différente.

3.1.3. La matrice

Comme souvenirs de leur passé d'organismes libres, les mitochondries ont conservé un équipement cellulaire de base. La matrice correspond au cytosol du symbionte d'origine, c'est là que se trouvent entre autres des ribosomes de type bactérien (70S), et des fibres d'ADN, visibles en microscopie électronique (Nass & Nass, 1963a ; Nass & Nass, 1963b), constituent leur génome (Figure 13).

Figure 13 **Micrographies de fibres d'ADN (→)**

A. Fibres d'ADN dans un plaste (P.) observé dans une coupe de zoïdocyste uniloculaire d'*Elachista fucicola* (Vell.) Aresch., au microscope électronique à transmission (photo S. Loiseaux). B. Génome mitochondrial de *P. littoralis*, observé au microscope électronique à transmission.



3.1.4. Les complexes enzymatiques des mitochondries

Les mitochondries sont le siège des phosphorylations oxydatives qui permettent la synthèse d'ATP, molécule énergétique utilisable directement par les réactions cellulaires. C'est ainsi qu'elles sont souvent présentées comme les "usines énergétiques" de la cellule.

L'acétyl CoA peut être considéré comme le combustible de base. Il est produit, dans la matrice des mitochondries, à partir du pyruvate (venant de la glycolyse cytosolique) et par oxydation des acides gras. Il réagit ensuite avec l'oxaloacétate, produisant de l'acide citrique. Au cours du cycle dit de Krebs, le cycle des acides tricarboxyliques ou cycle de l'acide citrique, celui-ci va être dégradé, donnant deux molécules de CO_2 par des décarboxylations, ainsi qu'une réserve de pouvoir réducteur, sous forme de FADH_2 et de NADH (Alberts *et al.*, 1995).

Ces deux molécules transmettent ensuite leurs électrons à la chaîne respiratoire.

Celle-ci est constituée de quatre complexes enzymatiques, localisés dans la membrane interne des mitochondries. Ils génèrent un gradient électrochimique transmembranaire de protons, utilisé par un cinquième complexe pour synthétiser l'ATP.

Les caractérisations rapides des différents complexes, qui suivent, sont basées sur (Saraste, 1999 ; Vedel *et al.*, 1999 ; Weiss *et al.*, 1991 ; Wilkens & Capaldi, 1998). Des études sont réalisées principalement chez *Bos taurus*, *Neurospora crassa*, *Saccharomyces cerevisiae* et *Solanum tuberosum*. Dans le Tableau I, page 28, les données actuelles sur ces complexes sont résumées, tant en ce qui concerne le nombre de sous-unités et le compartiment dans lequel elles sont codées, que leur masse moléculaire.

Tableau I Les sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire et de l'ATP synthase, et leur masse moléculaire

Les abréviations utilisées sont : mt, nucléaire, nombre des sous-unités codées dans le génome mitochondrial, nucléaire, respectivement ; -, sous-unité absente ; MM kD, masse moléculaire des complexes isolés, mesurée par microscopie électronique et/ou BN-PAGE ; (), valeurs obtenues en additionnant les masses moléculaires apparentes de chaque sous-unité ; *, la différence entre les deux valeurs indique que le complexe III est un dimère ; #, les valeurs entre parenthèses ne prennent pas en compte la stoechiométrie des sous-unité F1. Les données sont adaptées de : Braun *et al.*, J. Bioenerg. Biomembr. 27 (1995) 423-436 ; Capaldi *et al.*, Annu. Rev. Biochem. 59 (1990) 569-596 ; Grossman *et al.*, Biochim. Biophys. Acta 1352 (1997) 174-192 ; Guénebaut *et al.*, J. Mol. Biol. 276 (1998) 105-112 ; Hatefi *et al.*, Annu. Rev. Biochem. 54 (1985) 57-64 ; Jansch *et al.*, Plant J. 9 (1996) 357-368 ; Nehls *et al.*, J. Mol. Biol. 227 (1992) 1032-1042 ; Poynton *et al.*, Methods Enzymol. 260 (1995) 97-116 ; Tzagoloff, Methods Enzymol. 260 (1995) 51-63 ; Walker *et al.*, J. Mol. Biol. 226 (1992) 1051-1072 ; Walker *et al.*, Methods Enzymol. 260 (1995) 163-190 et Weiss *et al.*, Eur. J. Biochem. 197 (1991) 563-576. (Reproduit de Vedel *et al.*, 1999, avec l'autorisation de l'auteur. Ajout de la colonne *Reclinomonas americana*, AF007261)

	<i>Bos taurus</i>	<i>Neurospora crassa</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	<i>Reclinomonas americana</i>
Complexe I					
mt	7	7	-	9	11
nucléaire	34	28	-	23	
MM kD	900 (89)	1120	-	1000 (739)	
Complexe II					
mt	-	-	-	-	3
nucléaire	4	4	4		
MM kD	(125)		(125)		
Complexe III					
mt	1	1	1	1	1
nucléaire	9	9	9	9	
MM kD	500* (240)	550* (231)	(233)	480* (247)	
Complexe IV					
mt	3	3	3	3	4
nucléaire	10	8	8	7	
MM kD	200 (195)		(197)	160 (148)	
Complexe V					
F1					
mt	-	-	-	1	2
nucléaire	5	5	5	5	
MM kD	371		(160)#	350 (160)#	
Complexe V					
F0					
mt	2	3		2	3
nucléaire	9	5		5	
MM kD		(130)		(117)	

3.1.4.1. Complexe I : NADH : ubiquinone oxydoréductase ou NADH déshydrogénase

Il est le plus gros de ces complexes (plus de 900 kD pour un monomère). Il a une forme en L révélée par microscopie électronique. Deux domaines sont ainsi séparés, une partie est transmembranaire alors que l'autre dépasse dans la matrice. L'enzyme de

mammifère contient un FMN, 7 ou 8 centres fer-soufre (FeS), un lipide lié de façon covalente et au moins trois quinols liés.

3.1.4.2. Complexe II : Succinate : ubiquinone réductase ou succinate déshydrogénase

C'est un composant du cycle de Krebs. Il participe à la chaîne de transport des électrons en les transférant du succinate à l'ubiquinone. Il contient des FAD et de nombreux centres FeS. Ce complexe est ancré à la membrane par l'intermédiaire d'un cytochrome de type b.

3.1.4.3. Complexe III : Cytochrome bc₁

C'est le complexe respiratoire le mieux connu. La structure tridimensionnelle de l'enzyme de bœuf a été déterminée. Ce complexe est enchâssé dans la membrane, il fonctionne en dimère, dont chaque monomère est constitué de 10 ou 11 sous-unités (selon les références), et a une masse de l'ordre de 240 kD. Il transfère les électrons de l'ubiquinol au cytochrome c. Cette réaction est couplée à la génération d'un gradient de protons entre les deux côtés de la membrane.

3.1.4.4. Complexe IV : Cytochrome oxydase

La structure tridimensionnelle de l'enzyme de bœuf a été déterminée. Ce complexe fonctionne en dimère, dont chaque monomère est constitué de 10 à 13 sous-unités, et a une masse de ~150 à 200 kD. Ce complexe génère un gradient de protons entre les deux côtés de la membrane, par leur transfert couplé à celui des électrons du cytochrome c à l'oxygène moléculaire.

3.1.4.5. Complexe V : ATP synthase

Ce complexe est constitué de deux parties, reliées par un pédoncule commun, l'une est transmembranaire et l'autre matricielle. Cette enzyme est réversible, elle synthétise de l'ATP à partir d'ADP, en utilisant la force motrice du gradient de protons, mais elle peut aussi pomper des protons contre le gradient électrochimique, en hydrolysant de l'ATP. L'image de la turbine, impliquant la rotation d'une structure centrale est confirmée par différentes techniques d'imagerie.

Dans le Tableau I, page 28, il apparaît que la majorité des gènes, qui codent les nombreuses sous-unités de ces différents complexes, ne sont plus codés dans les génomes mitochondriaux, mais que les situations sont différentes selon les organismes.

Nous allons à présent caractériser les différents types de génomes mitochondriaux.

3.2. Les génomes mitochondriaux

Le patrimoine génétique d'une mitochondrie est constitué de multiples copies d'un génome généralement circulaire et de petite taille, entre 6 kpb (*Plasmodium falciparum* numéro d'accès NC002375) et plusieurs centaines de kilo de paires de bases (plantes supérieures).

Comme nous l'avons vu précédemment, les mitochondries sont issues d' α -protéobactéries, leur génome ancestral devait donc ressembler quelque peu à un génome d' α -protéobactérie. Je vais d'abord décrire rapidement les génomes de protéobactéries avant de décrire ceux des mitochondries actuelles.

3.2.1. Quelques caractéristiques de génomes de protéobactéries

Un seul génome d' α -protéobactérie est entièrement séquencé à ce jour. Il s'agit de celui de *Rickettsia prowazekii*, l'agent du typhus. Sa taille est de 1,1 Mpb (numéro d'accès AJ235269). Il code 834 protéines potentielles, dont la taille moyenne est de 1 kpb (Andersson *et al.*, 1998). À titre de comparaison, le chromosome bactérien d'*Escherichia coli*, une γ -protéobactérie, code 4289 protéines (Lawrence & Ochman, 1998). Les gènes codant des enzymes de biosynthèses sont particulièrement peu nombreux dans le génome de *Rickettsia prowazekii*, par rapport à ceux d'autres protéobactéries libres, mais ce phénomène est couramment observé dans les génomes de parasites endocellulaires (Andersson *et al.*, 1998).

Dans les bactéries, la transcription est réalisée par une ARN polymérase à quatre sous-unités, $\alpha_2\beta\beta'$, avec un facteur de transcription σ -70. Il reconnaît les promoteurs, constitués de deux hexamères séparés par 17 à 19 nt, appelés "boîte -10" et "boîte -35" en raison de leur position par rapport au site d'initiation de la transcription décrit d'abord chez *E. coli* (Harley & Reynolds, 1987 ; Hawley & McClure, 1983). Le consensus est TTGACA pour la boîte -35, et TATAAT pour la boîte -10.

3.2.2. Caractéristiques générales des génomes mitochondriaux

Les connaissances actuelles sont plus importantes en ce qui concerne les génomes mitochondriaux des animaux. Sur les 140 génomes mitochondriaux accessibles dans les banques de données début août 2000, 112 concernent des animaux. Les 20 % restants sont constitués de 9 membres de la lignée verte, 5 champignons, 3 algues rouges, 3 hétérocontes et 8 flagellés.

3.2.2.1. Les génomes mitochondriaux des animaux

Les génomes mitochondriaux des animaux sont très homogènes. Ils sont généralement circulaires. Leur taille typique est de 16 kpb. À quelques exceptions près, ils contiennent 37 gènes (Boore, 1999 ; Taanman, 1999), les gènes des ARNs de la petite et de la grande sous-unité ribosomique, *nad1* à 6, *nad4L*, *cob*, *cox1* à 3 et *atp6* et 8, ainsi que 22 gènes d'ARNt. L'ordre des gènes, particulièrement bien conservé, est un outil en phylogénie, car les rares réarrangements semblent uniques à certaines lignées. Le code génétique utilisé est généralement modifié. Ces génomes sont compacts, avec une vitesse de mutation très importante. Des phénomènes d'*editing* existent dans les génomes mitochondriaux des animaux, mais ils sont limités à des cas précis. En effet, ils concernent des modifications post-transcriptionnelles des ARNt, décrites avant la découverte de l'*editing*, ainsi que la polyadénylation des ARNm, non spécifique, qui permet la plupart du temps de créer les codons stop. De ce fait, le terme d'*editing* est employé ou non, selon les auteurs (Brennicke *et al.*, 1999), dans le cas des ARN mitochondriaux des animaux. Chez les mammifères, les 22 ARNt codés dans le génome suffisent à la traduction de tous les gènes de protéines. Deux introns de groupe I sont décrits dans un seul génome mitochondrial d'animal, celui de l'anémone de mer (*Metridium senile*, numéro d'accension AF000023, Beagley *et al.*, 1998).

3.2.2.2. Les génomes mitochondriaux des plantes supérieures

Les génomes mitochondriaux des plantes supérieures sont bien caractérisés, bien que seulement deux soient entièrement séquencés (*Arabidopsis thaliana*, 366 923 pb, numéro d'accension Y08501 et Y08502, Unseld *et al.*, 1997 et *Beta vulgaris*, 368 799 pb, numéro d'accension AP000396 et AP000397, Kubo *et al.*, 2000). Ils sont circulaires et de taille très variable, le plus souvent entre 200 et 2 500 kpb (Schuster & Brennicke, 1994). Cette variabilité est principalement due à la présence de répétitions qui engendrent des recombinaisons intramoléculaires, conduisant à la coexistence de plusieurs molécules (André *et al.*, 1992). Dans ce cas, l'estimation de la taille du génome est extrapolée en considérant le cercle "maître" comportant toutes les séquences. Cette taille, beaucoup plus grande des génomes mitochondriaux des plantes par rapport à ceux des animaux, n'est pas explicable seulement par un nombre de gène proportionnellement plus grand. Ils codent plus de gènes (des gènes de protéines ribosomiques en particulier), certes, de l'ordre d'une soixantaine en tout, mais les phénomènes de recombinaisons leur ont fait incorporer des séquences d'ADN plastidial et plus rarement nucléaire (Schuster & Brennicke, 1994). Généralement, de nombreux introns sont présents. La proportion de

séquence *a priori* non codante est très importante dans ces génomes. Le code génétique universel est généralement utilisé, par contre le phénomène d'édition est très important (Brennicke *et al.*, 1999).

3.2.2.3. Les génomes mitochondriaux des champignons

Les génomes mitochondriaux des champignons sont de taille assez variée, entre 20 et 100 kb, de forme circulaire le plus souvent. Les différences de taille sont surtout imputables à l'augmentation de celle des entre-gènes riches en (A+T) et à la présence d'introns qui peuvent être très nombreux (16 dans le gène *cox1* de *Podospora anserina*, Cummings *et al.*, 1990). La présence de petits éléments répétés permet des recombinaisons susceptibles d'être à la base de l'évolution de ces génomes. Ils contiennent généralement à peu près les mêmes gènes que leurs homologues d'animaux, avec en plus des ORFs communes. Leur code génétique est parfois modifié (UGA pour le tryptophane ou UAG pour la leucine). Plusieurs unités de transcription, avec chacune un promoteur (identifiés dans certains cas), sont présentes dans ces génomes (Gray, 1992).

3.2.2.4. Autres génomes mitochondriaux

Dans cette dernière catégorie, des organismes très différents se retrouvent ensemble "par défaut". Il s'agit de ceux des plantes inférieures, des algues et des protistes (au sens restreint d'unicellulaires). Ils sont les plus intéressants en terme d'évolution, puisque se sont les plus primitifs, et donc les plus susceptibles de ressembler à l'ancêtre protéobactérien.

La plupart de ces génomes mitochondriaux sont circulaires, avec une taille comprise entre 6 (*Plasmodium*) et 69 kpb (*Reclinomonas americana*), une 40 kpb en moyenne. Le nombre de gènes est très variable, entre 5 (*Plasmodium*) et 97 (*Reclinomonas americana*). Comme le montrent ces deux exemples, les extrêmes sont très différentes. Dans le cas de *Plasmodium*, le mode de vie (parasite intracellulaire) explique la réduction très importante du génome mitochondrial. *Reclinomonas americana*, par contre, est un organisme libre, un flagellé hétérotrophe vivant dans l'eau douce. Il a le génome mitochondrial le plus complet connu actuellement.

Ces génomes sont généralement assez compacts et leurs entre-gènes sont souvent plus riches en bases adénine et thymine que les gènes. Certains contiennent des introns de groupe I et/ou II, avec ou sans ORFs. Les plus primitifs d'entre eux utilisent le code génétique universel, alors que chez d'autres, UGA code le tryptophane et non pas un stop.

Les gènes présents dans la majorité des génomes mitochondriaux connus sont récapitulés dans le Tableau II.

Tableau II Contenu en gènes de différents génomes mitochondriaux

	Animaux		Champignons			Ciliés		Protistes			Hétérocontes		Hétérocontophytes		Algues rouges		Algues vertes					Plantes				
	<i>Homo sapiens</i>	<i>Metridium senile</i>	<i>Allomyces macrogynus</i>	<i>Neurospora crassa</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	<i>Paramecium aurelia</i>	<i>Tetrahymena pyriformis</i>	<i>Dictyostelium discoideum</i>	<i>Acanthamoeba castellanii</i>	<i>Reclinomonas americana</i>	<i>Cafeteria roenbergensis</i>	<i>Phytophthora infestans</i>	<i>Chrysodidymus synuroideus</i>	<i>Pylaiella littoralis</i>	<i>Cyanidioschyzon merolae</i>	<i>Porphyra purpurea</i>	<i>Chondrus crispus</i>	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	<i>Chlorogonium elongatum</i>	<i>Platymonas subcordiformis</i>	<i>Pedinomonas minor</i>	<i>Prototheca wickerhamii</i>	<i>Nephroselmis olivacea</i>	<i>Marchantia polymorpha</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Beta vulgaris</i>
<i>cox1</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>cox2</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>cox3</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>cox11</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>cob</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>nad1</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>nad2</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>nad3</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>nad4</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>nad4L</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>nad5</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>nad6</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>nad7</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>nad8</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>nad9</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>nad10</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>nad11</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>atp1</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>atp3</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>atp6</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>atp8</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>atp9</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>sdhB</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>sdhC</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>sdh4</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>yejR</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>yejU</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>yejV</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>yejW</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>tufA</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>tatC</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>ymf 39</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

Tableau II
(suite)

	<i>Homo sapiens</i>	<i>Metridium senile</i>	<i>Allomyces macrogynus</i>	<i>Neurospora crassa</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	<i>Paramecium aurelia</i>	<i>Tetrahymena pyriformis</i>	<i>Dicystostelium discoideum</i>	<i>Acanthamoeba castellanii</i>	<i>Reclinomonas americana</i>	<i>Cafeteria roenbergensis</i>	<i>Phytophthora infestans</i>	<i>Chrysodidymus synuroides</i>	<i>Pylaiella littoralis</i>	<i>Cyanidioschyzon merolae</i>	<i>Porphyrha purpurea</i>	<i>Chondrus crispus</i>	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	<i>Chlorogonium elongatum</i>	<i>Platymonas subcordiformis</i>	<i>Pedinomonas minor</i>	<i>Prototheca wickerhamii</i>	<i>Nephroselmis olivacea</i>	<i>Marchantia polymorpha</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Beta vulgaris</i>
<i>rps1</i>																										
<i>rps2</i>																										
<i>rps3</i>																										
<i>rps4</i>																										
<i>rps5</i>																										
<i>rps7</i>																										
<i>rps8</i>																										
<i>rps10</i>																										
<i>rps11</i>																										
<i>rps12</i>																										
<i>rps13</i>																										
<i>rps14</i>																										
<i>rps19</i>																										
<i>rpl1</i>																										
<i>rpl2</i>																										
<i>rpl5</i>																										
<i>rpl6</i>																										
<i>rpl7</i>																										
<i>rpl10</i>																										
<i>rpl11</i>																										
<i>rpl14</i>																										
<i>rpl16</i>																										
<i>rpl18</i>																										
<i>rpl19</i>																										
<i>rpl20</i>																										
<i>rpl27</i>																										
<i>rpl31</i>																										
<i>rpl32</i>																										
<i>rpl34</i>																										
<i>rrn5</i>																										
<i>rns</i>																										
<i>rnl</i>																										
<i>rpnB</i>																										
<i>rpo T7</i>																										
<i>rpo A-D</i>																										

3.3. La transcription et les ARN polymérases

Les mitochondries descendant d'une bactérie, leur génome devrait *a priori* être transcrit par une ARN polymérase de type bactérien, comportant les sous-unités $\alpha_2\beta\beta'$ et le facteur σ -70. Pourtant, c'est une ARN polymérase de type phagique qui a été mise en évidence dans les mitochondries de *Saccharomyces cerevisiae*, fonctionnant avec un facteur de transcription nucléaire (Masters *et al.*, 1987). Le gène nucléaire codant cette enzyme a été isolé et caractérisé chez *Neurospora crassa* Chen *et al.*, 1996 puis chez le chénopode (Hedtke *et al.*, 1997 ; Weihe *et al.*, 1997). Il a été montré que le produit de ces gènes était adressé vers les mitochondries, où il était fonctionnel.

Les quatre gènes des sous-unités de l'enzyme bactérienne ont ensuite été trouvés dans le génome mitochondrial de *Reclinomonas americana* (Lang *et al.*, 1997). À l'heure actuelle, c'est le seul organisme connu dont le génome mitochondrial contient des gènes de ce type.

À titre de comparaison, les génomes plastidiaux codent les différentes sous-unités d'une ARN polymérase bactérienne. Elle transcrit certains gènes plastidiaux, surtout ceux de l'appareil photosynthétique (Allison *et al.*, 1996), en amont desquels des promoteurs peuvent être identifiés. Une autre ARN polymérase de type phagique, à une seule sous-unité, transcrit les autres gènes des génomes plastidiaux (Allison *et al.*, 1996). Elle est codée dans le génome nucléaire, traduite dans le cytoplasme et adressée vers les plastes (Hess & Borner, 1999 ; Ikeda & Gray, 1999).

4. Objectif de la thèse

Les études comparées des génomes mitochondriaux visent à comprendre le phénomène de l'endosymbiose dont ils sont issus et à en étudier les mécanismes. Ils peuvent être l'alternative aux phylogénies nucléaires, surtout dans les cas où celles-ci ne permettent pas de résoudre certaines filiations. Dans un contexte plus appliqué, il est établi que de nombreuses maladies génétiques sont dues à des mutations de gènes mitochondriaux. Il est connu depuis les années 1960 au moins, que les mitochondries sont également impliquées dans des processus liés au vieillissement. Cela fait d'elles un sujet d'études médicales (Cottrell *et al.*, 2000).

Les algues brunes font partie d'une lignée dont le génome mitochondrial n'était absolument pas connu, avant l'étude entreprise sur celui de *P. littoralis*.

L'objectif de mon travail était donc de mener à son terme cette étude et d'initier celle du génome mitochondrial de *L. digitata*. La caractérisation de ces deux molécules devant apporter de nouveaux indices sur les mécanismes de leur évolution.

5. Publications

Les travaux relatés dans ce mémoire ont donné lieu à deux articles publiés :

- Witnessing the evolution of transcription in mitochondria: the mitochondrial genome of the primitive brown alga *Pylaiella littoralis* (L.) Kjellm. encodes a T7-like RNA polymerase. Rousvoal, S., Oudot, M.-P., Fontaine, J.-M., Kloareg, B. & Loiseaux-de Goër, S. (1998). J Mol Biol, 277, 1047-1057 (Annexe 9).
- The mitochondrial *Pylaiella littoralis nad11* gene contains only the N- terminal FeS-binding domain. Oudot, M.-P., Kloareg, B. & Loiseaux-de Goër, S. (1999). Gene, 235, 131-137 (Annexe 10).

Un troisième est soumis :

- The first completely sequenced brown algal mitochondrial genome, from the Ectocarpale *Pylaiella littoralis* (L.) Kjellm. Oudot, M.-P., Fontaine, J.-M., Rousvoal, S., Kloareg, B. & Loiseaux-de Goër, S. (Annexe 11).

Un quatrième est en préparation :

- How does the mitochondrial genome of the evolved brown alga, *Laminaria digitata* compare to that of *Pylaiella littoralis* ? Oudot, M.-P., Kloareg, B. & Loiseaux-de Goër, S.

J'ai également participé à un article de revue, dont plusieurs figures ont illustré ce premier chapitre :

- Origin and evolution of plastids and mitochondria: the phylogenetic diversity of algae. Boyen, C., Oudot, M.-P. & Loiseaux-de Goër, S. (2001). Cahiers de Biologie Marine.

Chapitre II

Matériels et méthodes

Chapitre II. Matériels et méthodes

1. Matériels

Cinq algues brunes ont été utilisées durant cette étude.

Il s'agit d'une part d'algues maintenues en culture au laboratoire : un isolat axénique de *Pylaiella littoralis* de Roscoff, des isolats unialgaux de *Pylaiella littoralis* d'Helgoland et de *Sphacelaria* sp., et d'autre part d'algues prélevées dans le milieu naturel, *Laminaria digitata* et *Fucus serratus*.

1.1. *Pylaiella littoralis* de Roscoff

Pylaiella littoralis est une algue brune de la famille des Ectocarpacées. On la trouve en épiphyte ou en épilithe, dans la zone intertidale. Elle est très commune sur les côtes de la Manche. Elle est constituée de filaments unisériés, à croissance diffuse (Figure 14, page 38). Une souche de cette algue, provenant du chenal de l'Île Verte, à Roscoff, a été rendue axénique (Loiseaux & Rozier, 1978). Depuis, elle est maintenue en culture. Cette souche a été établie à partir d'un filament unique qui portait à la fois des sporocystes uniloculaires en rangée intercalaire (caractéristique du genre *Pylaiella*) et des sporocystes pluriloculaires en position terminale. *A priori*, le filament d'origine était donc diploïde (voir le cycle haplodiplophasique décrit Figure 11, page 21). Depuis plusieurs années, aucun sporocyste uniloculaire n'ayant été observé, la ploïdie des cultures actuelles est inconnue.

Des échantillons de cet isolat axénique sont désormais conservés dans deux collections d'algues sous les références suivantes (suivies du nom et de l'adresse de la collection) :

- SAG 2000, SAG - Culture Collection of Algae at the University of Göttingen (Untere Karspüle 2, D-37073 Göttingen, Germany)
- CCMP 1907, Provasoli - Guillard National Center for Culture of Marine Phytoplankton collection (Bigelow Laboratory for Ocean Sciences, West Boothbay Harbor, ME 04575 U.S.A.)

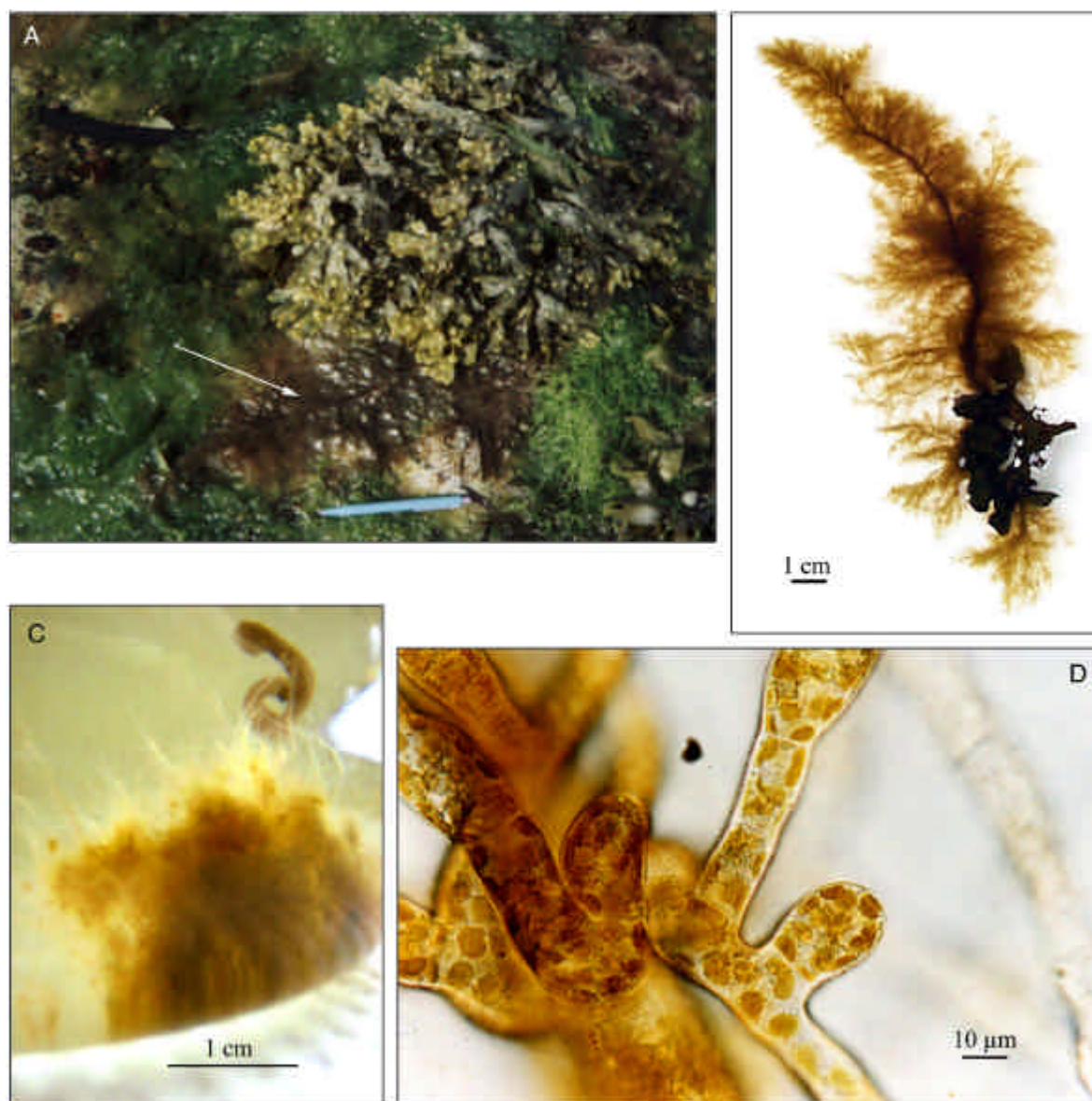


Figure 14 Photographies de *Pylaiella littoralis* à plusieurs échelles

A. Sur la plage, à marée basse (flèche) ; B. Sur un petit *Fucus* ; C. Dans un flacon de culture ; D. Axénique, au microscope optique (photos A-C : M-P. Oudot ; photo D : A. Asensi).

1.2. *Laminaria digitata*

Tout l'ADN de *Laminaria digitata* utilisé dans ce travail a été extrait en juin 1997, à partir d'algues récoltées à l'Ile de Sieck (Santec, Finistère) et maintenues dans des bacs d'eau de mer circulante un ou deux jours en attendant le moment de leur utilisation.

1.3. *Pylaiella littoralis* d'Helgoland

Cet isolat unialgal provient de Dr D. G. Müller (Konstanz, RFA) qui en avait établi la culture à partir d'un fragment végétatif collecté à Helgoland (German Bight).

1.4. *Sphacelaria* sp.

Dr L. Provasoli a confié cet isolat à Susan Loiseaux-de Goër en 1969. La culture était alors axénique mais a été contaminée depuis (Figure 8, page 19). La détermination spécifique n'a jamais été possible car le fragment mis en culture à l'origine ne comportait pas de propagule, organe de reproduction végétative dont la forme est caractéristique des différentes espèces de *Sphacelaria*.

1.5. *Fucus serratus*

L'ADN que j'ai utilisé m'a été donné par Dr F.Y. Bouget et Dr F. Corellou. Ils l'avaient extrait à partir de sperme d'algues récoltées à l'Ile de Sieck (Santec, Finistère).

1.6. La banque d'ADN génomique organitique

Une banque génomique organitique a été réalisée par clonage de fragments de restriction générés par *EcoR1*, *BamH1* et *Sal1*, insérés dans les plasmides pBR325 et pAT153 (Technique du "shotgun", Loiseaux-de Goër *et al.*, 1988, Annexe 3). Par la suite, des sous-clonages furent réalisés par digestion avec *HindIII*, dans le plasmide pBluescript (Annexe3).

2. Méthodes expérimentales

Outre le suivi des cultures, la plupart des méthodes utilisées sont les méthodes de bases de la biologie moléculaire. Avant d'aborder ces différents protocoles, je tiens à préciser deux particularités inhérentes aux modèles étudiés.

2.1. Précisions préliminaires

2.1.1. Polysaccharides et composés phénoliques

Une différence importante entre les modèles les plus souvent étudiés (plantes vertes et champignons) et les algues brunes est leur richesse en polysaccharides et en composés phénoliques. Ils gênent l'extraction des acides nucléiques ainsi que celle des protéines.

En effet, lors du broyage des tissus, les polysaccharides des parois et ceux des vésicules intracellulaires sont libérés, ce qui forme un gel plus ou moins visqueux. Quant

aux composés phénoliques et surtout leurs produits d'oxydation (o- et p-quinones), ils réagissent immédiatement avec les protéines (Loomis, 1974). Les protocoles d'extraction utilisés sont donc souvent différents de ceux utilisés chez les autres modèles qui ne présentent pas ces caractéristiques. Les tampons d'extraction sont plus riches en anti-oxydants, des étapes de précipitation sélective des polysaccharides sont nécessaires. C'est pour cette raison que je détaille plus loin les protocoles d'extraction des acides nucléiques que j'ai utilisés.

2.1.2. Isolement des organites

Contrairement à ce qui se fait habituellement, nos études sont réalisées sans isolement des mitochondries elles-mêmes. Deux raisons expliquent ce fait. D'une part, l'étude du génome mitochondrial de *P. littoralis* a débuté grâce à un quiproquo, d'autre part, les essais d'isolement des mitochondries se sont tous soldés par des échecs.

Les premiers travaux initiés sur un génome organitique de *P. littoralis* concernaient le génome plastidial. Pour cela, un protocole d'isolement des plastes a été mis en place (Dalmon & Loiseaux, 1981 et Annexe 4). Des observations au microscope électronique à transmission de coupes des culots obtenus ont permis de vérifier que les plastes étaient bien isolés, une seule mitochondrie a été observée (Dalmon *et al.*, 1983). La contamination par des mitochondries a également été testée par le dosage de l'activité d'enzymes marqueurs de cet organite, aussi bien pour des mitochondries isolées entières que pour des mitochondries cassées (Succinate déshydrogénase, NADH déshydrogénase et fumarase, Dalmon *et al.*, 1983). Toutefois, il faut noter que les contrôles positifs du dosage de l'activité d'enzymes mitochondriales à partir de culots, qui étaient supposés être enrichis en mitochondries, n'ont pas donné de résultats clairement positifs. Enfin, pour s'assurer de l'absence d'ADNs étrangers co-isolés avec les plastes, ceux-ci ont été incubés en présence d'DNase, avant d'être rompus pour en extraire l'ADN plastidial.

Toutes ces précautions prises, deux types de molécules d'ADN circulaire, de taille différente, étaient observées au microscope électronique à transmission (Dalmon *et al.*, 1983 et Figure 13 page 26). L'étude de l'ADN isolé, par analyse spectrophotométrique de gradients de chlorure de césium sans colorant, a aussi mis en évidence deux populations de molécules de densités proches mais différentes (Dalmon & Loiseaux, 1981). Leurs proportions relatives varient selon les extractions d'ADN et les fractions de densité analysées : de l'ordre de 1 pour 10 jusqu'à 1 pour 1 dans les fractions les plus denses, le rapport global étant de 1 pour 3 (Loiseaux-de Goër, communication personnelle). La même constatation a eu lieu dans le cas d'autres algues, *Sphacelaria* sp. et *Laminaria*

saccharina (respectivement Loiseaux-de Goër S. et Barbeyron T., communications personnelles).

L'analyse de profils de restrictions générés par les trois enzymes de restriction *EcoR1*, *BamH1* et *Sal1* seules ou par deux, à partir d'ADN de plusieurs fractions a donc permis de réaliser les cartes physiques des deux molécules. La plus grande avait une taille estimée de 133 kpb, la plus petite de 58 kpb (Loiseaux-de Goër *et al.*, 1988). L'hybridation d'une sonde correspondant à la séquence entière du gène *cox1* de *Chlamydomonas reinhardtii* n'a révélé aucun des fragments des deux molécules, confirmant une fois de plus l'absence d'ADN mitochondrial (Loiseaux-de Goër *et al.*, 1988). Une banque fut construite par clonage des fragments de restriction générés (Loiseaux-de Goër *et al.*, 1988).

L'étude des deux molécules a commencé par celle des deux gènes de l'ARNr 16S repérés par hybridation (Loiseaux-de Goër *et al.*, 1991 ; Markowicz *et al.*, 1988). Celui de la petite molécule fut considéré comme un pseudogène, à la suite d'un malheureux concours de circonstances (clone chimérique, expliqué dans Fontaine *et al.*, 1995a).

Finalement, le séquençage de gènes typiquement mitochondriaux a conduit à l'évidence que l'ADN mitochondrial avait été cloné (Fontaine *et al.*, 1995a). Il constituait la plus petite des deux molécules clonées, contre toute attente et surtout malgré toutes les précautions prises.

Après coup, le séquençage du gène *cox1* a permis de comprendre pourquoi la sonde ne l'avait pas détecté : il était interrompu par plusieurs grands introns de groupe II (Fontaine *et al.*, 1997). En ce qui concerne les activités d'enzymes mitochondriales, il est possible qu'elles n'aient pas ou peu été détecté en raison de l'effet inhibiteur que peuvent avoir de nombreux flavonoïdes (Loomis, 1974).

Les mitochondries sont donc vraisemblablement isolées en même temps que les plastes. Sont-elles prises dans un réseau membranaire les rendant solidaires des plastes, ont-elles la même densité qu'eux ? Il n'est pas possible de répondre catégoriquement à ces questions.

Outre l'essai d'isolement des mitochondries de *P. littoralis* réalisé pour le test positif du dosage des activités enzymatiques mitochondriales (Dalmon *et al.*, 1983), d'autres tentatives d'isolement de mitochondries d'algues brune (*Laminaria saccharina*, Bruehs, 1991) ou rouge (*Chondrus crispus*, Richard, 1999) ont toutes échoué.

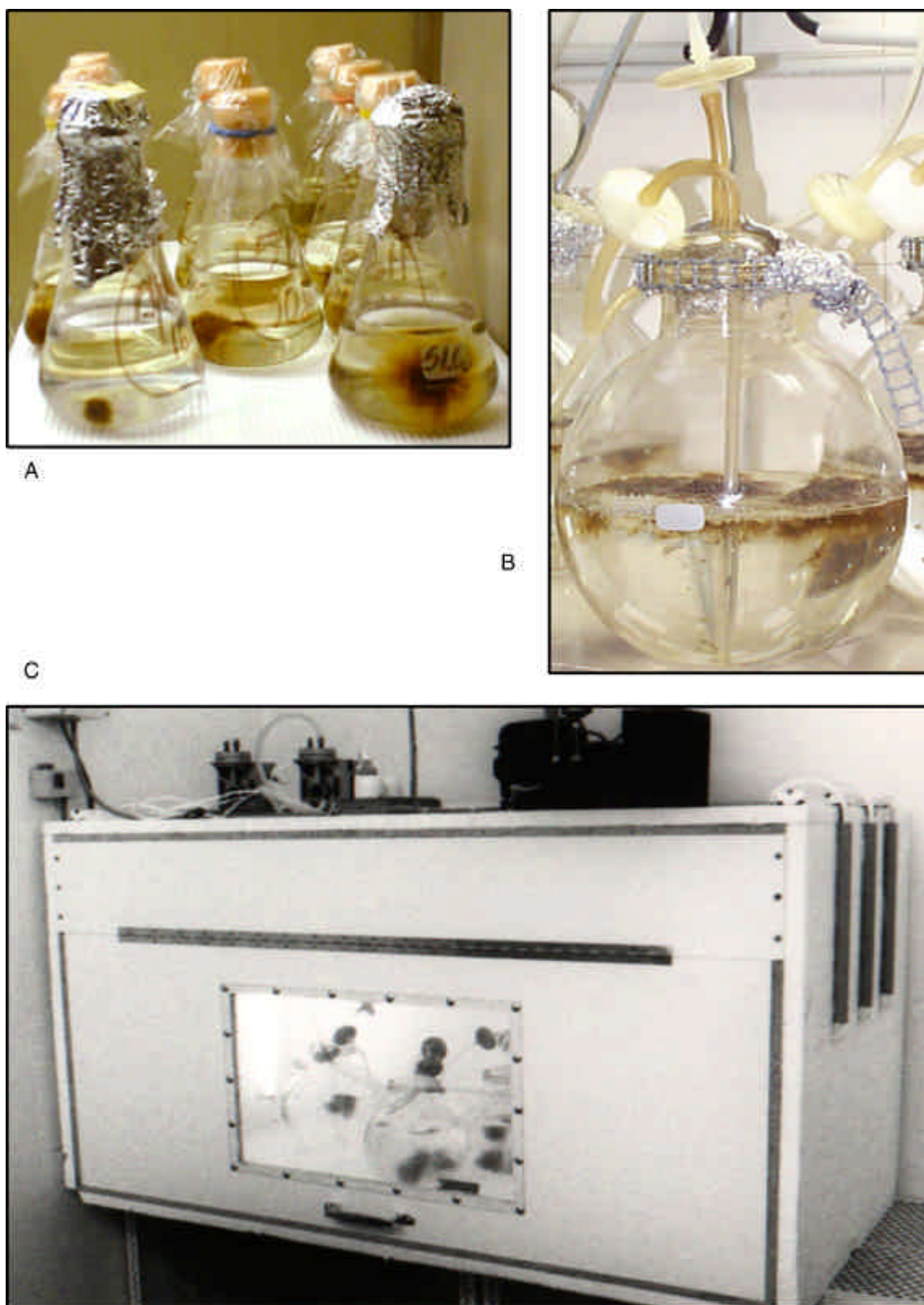


Figure 15 Cultures de *Pylaiella littoralis*

A. Flacons de cultures de maintien (photo MP. Oudot). B. Ballons de cultures pour les extractions (photo M-P. Oudot). C. Enceinte thermostatée pour les cultures à grande échelle (photo S. Loiseaux).

2.2. Les cultures d'algues

2.2.1. Maintien et suivi des cultures

Un milieu de culture a été optimisé afin d'obtenir une croissance de l'algue aussi proche de ce qu'elle est en milieu non axénique Loiseaux & Rozier, 1978. C'est ce milieu qui a toujours été utilisé depuis (Annexe 1), qu'il ait eu pour base de l'eau de mer artificielle (de 1978 à 1989) ou de l'eau de mer du large de Roscoff, depuis 1989.

Toutes les algues cultivées, soit les deux souches de *Pylaiella littoralis*, de Roscoff et d'Helgoland, et l'isolat de *Sphacelaria*, le sont de la même façon. Les précautions prises pour les algues axéniques sont appliquées aux autres algues.

Le contrôle de la stérilité est réalisé par mise en culture de quelques gouttes de milieu de culture des algues sur un milieu gélinifié favorable aux bactéries marines.

Les flacons de culture en verre (Erlenmeyer de 200 ml) sont stérilisés vides, avec leurs bouchons, dans un four Pasteur à 170 °C pendant 1 h. L'eau de mer est filtrée sur membrane Millipore de 0,22 µm et stérilisée dans un autoclave à 120 °C pendant 30 min.

Les flacons sont remplis de 150 ml de milieu enrichi (Figure 15A, page 42 et Annexe 1) sous hotte à flux laminaire. Un test de stérilité est réalisé sur le milieu 5 jours au moins après le remplissage. Si le test est négatif après une semaine, le flacon est utilisé. Les repiquages ont lieu une fois par mois, avec division de l'algue quand celle-ci atteint une taille trop importante pour le volume dont elle dispose, afin d'éviter que les algues ne "dégénèrent". Un test de stérilité est ensuite réalisé sur le milieu usagé. Les algues sont maintenues à une température de 12-14 °C, avec une photopériode de 12 h/12 h, en lumière artificielle.

2.2.2. Cultures pour extractions

Pour les isollements d'organites et les extractions d'acides nucléiques de la souche roscovite de *Pylaiella littoralis*, des cultures plus importantes sont réalisées dans des ballons de 5 l, contenant de 2 à 3 l de milieu. La température est alors de 14-15 °C et un système de bullage d'air filtré (stérile) dans le milieu permet le maintien des algues en suspension (Figure 15 B et C, page 42). Les ballons sontensemencés avec des fragments d'algues dont le milieu a été changé une semaine auparavant, afin d'avoir un matériel en phase de croissance active. Les algues sont ainsi cultivées 3 à 4 semaines avant utilisation.

2.3. Isolement des organites

Ce protocole d'isolement des organites est celui qui a été mis en place par Dalmon & Loiseaux, 1981 afin d'isoler les plastides, comme je l'ai expliqué en avant propos. Je l'ai utilisé lors de mes expériences sur les protéines mitochondriales de *P. littoralis*, en partant du principe que les mitochondries étaient co-purifiées avec les plastides.

Les filaments de *P. littoralis* sont brossés sur du Velcro (côté rugueux), avec une brosse à dents, dans un tampon isotonique (Annexe 1, page 135), afin de provoquer l'éclatement des cellules, mais pas celui des organites. Des filtrations sur Blutex 10 μ m et des centrifugations permettent de séparer les noyaux et les débris cellulaires des organites (Annexe 4, page 136).

2.4. Extraction des acides nucléiques des algues brunes

Le protocole d'extraction des acides nucléiques que j'ai utilisé a été adapté de Apt (1993). Il permet d'obtenir des acides nucléiques assez purs, en quantités de l'ordre de plusieurs microgrammes, utilisables pour les hybridations d'ADN et d'ARN transférés sur membranes ("Southern blot" et "northern blot", respectivement) et les amplifications d'ADN complémentaire (RT-PCR) par exemple. Le tampon d'extraction contient du CTAB pour précipiter les polysaccharides.

Les algues sont rapidement égouttées sur un papier absorbant, avant d'être congelées à l'azote liquide puis finement broyées au mortier, avec du sable de Fontainebleau stérile. Elles sont alors mises dans un tampon d'extraction (100 mM TRIS-HCl pH 8.0, 1,5 M NaCl, 20 mM EDTA, 20 mM DTT et 2 % CTAB) à raison d'un gramme pour 10 ml. La solution est alors agitée doucement à température ambiante pendant 15 min. Une extraction au chloroforme - alcool isoamylique (24 : 1) est suivie d'une centrifugation de 30 min à 10 000 g. Les polysaccharides sont alors précipités par l'addition lente et sous agitation douce, de 0,33 volume d'éthanol 100 % à la phase aqueuse. Une seconde extraction au chloroforme - alcool isoamylique (24 : 1) permet d'éliminer les polysaccharides précipités. Une centrifugation de 30 min à 10 000 g est alors réalisée avant de récupérer la phase aqueuse.

De cette solution d'acides nucléiques ainsi obtenue sont extraits soit les différentes molécules d'ADN soit les ARNs.

2.4.1. ARNs

Il s'agit d'une précipitation au chlorure de lithium, suivie de plusieurs étapes de purifications.

La phase aqueuse précédemment obtenue est amenée à 3,0 M LiCl et 1% β -mercaptoéthanol pour précipiter les ARNm et les ARNt durant une nuit à -20 °C. Une centrifugation de 30 min à 10 000 g (4 °C) permet de récupérer les ARNs qui sont alors solubilisés dans du TE-DEPC. Une première étape de purification consiste en une extraction avec un volume de phénol-chloroforme (1 : 1), suivie d'une centrifugation (10 000 g, 20 min à 4 °C). Une nouvelle extraction au chloroforme-alcool isoamylique (24 : 1) est alors réalisée, toujours suivie d'une centrifugation (10 000 g, 20 min à 4 °C) pour bien séparer les deux phases. La phase aqueuse amenée à 0,3 M d'acétate de sodium est enfin précipitée avec 2 volumes d'éthanol absolu. Après centrifugation (10 000 g, 20 min à 4 °C), les ARNs sont repris dans de l'eau DEPC.

2.4.2. ADN

La précipitation de l'ADN total peut ou non être suivie d'étapes de purifications, selon la qualité requise pour les expériences qui suivront.

La solution d'acides nucléiques aqueuse obtenue en Chapitre II.2.4, page 44 est précipitée par un volume d'isopropanol, 4 h à température ambiante. Une centrifugation de 30 min à 10 000 g (4 °C) permet de récupérer l'ensemble des acides nucléiques qui sont alors solubilisés dans du TE. Des ARNs sont encore présents à ce stade (les ARNt surtout peuvent être visualisés sur gel d'agarose natif), mais ils sont rapidement dégradés par les conditions d'utilisation de l'ADN ou par des RNases contaminantes.

L'ADN ainsi obtenu peut être utilisé comme matrice pour réaliser des PCR, par exemple. C'était le cas de l'ADN de *Pylaiella littoralis* d'Helgoland et de celui de *Sphacelaria sp.* que j'ai utilisé.

Une étape de purification de l'ADN peut être réalisée par un gradient isopycnique de chlorure de césium, qui permet d'éliminer les ARNs coprecipités avec l'ADN et d'éventuelles protéines contaminantes.

La confection d'un gradient bicouche (c'est à dire préétabli) permet de réduire la centrifugation à une nuit, par rapport à l'utilisation d'un gradient dit mono couche, qui nécessite une centrifugation de deux jours, pour l'établissement du gradient de densité. Si un gradient bicouche est abîmé, lors du scellage du tube par exemple, il peut donc être rattrapé par une centrifugation plus longue. Le BEt (bromure d'éthidium) est un sel qui

s'intercale entre les paires de bases d'ADN. Sous UV, il permet de visualiser l'ADN car sa fluorescence naturelle est alors accentuée.

- Gradient préétabli :

La solution d'ADN est amenée à 3,4 M CICs et 600 $\mu\text{g/ml}$ BEt ; une solution à 5,8 M CICs est réalisée avec du TE. Les deux couches sont coulées délicatement dans un tube à sceller. La centrifugation à 50 000 g est réalisée à 20 °C, pendant une nuit.

- Gradient mono-couche :

La solution d'ADN est amenée à 4,5 M CICs et 600 $\mu\text{g/ml}$ BEt puis coulée délicatement dans un tube à sceller. La centrifugation à 50 000 g est réalisée à 20 °C, pendant 48 h.

La couche contenant l'ADN est prélevée à l'aide d'une seringue, sous UV (Figure 16A, page 47). Le BEt en est enlevé par des lavages successifs au butanol saturé en eau, puis l'ADN est précipité par deux volumes d'éthanol absolu et une centrifugation à 10 000 g, 30 min à 4 °C.

Une autre étape permet de séparer l'ADN total selon sa composition relative en bases (A+T) et (C+G). L'ADN bactérien a une plus grande proportion de bases A et T que l'ADN nucléaire des lignées algales. Les ADN des organites, plastes et mitochondries, ont conservé cette caractéristique. Le Hoechst n° 33258 (bis-Benzimide) est une protéine qui se fixe préférentiellement sur les molécules d'ADN riches en bases adénine et thymine, ce qui les allège préférentiellement. Cette propriété en fait un colorant utile de l'ADN. Dans notre cas, il permet de différencier l'ADN nucléaire de l'ADN des organites. Dans un gradient de densité de chlorure de césium, plus précis que celui utilisé avec le BEt, le Hoechst permet la séparation de l'ADN organitique de l'ADN nucléaire par diminution de sa densité relative, en accentuant ainsi la différence de densité selon la proportion de bases A et T.

La solution d'ADN est amenée à 5,4 M CICs (densité de 1,66) et 37 mg/ml de Hoechst. Elle est coulée dans un tube à centrifugation de 2 ml. L'ultra-centrifugation à 90 000 g est conduite sur la nuit, à 20 °C (Figure 16B, page 47). Le prélèvement et les lavages sont réalisés comme précédemment.

La séparation ainsi obtenue n'est pas totale et la précision du prélèvement est aussi un facteur limitant, c'est pourquoi il faut considérer cette étape comme un enrichissement en ADN organitique.

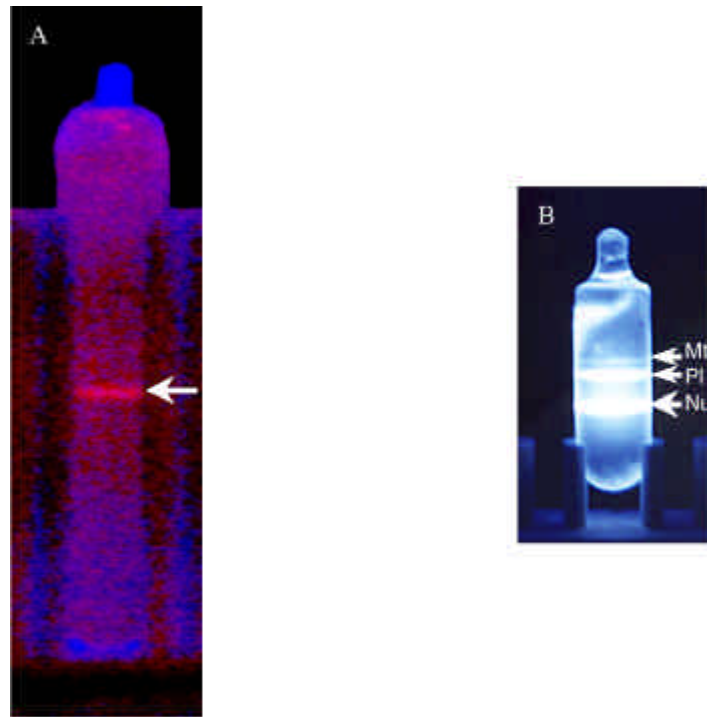


Figure 16 **Gradients isopycniques de chlorure de césium observés sous UV**

A. Gradient avec bromure d'éthidium. B. Gradient avec Hoechst. Mt : ADN mitochondrial ; Pl : ADN plastidial ; Nu : ADN nucléaire.

2.5. Extraction de l'ADN plasmidique des bactéries

L'extraction de l'ADN plasmidique des clones bactériens de la banque d'ADN organitique est réalisée sur des cultures d'une nuit à 37 °C sous agitation, dans 5 ml de milieu de Luria Bertani liquide (Annexe 2), en présences des antibiotiques adéquats (Annexe 4).

L'extraction consiste en une précipitation sélective de l'ADN chromosomique et des protéines d'un lysat de bactéries, seul l'ADN plasmidique reste soluble dans le surnageant, à partir duquel il ensuite précipité (méthode de Birnboim & Doly, 1979). Afin de purifier l'ADN ainsi obtenu, un kit a été utilisé (Annexe 5). Il s'agit d'une purification par affinité sur des billes de Sephaglas FP.

2.6. Méthodes d'études de l'ADN

2.6.1. Clonage

A partir de clones de la banque précédemment citée (Chapitre II.1.6, page 39), des sous-clonages ont été réalisés selon les protocoles classiques décrits dans Sambrook *et al.*, 1989.

2.6.2. PCR

L'amplification par PCR a servi à réaliser les sondes utilisées pour les hybridations en Southern et en northern, ainsi qu'à vérifier les jonctions entre des fragments clonés de *P. littoralis* de Roscoff. C'est la technique que nous avons également retenue pour l'étude de régions particulières du génome mitochondrial de *Laminaria digitata* et d'autres algues.

L'ADN polymérase *Tfl* (Promega) a permis d'obtenir les sondes, alors que les amplifications de comparaison ont été réalisées avec des billes prêtes à l'emploi, comprenant le tampon, les dNTP et l'enzyme (Ready-to-Go, Amersham Pharmacia Biotech). Un kit comprenant un mélange de polymérases a permis l'amplification de fragments de plus de 5 kpb (Expand Long Template PCR System, Roche), afin de couvrir l'ensemble du génome mitochondrial de *Laminaria digitata*.

Les conditions utilisées sont celles recommandées par les fabricants. Il a parfois été nécessaire de moduler la concentration en ions magnésium pour optimiser les résultats.

La température d'hybridation est déterminée par la formule :

$2 \times (\text{nombre de A+T}) + 4 \times (\text{nombre de G+C}) + 4$, pour un premier essai, puis elle est augmentée ou diminuée si le résultat obtenu n'est pas satisfaisant. Cette formule s'applique à des oligomères de l'ordre d'une vingtaine de nucléotides.

Les amorces utilisées sont soit spécifiques, quand la séquence d'ancrage est connue, soit dégénérées, quand elles sont déterminées à partir d'alignements de séquences protéiques homologues. Dans ce cas, je me suis efforcée à limiter le niveau de dégénérescence à 128. Des inosines ont parfois été utilisées. La taille des amorces utilisées varie de 17 à 23 nucléotides.

2.6.3. Séquençage

Toutes les séquences publiées ont été séquencées au minimum dans les deux sens. Dans les cas où les lectures n'étaient pas belles, le séquençage a été refait jusqu'à obtention d'un résultat correct. De nombreuses méthodes de séquençage ont été utilisées, étant donné la longueur de la période pendant laquelle le travail entier a été effectué.

J'ai moi-même utilisé trois types différents de séquençage cyclique, basés sur la méthode de terminaison des fragments établie par Sanger *et al.*, 1977) au cours de ma thèse. Dans le Tableau III, j'ai fait la comparaison entre ces différentes méthodes.

Tableau III Comparaison des différents kits de séquençage utilisés

	Avantages	Inconvénients
T ⁷ Sequencing™ Kit (Pharmacia)		• Marquage radioactif • Marquage par incorporation de [$\alpha^{33}\text{P}$]-ATP : zone de compression • Pas cyclique : beaucoup de matrice nécessaire
Thermo Sequenase pre-mixed cycle sequencing kit (Vistra)	• Non radioactif (fluorochrome) • Rapidité de mise en oeuvre : très peu de pipetages à faire • Séquençage cyclique : nécessite peu de matrice • Avec séquenceur automatique : un seul dépôt par réaction	• Emploi d'amorces marquées • Marquage d'amorce cher : pas utilisable pour de la marche sur le chromosome, mais seulement pour des amorces universelles de plasmides
Thermo Sequenase radiolabeled terminator cycle sequencing kit (Amersham)	• Séquençage cyclique : nécessite peu de matrice • Marquage par incorporation de [$\alpha^{33}\text{P}$]-ddNTP : limite les zones de compression • Possibilité d'emploi d'inosine à la place des dGTP : limite les zones de compression • Utilisable pour marche sur le chromosome	• Marquage radioactif • Gel manuel : plusieurs dépôts par réaction pour lecture longue

2.6.4. Clonage par PCR inverse

Cette technique a été utilisée par S. Rousvoal pour cloner une région qui était absente de la banque organitique. Elle est décrite dans l'article 1 (Annexe 9, Rousvoal *et al.*, 1998).

2.6.5. Hybridation sur ADNs transférés sur membrane (Southern blot)

La migration est réalisée dans du TAE 0,5 X, selon les méthodes classiques (Sambrook *et al.*, 1989). Les conditions de dénaturations et de transfert sont indiquées dans Rousvoal *et al.*, 1998, .

2.7. Méthodes d'études des ARNs

2.7.1. Hybridation sur ARNs transférés sur membrane (northern blot)

Deux systèmes de marquage et de révélation ont été utilisés. Le premier utilise un marquage aléatoire de la sonde par des nucléotides couplés à de la fluorésceine (ECL™

Random Prime Labelling System, Amersham), et un anticorps anti-fluorésceine couplé à une phosphatase alcaline. La révélation fait intervenir un substrat de l'enzyme qui produit une luminescence impressionnant un film d'autoradiographie, le CDP-Star (Gene Images CDP-Star detection module, Amersham). Les indications du fabricant ont été suivies. Le second est un marquage radioactif par incorporation de $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ dans la sonde nucléotidique (Megaprime™ DNA Labelling System, Amersham). L'hybridation et les lavages ont été réalisés selon le protocole décrit dans Weihe *et al.*, 1997.

La première technique a donné des résultats faibles qui nous ont conduit à revenir à la méthode radioactive, plus sensible.

2.7.2. Amplification d'ADNc (RT-PCR)

Quand les transcrits recherchés n'étaient pas détectables par hybridation sur transfert d'ARN, j'ai eu recours à la RT-PCR (Article 1, Rousvoal *et al.*, 1998, Annexe 9, et Article 2, Oudot *et al.*, 1999, Annexe 10).

2.8. Méthodes d'études des protéines

2.8.1. Extraction des protéines

J'ai mis au point une méthode d'extraction des protéines de *P. littoralis* à partir des organites isolés, en me basant sur Corellou *et al.*, 2000b. Le protocole détaillé est en Annexe 6.

2.8.2. Migration et transfert des protéines sur membrane

L'ensemble des protocoles utilisé est en Annexe 7.

2.8.3. Immunodétection

J'ai utilisé deux méthodes (selon les indications des fournisseurs), de sensibilités différentes : le kit ECL (*Western blotting reagents*, Amersham) avec lequel l'anticorps secondaire est couplé à une peroxydase dont le produit impressionne un film d'autoradiographie et un kit de substrat pour phosphatase alcaline (Bio-Rad) pour lequel l'enzyme est aussi couplée à un anticorps secondaire, mais cette fois le produit colore la membrane.

2.8.3.1. Contrôles positifs

Il s'agit de dépôts de dilutions croissantes (5 pg, 50 pg, 5 ng, 50 ng et 100 ng) sur membrane Hybond ECl (Amersham), des peptides ayant servi pour l'obtention des anticorps, ainsi que de la BSA.

2.8.3.2. Contrôles négatifs

Les sérums préimmuns ont été testés (utilisés comme anticorps primaires), ainsi que l'anticorps secondaire de la méthode de détection à la phosphatase alcaline (utilisé sans anticorps primaire).

3. Traitement des séquences

Pour la manipulation des séquences obtenues par séquençage, j'ai utilisé MacMolly (sur MacInTosch) et DNAMAN (sur PC). Ils permettent tous deux d'obtenir les séquences complémentaires, de rechercher les cadres ouverts de lecture (ORF, pour *Open Reading Frame*), de traduire les séquences nucléiques en acides aminés, de faire des cartes de restrictions théoriques et de faire des comparaisons entre séquences.

L'identification des régions codantes est réalisée par Gapped BLAST (Altschul *et al.*, 1990 ; Altschul *et al.*, 1997 le plus souvent, surtout pour les gènes codant des protéines. Les gènes des ARNt sont repérés par la présence du motif conservé GTTCRANCYC, et confirmés par la vérification du repliement selon le modèle en feuille de trèfle.

Les alignements utilisés sont ajustés à l'œil.

L'ensemble de programmes PHYLIP (version 3.5c) nous a servi pour réaliser les analyses phylogénétiques sur une station Unix. Les arbres de parcimonie sont réalisés par les programmes DNAPARS ou PROTPARS. Les matrices de distances sont réalisées par DNADIST (d'après le modèle à deux paramètres de Kimura) ou PROTDIST (d'après la matrice de Dayhoff), puis analysées par la méthode du plus proche voisin (*Neighbour-joining*). La solidité des branches est testée par analyse de *Bootstrap*, par SEQBOOT.

Chapitre III

Résultats commentés

Chapitre III. Résultats commentés

1. Le génome mitochondrial de *Pylaiella littoralis*

Quand j'ai commencé mon travail en 1996, la carte du génome mitochondrial de *P. littoralis* était en partie établie. Une zone en particulier restait inconnue, celle qui était absente de la banque (Figure 17, page 54). J'ai terminé le séquençage dans les deux sens pour la molécule entière, ce qui m'a permis d'analyser l'ensemble du génome, et de le comparer à d'autres génomes mitochondriaux.

Il s'agissait également de vérifier la transcription de certains gènes.

Ce travail a donné lieu à trois articles. Les deux premiers concernent des régions particulières (Rousvoal *et al.*, 1998, Annexe 9 et Oudot *et al.*, 1999, Annexe 10). Le troisième est un article de synthèse de tous les résultats obtenus sur le génome mitochondrial de *P. littoralis* (Oudot *et al.*, soumis, Annexe 11). Certaines figures de ces différents articles illustrent ce chapitre.

1.1. Présentation générale

Le génome mitochondrial de *P. littoralis* consiste en une molécule d'ADN circulaire double brin. Elle a été observée au microscope (Dalmon & Loiseaux, 1981). Sa taille, de 58 507 pb, est très proche de celle estimée lors de son clonage (58 kpb, Loiseaux-de Goër *et al.*, 1988). Son contenu moyen en A+T est de 62,0 %.

Soixante dix-neuf séquences codantes putatives (Tableau IV et V pages 55-57, Figure 18 page 56 et Figure 22 page 58) ont été identifiées. La majorité est codée par un brin, seul un groupe de 4 gènes de protéines ribosomiques et un ORF d'une part, et un gène seul, *tatC*, d'autre part, sont codés par l'autre brin. Une partie de cette molécule est de toute évidence d'origine non mitochondriale. Il s'agit d'une région encadrée par un jeu complexe de répétitions inverses, qui comprend un gène d'ARN polymérase de type phagique.

Je traiterai dans un premier temps de la partie proprement mitochondriale, puis, dans un second temps, de cette insertion.

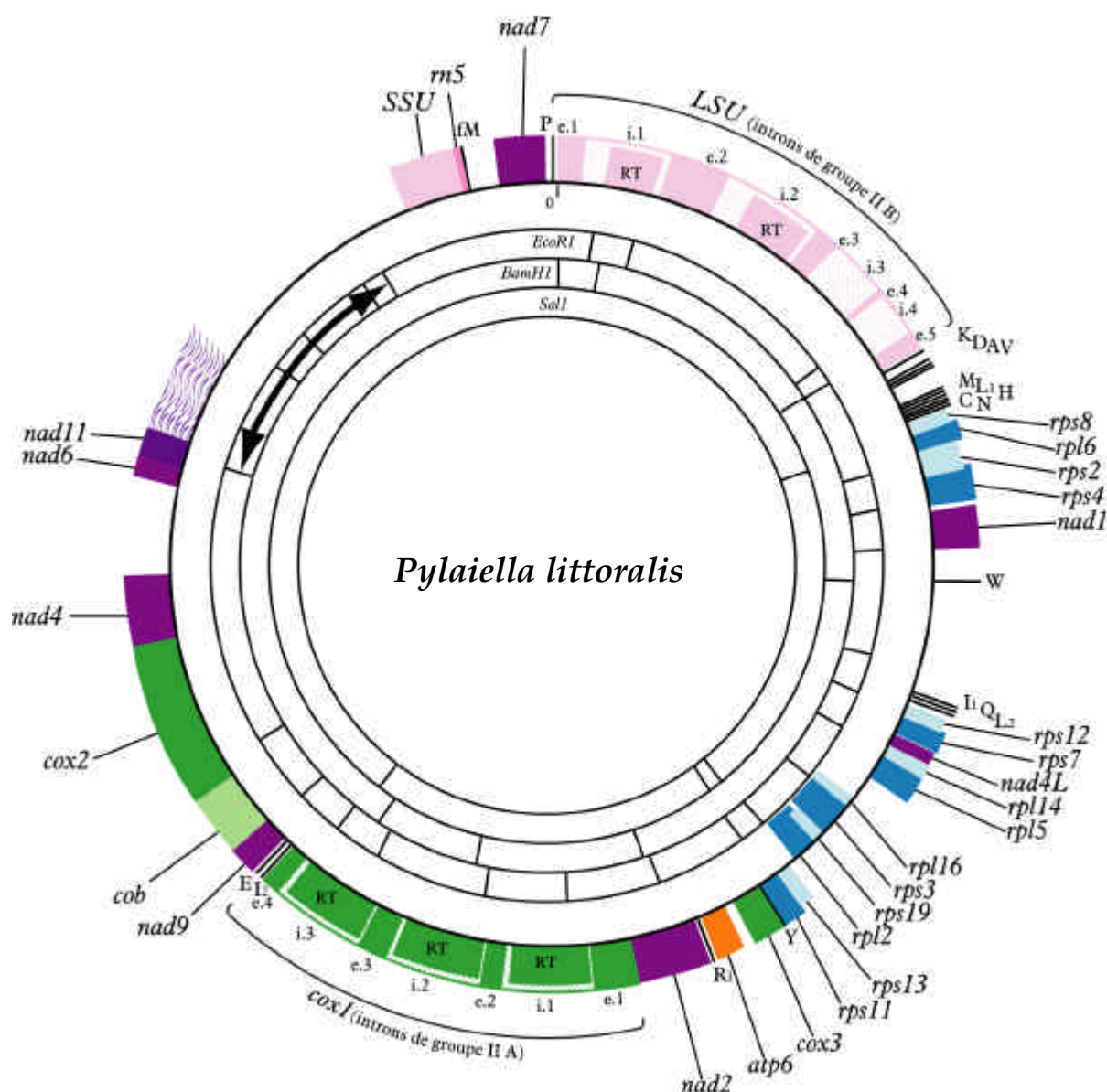


Figure 17 Carte génique et de restriction du génome mitochondrial de *Pyraliella littoralis* au début du travail présenté

Les gènes, exons (e.) et les ORFs sont représentés par des blocs pleins, et les introns (i.) par des pointillés. Les gènes représentés sur le cercle extérieur sont transcrits dans le sens des aiguilles d'une montre et inversement pour ceux représentés dans le cercle intérieur. Des blocs de hauteurs différentes permettent de voir les chevauchements de gènes. Les *trn* sont représentés par des barres noires, avec la lettre de l'acide aminé correspondant. Les sites de restriction des enzymes *EcoRI*, *BamHI* et *SalI* sont montrés sur les cercles internes. La double flèche indique la zone absente de la banque. Des vaguelettes prolongent le *nad11* tel qu'il était supposé.

Tableau IV Les gènes identifiés dans le génome mitochondrial de *P. littoralis*

: voir Figure 22, page 63 pour plus de détails. *: synonymes mitochondriaux d'*atp8* : *atpx* *Rickettsia prowazekii*, *ymf19*, ORF172 *Marchantia polymorpha*, ORF234.2 *Prototheca wickerhamii*, ORF137 *Chondrus crispus*, ORF142 *Acanthamoeba castellanii*. **ORFs mitochondriaux synonymes de *tatC* : ORF262 *Chondrus crispus*, ORFx des angiospermes, ORF244 *Marchantia polymorpha*, ORF234.1 *Prototheca wickerhamii*, ORF260 *Reclinomonas americana*. ORFs plastidiaux synonymes de *tatC* : *ycf43*, ORF263 *Odontella sinensis*, ORF254 *Porphyra purpurea*.

A. Gènes d'ARNs ribosomiaux (3)

rns (ARNr 16S), *rnl* (ARNr 23S), *rnr5* (ARNr 5S)

B. Gènes d'ARN de transfert (24)#

C. Gènes de protéines ribosomiques (17)

Petite sous-unité (11)

rps2, *rps3*, *rps4*, *rps7*, *rps8*, *rps10*, *rps11*, *rps12*, *rps13*, *rps14*, *rps19*

Grande sous-unité (6)

rpl2, *rpl5*, *rpl6*, *rpl14*, *rpl16*, *rpl31*

D. Gènes des protéines de la chaîne respiratoire et des phosphorylations oxydatives (17)

Chaîne respiratoire (14)

NADH déshydrogénase: *nad1*, *nad2*, *nad3*, *nad4*, *nad4L*, *nad5*, *nad6*, *nad7*, *nad9*, *nad11*

apocytochrome b: *cob*

cytochrome oxydase: *cox1*, *cox2*, *cox3*

complexe ATP synthase (3)

F0-ATPase: *atp6*, *atp8**, *atp9*

E. ORFs affiliés à des transcriptases réverses d'introns de groupes II (5)

ORF557 (dans l'intron 1, de groupe IIB du gène *rnl*)

ORF568 (dans l'intron 2, de groupe IIB du gène *rnl*)

ORF757 (dans l'intron 1, de groupe IIA du gène *cox1*)

ORF795 (dans l'intron 2, de groupe IIA du gène *cox1*)

ORF748 (dans l'intron 3, de groupe IIA du gène *cox1*)

F. Autres gènes codant des protéines (2)

rpo (polymérase de type phagique)

*tatC*** (*ymf16*)

G. ORFs uniques à l'ADN mitochondrial de *Pylaiella littoralis* (11)

ORF31	ORF39	ORF64	ORF97	ORF121	ORF127
ORF132	ORF224	ORF233	ORF237	ORF261	

Tableau V Tableau analytique de l'ensemble de la molécule

Les colonnes de 2 à 8 indiquent le nombre de nucléotides par catégories (voir en-têtes) alors que dans les colonnes 9 à 13 il s'agit des coordonnées des 1^{ers} et derniers nucléotides des gènes, le début du gène de l'ARNr 23S est pris comme origine. Les grisés verticaux aident à suivre les colonnes, alors que les horizontaux signalent les gènes codés sur le second brin. La région du gène de l'ARN polymérase est indiquée en caractères gras.

Gènes	Chevauchement	Entre-gène	Nombre de nt codant des acides aminés	Nombres d'acides aminés codés	Nombre de nt faisant partie d'un intron (partie avant l'ORF le cas échéant)	Nombre de nt codant un gène ARN	Nombre de nt faisant partie d'un intron (partie après l'ORF le cas échéant)	Coordonnées du 1 ^{er} nt du gène	Coordonnées du 1 ^{er} nt après l'intron	Coordonnées du 1 ^{er} nt après le gène codant une protéine	Coordonnées du 1 ^{er} nt après l'intron	Coordonnées du 1 ^{er} nt après le gène codant un ARN
<i>rnl e1</i>						542		1				542
<i>rnl i1</i>			1674	557	607		130	542	1149	2823	2953	
<i>rnl e2</i>						1099		2953				4052
<i>rnl i2</i>			1707	568	611		117	4052	4663	6370	6487	
<i>rnl e3</i>						644		6487				7131
<i>rnl i3</i>					1171			7131	8302			
<i>rnl e4</i>						58		8302				8360
<i>rnl i4</i>					965			8360	9325			
<i>rnl e5</i>						352		9325				9677
<i>trnK</i>		15				73		9692				9765
<i>trnD</i>		151				72		9916				9988
<i>trnA</i>		69				72		10057				10129
<i>trnV</i>		17				71		10146				10217
<i>atp9</i>		57	228	75				10274		10502		
<i>trnM</i>		60				72		10562				10634
<i>trnL1</i>		9				82		10643				10725
<i>trnH</i>		9				73		10734				10807
<i>trnC</i>		3				72		10810				10882
<i>trnN</i>		1				72		10883				10955
<i>trnF</i>		35				72		10990				11062
<i>rps8</i>		9	378	125				11071		11449		
<i>rpl6</i>	4		492	163				11445		11937		
<i>rps2</i>	1		612	203				11936		12548		
<i>rps4</i>	11		798	265				12537		13335		
<i>nad1</i>		42	981	326				13377		14358		
<i>tatC</i>	24		735	244				14334		15069		
<i>trnV</i>		11				72		15080				15152
ORF261		545	786	261				15697		16483		
ORF237		12	714	237				16495		17209		
ORF97		68	294	97				17277		17571		
<i>trnI2</i>		240				72		17811				17883
<i>trnQ</i>		13				71		17896				17967
<i>trnL2</i>		2				81		17969				18050
<i>rps12</i>		1	387	128				18051		18438		
<i>rps7</i>	7		498	165				18431		18929		
<i>nad4L</i>		22	303	100				18951		19254		
<i>rpl14</i>		92	387	128				19346		19733		
<i>rpl5</i>		7	555	184				19740		20295		
<i>trnG</i>	10					72		20285				20357
ORF127		17	384	127				20374		20758		
<i>rpl16</i>	1		414	137				20757		21171		
<i>rps3</i>		11	822	273				21182		22004		
<i>rps19</i>		0	267	88				22004		22271		
<i>rpl2</i>	14		765	254				22257		23022		

Tableau V (suite)

Gènes	Chevauchement	Entre-gène	Nombre de nt codant des acides aminés	Nombres d'acides aminés codés	Nombre de nt faisant partie d'un intron (partie avant l'ORF le cas échéant)	Nombre de nt codant un gène ARN	Nombre de nt faisant partie d'un intron (partie après l'ORF le cas échéant)	Coordonnées du 1 ^{er} nt du gène	Coordonnées du 1 ^{er} nt après l'intron	Coordonnées du 1 ^{er} nt après le gène codant une protéine	Coordonnées du 1 ^{er} nt après l'intron	Coordonnées du 1 ^{er} nt après le gène codant un ARN
<i>rps13</i>		22	360	119				23044		23404		
<i>rps11</i>	11		465	154				23393		23858		
<i>trnY</i>		11				80		23869				23949
<i>cox3</i>		13	819	272				23962		24781		
<i>atp6</i>		143	747	248				24924		25671		
<i>trnR</i>		57				72		25728				25800
<i>nad2</i>		5	1485	494				25805		27290		
<i>cox1 e1</i>		10	817	272				27300		28117		
<i>cox1 i1</i>			2274	757	31		129	28117	28148	30422	30551	
<i>cox1 e2</i>			87	29				30551		30638		
<i>cox1 i2</i>			2388	795	42		100	30638	30680	33068	33168	
<i>cox1 e3</i>			312	104				33168		33480		
<i>cox1 i3</i>			2247	748	38		120	33480	33518	35765	35885	
<i>cox1 e4</i>			371	123				35885		36256		
<i>trnI1</i>		27				71		36283				36354
<i>trnE</i>		8				71		36362				36433
<i>nad9</i>		30	573	190				36463		37036		
<i>cob</i>	1		1152	383				37035		38187		
<i>cox2</i>		43	450	150				38230		38680		
<i>cox2 insert</i>			3018	1006				38680		41698		
<i>cox2</i>			381	126				41698		42079		
<i>nad4</i>	10		1449	482				42069		43518		
<i>trnR</i>		18				87		43536				43623
<i>nad5</i>		5	1986	661				43628		45614		
<i>nad6</i>	16		669	222				45598		46267		
<i>nad11</i>		2	630	209				46269		46899		
<i>nad3</i>	13		363	120				46886		47249		
<i>rps14</i>	4		291	96				47245		47536		
<i>atp8</i>		63	168	55				47599		47767		
<i>trnS1</i>		96				83		47863				47946
<i>rps10</i>		6	345	114				47952		48297		
<i>rpl31</i>		130	210	69				48427		48637		
<i>trnS2</i>		93				85		48730				48815
<i>rpo</i>		257	2475	824				49072		51547		
ORF233		632	702	233				52179		52881		
ORF121		0	366	121				52881		53247		
ORF132	4		399	132				53243		53642		
ORF64	1		195	64				53641		53836		
ORF39		120	120	39				53956		54076		
ORF31		444	96	31				54520		54616		
<i>rns</i>		160				1519		54776				56295
<i>rns5</i>		4				107		56299				56406
<i>trnfM</i>	3					74		56403				56477
ORF224		4	675	224				56481		57156		
<i>nad7</i>		11	1197	398				57167		58364		
<i>trnP</i>		27				71		58391				58462
<i>rnl</i>		45						58507				
Totaux	135	4004	44463		3465	6114	596	58507				

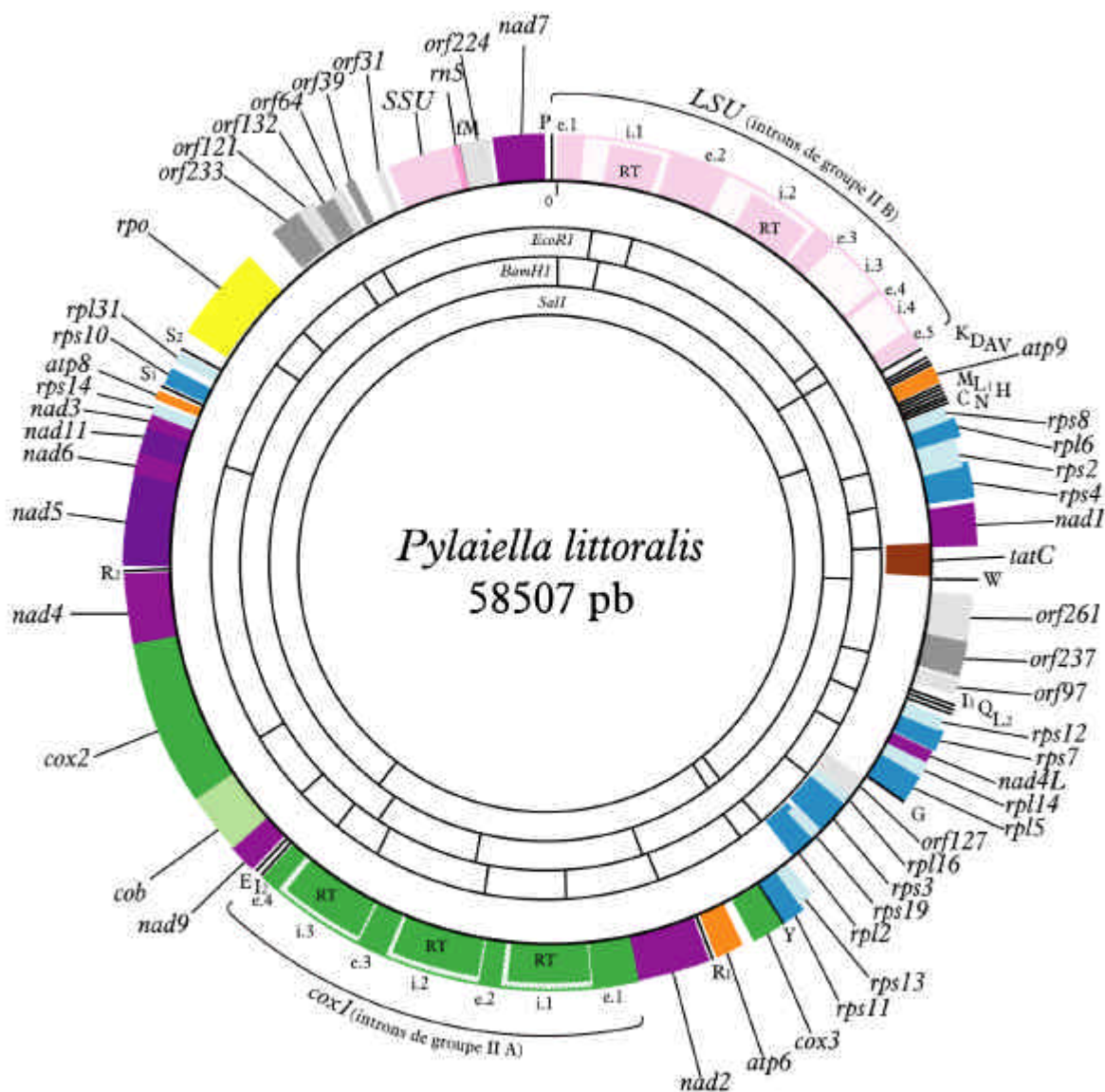


Figure 18 Carte génique et de restriction du génome mitochondrial de *Pylaiella littoralis*

Les gènes, exons (e.) et les ORF sont représentés par des blocs pleins, et les introns (i.) par des pointillés. Les gènes représentés sur le cercle extérieur sont transcrits dans le sens des aiguilles d'une montre et inversement pour ceux représentés dans le cercle intérieur. Des blocs de hauteurs différentes permettent de voir les chevauchements de gènes. Les *trn* sont représentés par des barres noires, avec la lettre de l'acide aminé correspondant. Les sites de restriction des enzymes *EcoRI*,

*Bam*H1 et *Sal*I sont montrés sur les cercles internes. Les flèches figurent les plus grandes répétitions (voir aussi plus loin, Figure 35).

1.2. Contenu du génome mitochondrial

Je considère donc ici les 90% de la molécule qui comprennent les gènes mitochondriaux.

1.2.1. Les gènes d'ARNs ribosomiques

Les trois gènes codant les ARNs ribosomiques, c'est-à-dire ceux des ARNs de la grande (23S) et de la petite sous-unité (16S) du ribosome, ainsi que l'ARN 5S, sont présents dans le génome mitochondrial de *P. littoralis*.

Les séquences et les structures du 16S et du 23S de *P. littoralis* ont été publiées (Fontaine *et al.*, 1995b ; Markowicz *et al.*, 1988). L'ARNr 5S est décrit dans l'article sur la séquence complète Oudot *et al.*, soumis, Annexe 11.

Le gène de l'ARNr 16S a une longueur de 1519 nt.

Il est suivi du gène de l'ARNr 5S, dont il n'est séparé que par 4 nucléotides. Un alignement de séquences d'ARNr 5S de bactéries, d'algues, de protistes et de plantes vertes est présenté Figure 19 page 60, ainsi qu'un repliement potentiel en Figure 20 page 61, qui a été établi en se basant sur Moore, 1995. Deux groupes de séquences bien définis ressortent de l'alignement : celui des plantes vertes et celui des protéobactéries. Les autres séquences appartiennent à des espèces phylogénétiquement très différentes, ce qui peut expliquer leur plus grande variabilité. L'ARNr 5S de *P. littoralis* contient la majorité des résidus habituellement conservés. De plus, certaines des caractéristiques inhabituelles du gène de *P. littoralis* existe dans d'autres gènes (Figure 21, page 61). Par exemple, l'appariement non canonique U:C de la première paire de la tige III est le même chez *Paracoccus denitrificans* (X01501). La boucle B est plus courte que dans les gènes d'ARNr 5S des bactéries et des plantes, mais il est plus long d'un nucléotide que celui de *R. americana* (Lang *et al.*, 1997). La tige I est toutefois la plus courte décrite à l'heure actuelle et un seul nucléotide non apparié se trouve entre les tiges II et V.

Le gène de l'ARNr 5S de *P. littoralis* chevauche le gène suivant, le *trn* méthionine d'initiation (fM), de 3 nt. Viennent ensuite une ORF de 224 aa, le gène *nad7* et le *trn* proline (P) avant le gène de l'ARNr 23S.

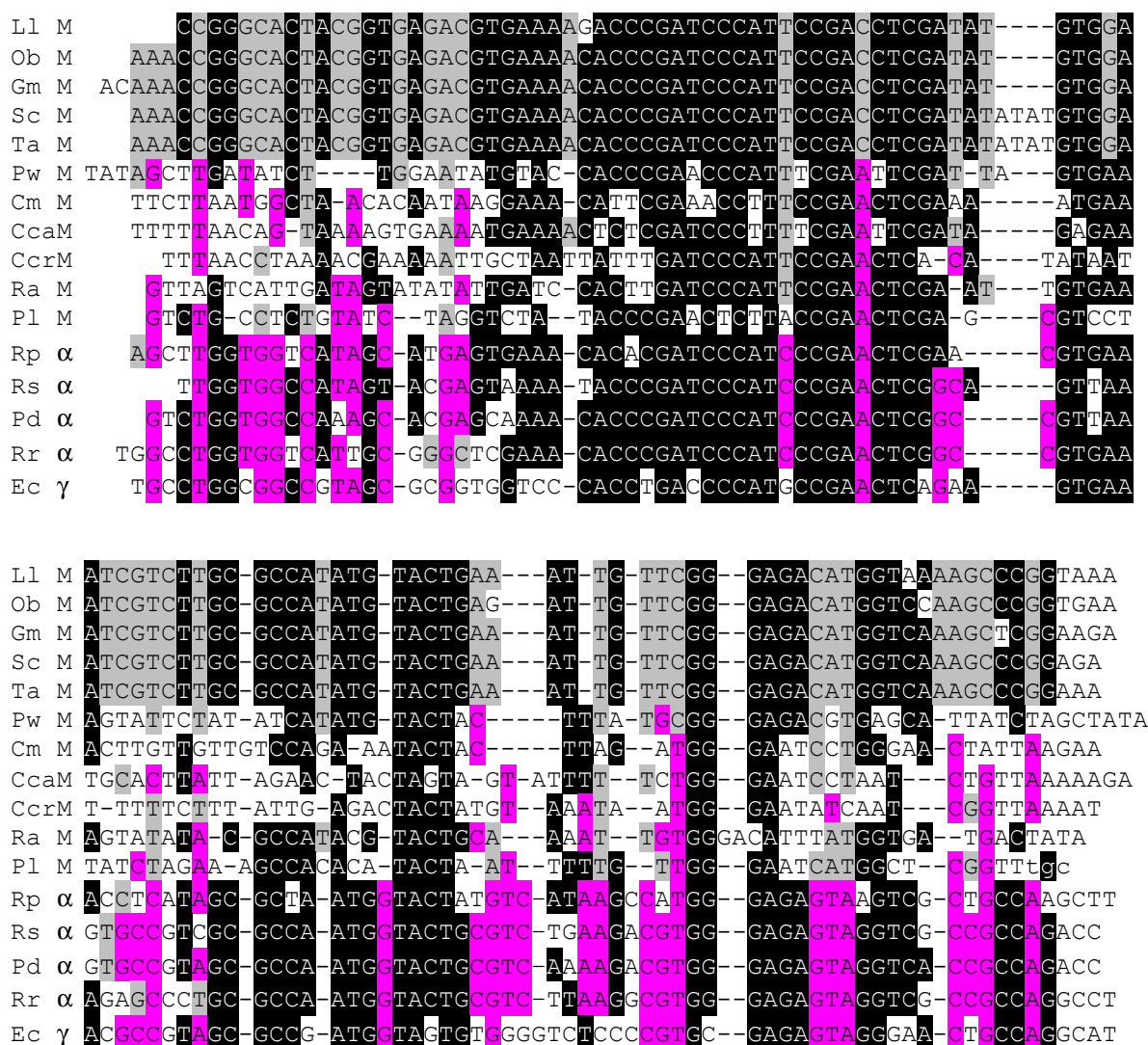


Figure 19 Alignement de séquences mitochondriales (M) et protéobactériennes (a / g) d'ARNr 5S

Les différentes espèces sont : plantes vertes : lupin (*Lupinus luteus*, Ll, Z11512), onagre (*Oenothera berteriana*, Ob, X61277), soja (*Glycine max*, Gm, X00835), seigle (*Secale cereale*, Sc, Z14059), blé (*Triticum aestivum*, Ta, M10361), *Prototheca wickerhamii* (Pw, U02970) ; algues rouges : *Cyanidium caldarium* (Cca, X68666), *Chondrus crispus* (Ccr, Z47547), *Cyanidioschyzon merolae* (Cm, D89861) ; algue brune : *Pylaiella littoralis* (Pl, AJ277126) ; protiste : *Reclinomonas americana* (Ra, U59762) ; α-protéobactéries : *Rickettsia prowazekii* (Rp, U11018), *Rhodobacter sphaeroides* (Rs, D10034), *Paracoccus denitrificans* (Pd, X01501), *Rhodospirillum rubrum* (Rr, X02044) ; γ-protéobactérie : *Escherichia coli* (Ec, X00414). Les tirés (-) indiquent les délétions. Le surlignage noir avec les lettres blanches indique les positions les plus conservées d'une manière générale. Les surlignages gris clair et gris foncé mettent en évidence les nucléotides conservés chez les plantes et les protéobactéries, respectivement. L'alignement respecte la structure secondaire consensus des ARNr 5S. Les nucléotides en minuscules (t, g, c) sont les premiers du gène de l'ARNt fMét.

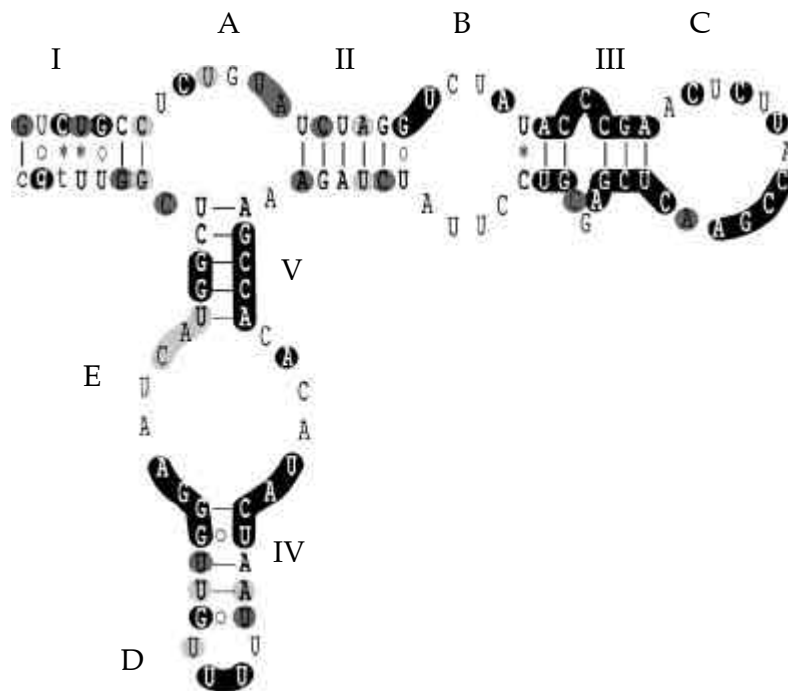
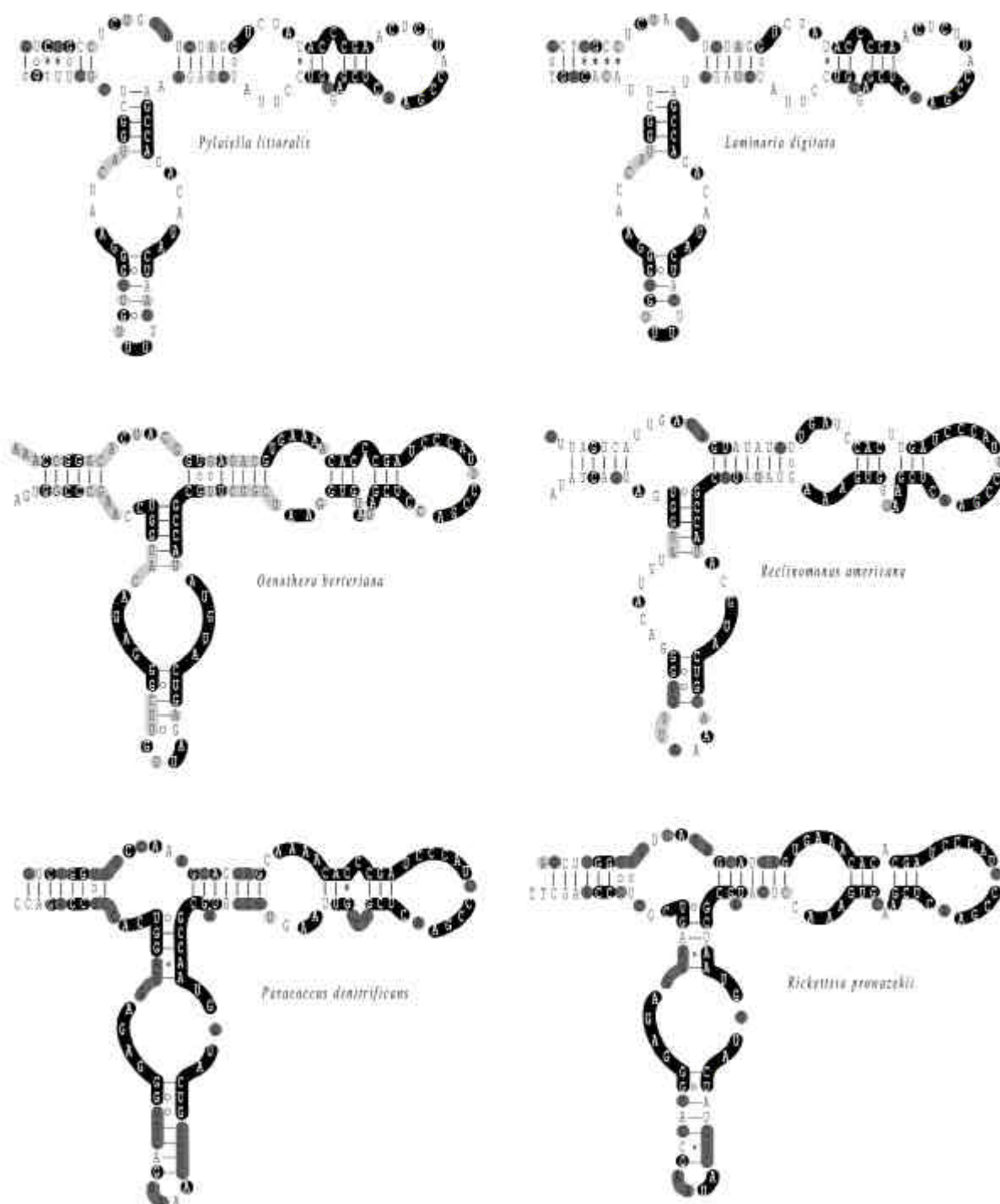


Figure 20 **Structure secondaire potentielle de l'ARNr 5S de *Pylaiella littoralis***

Les positions conservées sont grisées (voir Figure 19, page 60). Les étoiles indiquent les appariements non canoniques.

Figure 21 **Comparaison de structures secondaires potentielles d'ARNr 5S (→)**

Les différentes espèces sont : plante verte : onagre (*Oenothera berteriana*, Ob, X61277), algue brune : *Pylaiella littoralis* (Pl, AJ277126) ; protiste : *Reclinomonas americana* (Ra, U59762) ; α -protéobactéries : *Rickettsia prowazekii* (Rp, U11018), *Paracoccus denitrificans* (Pd, X01501). Les positions conservées sont grisées (voir Figure 19, page 60). Les étoiles indiquent les appariements non canoniques.



L'ARNr 23S est interrompu par quatre introns dont il sera question plus loin (Chapitre III.1.2.4, page 74). Sa longueur hors introns est de 2695 nt. Au niveau de sa structure comme de sa séquence, l'ARNr 23S de *P. littoralis* est plus proche des gènes homologues des α -eubactéries que ne le sont la plupart des gènes mitochondriaux des eucaryotes (Fontaine *et al.*, 1995b), à l'exception de celui de *Reclinomonas americana*.

1.2.2. Les gènes d'ARN de transfert

Nous avons identifié 34 gènes d'ARN de transfert (Figure 22) dans le génome mitochondrial de *P. littoralis*. Ils peuvent être repliés selon le modèle en feuille de trèfle, malgré plusieurs appariements non canoniques (Crick, 1966 ; Madison *et al.*, 1966). Certains n'ont pas les nucléotides habituels, à des positions considérées comme invariantes. Cependant, en consultant une compilation de séquences d'ARNt (Sprinzl *et al.*, 1998 ; <http://www.uni-bayreuth.de/departments/biochemie/trna/>, mise à jour 2000), j'ai pu constater que certaines de ces déviations du modèle habituel étaient trouvées dans les mêmes ARNt d'autres espèces (Tableau VI) ou dans d'autres ARNt (Tableau VII). Dans le cas du *trn* arginine 2 (R2, TCT), 8 nucléotides sont insérés entre l'anticodon et la tige du bras anticodon. Ces positions 37-38 sont un lieu courant d'insertion d'introns, de quelques nucléotides à plus de 2000 nt.

ARNt	Tige		Boucle		Boucle		Bras		Boucle		Boucle			
	Aminoacyl	D	Tige	Tige	Anticodon	Tige	variable	Tige	TWC	TigeAminoacyl				
Consensus	8	11	14 ¹⁵ 18 ¹⁹ 21	24 26	32 ³³ 37	48	53 ⁵⁴ 55 ⁵⁶ 57 ⁵⁸ 60 ⁶¹							
	-----	T- -Y--	AR/ GG/A	--R-	R	----	YT--R-	----	--/Y	---G	TTCRA-Y	C----	-----	
A (UGC)	GGGGGTA	TA	ACTC	AGTTGGTA	GAGT	G	TGCGC	TTTGCAA	GCGTG	AAGTC	AAGGG	TTCAAGT	CTCTT	TATCTCC
C (GCA)	GACTAGA	TA	GTAT	AATGGTTA	ATGC	G	TTGGG	TTGCAA	CCCAA	AAAT	GAGGG	TTCAAA	CCCTC	TCCGGTC
D (GUC)	GGAGAAG	TA	ACTC	AGTTGGTA	GAGT	G	TCGGC	TTGTCAT	GCCGA	TGGCC	GCGGG	TTCAAGT	CCCGT	CTTTTCC
E (UUC)	TGTCTTT	TC	GTCT	AATGGTTA	GGAC	G	TTGCC	TTTTCAC	GGCAA	AGAT	ACGGG	TTCAATT	CCCGT	AAAGGAT
F (GAA)	GTTTGGG	TA	GCTC	AGTTGGTA	GAGT	G	AAGGA	CTGAAA	TCCTT	AGGTC	ATCGG	TTCAAGC	CCGAT	CTCAAC
fM (CAU)	TGCGTTG	TG	GAGC	AGTCAGGTCAGCTC	G	TCAGG	CTCATGC	CCTGA	CCTGA	AGGTC	GTAGG	TTCAAA	CCTGC	CAGCGCT
G (GCC)	GCGGAAG	TA	ACTC	AATAGGTA	GAGT	G	TAAGC	TTGCCAA	GCTTA	AAGCT	GAGGG	TTCAAA	CCCTT	TTTTTCG
H (GUG)	GCGAGTG	TA	ACTC	AGTTGGTTA	GAGT	G	TCAGG	TTGTGGC	TCTGG	AAGAC	GGGGG	TTCAACT	CCCGT	CGCCCGC
I1 (GAU)	GGGCTCG	TA	ACTC	AGTGGTA	GAGT	G	TACGC	CTGATAA	GCCTA	AAGTC	GTTCG	TTCAACT	CGATC	CGGGCCC
I2 (CAU)	CGGTTTCG	TA	GTTT	AATGGTA	AAAC	A	TAGTT	CTCATGA	AGCTA	GCAAT	GCAGG	TTCAAGT	CCTGC	CGAACCG
K (UUU)	GGGTGTA	TA	GCTC	AGCTGGTTA	GAGT	G	GTGGA	CTTTTAA	TCCGA	GGGTC	TTGGG	TTCAAGT	CCCAA	TACGCC
L1 (UAA)	GCGACTT	TG	GTGA	AATTGGTA	ACAC	G	TCAGA	CTTAA	TCTGT	TTCTATTTAAGAGT	ATCGG	TTCAAGT	CCGAT	AAGTCGC
L2 (UAG)	GCCAAGG	TG	GTGG	AATTGGTA	ACAC	G	CTGGG	TTTAGGT	TCCAG	TCCTTTACAGGGT	AGGGG	TTCAACT	CCCGT	CCTTGGT
M (CAU)	AGCGGTG	TA	GTTC	AGCGGTTA	GAAT	G	TTGGA	ATCATAT	CCCAA	ATGTC	AAGGG	TTCAAGT	CCCTT	TCCCGTT
N (GUU)	TCTTCAA	TA	GCTC	AGTTGGTA	GAGC	A	TATGG	CTGTAA	CCATA	AAGTC	GTTCG	TTCAAGT	CCAAC	TTGAAGA
P (UGG)	CGGGAGG	TG	ACGC	AGTGGTA	GCGT	G	TTCCG	TTTGGGA	GCCAC	AAGTC	ATAGG	TTCAAA	CCTAT	TCTCTTG
Q (UUG)	TGGAGTC	TA	GCCA	AGTTGGTA	AGGC	G	CCCGT	TTTGGT	ACGGG	GACC	GAAGG	TTCGAGT	CCTTC	GATTCCA
R1 (UCU)	GCATTTT	TA	GCTC	AGTGGTA	GAGC	A	TCGGT	CTTCTAA	ATCGT	GGGTC	GTAGG	TTCAAA	CCTAT	AAAATGT
R2 (UCU)	GTTCCTT	TA	GTCT	AAGGTT	TGGC	T	TAAGG	CTCTTAAAGACATTGTTTAA	AAAAAGACAAAGAT	ACGGG	TTCAAA	CCCGT	AAAGAAC	
S1 (GCU)	GAGGGCG	TG	GCTG	AGCGGTTA	AAGC	C	TTGGT	TTGTCAA	ATCAA	TGTACTTAATGTACC	GTAGG	TTCAAA	CCTAC	CGTTTCC
S2 (UGA)	GGACAG	TG	GTGC	AGTGGTTA	TGGC	A	CCAGT	TTTGAAA	GCTGACGTAGTTGATAGCTACC	GTGGG	TTCGAAT	CCCTC	CTGTGCC	
V (UAC)	GGGAGTA	TA	ACTC	AGTGGTA	GAGT	G	TGTGC	CTTACAA	GCACG	AAGTC	GGGAG	TTCAAT	CTCTC	TGCCCCC
W (CCA)	GGAAAGG	TA	GTTT	AATGGTA	GAAC	T	TTGGT	CTCCAAA	GCCAA	AGGTT	GGGGG	TTCAAGT	CCCTC	TCTTTCT
Y (GUA)	GAAGGGG	TG	ACTG	AGTGGTTA	TAGT	G	GCAGA	TTGTAA	TCTGT	TGGTTTACCATC	GTAGG	TTCGAAT	CCTAC	CTCTTTC

Figure 22 Séquences nucléotidiques des 34 gènes d'ARNt du génome mitochondrial de *P. littoralis*

Les anticodons sont en caractères gras. La ligne supérieure "consensus" indique les nucléotides invariants et semi-invariants trouvés dans les *trn*. Les déviations des séquences par rapport au consensus sont soulignées.

Tableau VI Exemples de déviations de positions conservées similaires à *P. littoralis*, dans d'autres ARNt

Position	ARNt <i>P. littoralis</i>	<i>P. littoralis</i> nt, séquence	Exemples dans d'autres génomes mitochondriaux
21 : A	R2 (TCT)	bras D : AAGGTT	T dans l'ARNt Y (GUA) de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (AAAGGTT)
33 : T	R2 (TCT)	C	C dans l'ARNt N (TTC) de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>

Tableau VII Exemples de déviations de positions conservées similaires à *P. littoralis*, dans le même ARNt

Position	ARNt	<i>P. littoralis</i> nt	Exemples d'autres cas de génomes mitochondriaux ou de génomes bactériens
60 : pyrimidine	V (TAC)	A	<i>Haemophilus influenzae</i> , souris, vache, <i>phoca vitulina</i> et <i>oryx gazella</i>
32 : pyrimidine	M (CAT)	A	<i>Borrelia burgdorferi</i> , <i>Prototheca wickerhamii</i> , <i>Marchantia polymorpha</i> et <i>Chondrus crispus</i>

Comme tous les codons sont utilisés dans le génome mitochondrial de *P. littoralis* (usage des codons Figure 23), certains ARNt manquent pour décoder l'ensemble des ARNm.

	T			C			A			G			
T	TTT	78/72		TCT	27/23		TAT	74/63		TGT	76/47		T
	TTC	22/28	GAA, F	TCC	11/9		TAC	26/37	GUA, Y	TGC	24/53	GCA, C	C
	TTA	42/36	UAA, L1	TCA	18/18	UGA, S	TAA	71/86	*	TGA	13/14	*	A
	TTG	16/21		TCG	10/16		TAG	16/0	*	TGG	100/100	CCA, W	G
C	CTT	22/15		CCT	45/30		CAT	69/81		CGT	24/18		T
	CTC	5/7		CCC	19/28		CAC	31/19	GUG, H	CGC	10/2		C
	CTA	10/15	UAG, L2	CCA	24/28	UGG, P	CAA	72/74	UUG, Q	CGA	14/10	(R)	A
	CTG	5/6		CCG	12/15		CAG	28/26		CGG	7/8		G
A	ATT	52/42		ACT	34/30		AAT	74/64		AGT	23/20		T
	ATC	15/21	GAU, I	ACC	19/30		AAC	26/36	GUU, N	AGC	11/13	GCU, S	C
	ATA	33/37	CAU, I2	ACA	33/36	(T)	AAA	71/75	UUU, K	AGA	28/53	UCU, R	A
	ATG	100/100	CAU, M #	ACG	14/10		AAG	29/25		AGG	16/8		G
G	GTT	50/36		GCT	44/25		GAT	70/66		GGT	48/37		T
	GTC	11/18		GCC	17/30		GAC	30/34	GUC, D	GGC	17/20	GCC, G	C
	GTA	26/24	UAC, V	GCA	25/30	UGC, A	GAA	59/67	UUC, E	GGA	19/37	(G)	A
	GTG	13/21		GCG	15/15		GAG	41/33		GGG	17/7		G

Figure 23 Usage des codons des gènes codants des protéines de la partie mitochondriale et de la région du gène de l'ARN polymérase

Codon, préférence d'utilisation (%) du codon, parmi ceux spécifiant le même acide aminé dans la partie mitochondriale / dans la région du gène de l'ARN polymérase, anticodon de l'ARNt correspondant présent dans l'ADN mitochondrial de *P. littoralis*, ou absent (). # les deux gènes d'ARNt M sont présents : initiation et élongation. * codons stop.

En effet, le génome mitochondrial de *P. littoralis* ne contient qu'un seul *trn* glycine (G), dont l'anticodon est GCC. Cet ARNt n'est pas capable de décoder les codons GGA et GGG, même en prenant en compte la possibilité d'appariement non canonique de la troisième position (*wobble*, Crick, 1966 et *two out of three*, Lagerkvist, 1978).

L'arginine (R) est codée par deux familles de codons, mais bien qu'il y ait deux gènes d'ARNt R dans le génome mitochondrial de *P. littoralis*, ils ne permettent pas de tous les décoder, car ils ont le même anticodon, UCU.

Par contre, pour l'isoleucine (I), il existe bien deux gènes d'ARNt I, dont l'un présente l'anticodon CAU. Le premier ARNt de ce type qui fut étudié est celui du chloroplaste de l'épinard (Francis & Dudock, 1982 ; Kashdan & Dudock, 1982). Il a été décrit la première fois à partir d'expériences biochimiques montrant qu'il était chargé avec de l'isoleucine. La première position de l'anticodon n'avait pas pu être déterminée alors, car le nucléotide en était modifié. Par la suite, le même cas a été identifié dans les mitochondries de pomme de terre (Weber *et al.*, 1990). Il a alors été montré que le nucléotide de la première position de l'anticodon était une cytidine, modifiée par un mécanisme post-transcriptionnel en un composé proche de la lysidine. Les gènes d'ARNt I (CAU) sont identifiables comme la majorité des gènes par alignements de séquences : ils se ressemblent plus entre eux qu'ils ne ressemblent aux ARNt méthionine d'élongation (M, CAU) par exemple.

```

trnI (GAU)
C.s AGTCTTATAGCTCAG-TGGTTAGAGCGTACGCTTGATAAGCGTAATGTCAGTAGTTCAACTCTACTTAGGACT
P.l GGGCTCGTAACTCAG-TGG-TAGAGTGTACGCCTGATAAGCGTAAAGTCGTTCTCAACTCGATCCGGGCCC
P.i GGGCTTATAACTCAGTTGGTTAGAGTATACGCCTGATAAGTGTAAAGTCAGTAGTTCAAATCTACTTAGGCCC
C.r AGGCTCATAACTCAGTTGGTTAGAGTGCTCGCTTGATAAGCGTGAAGTCAGTAGTTCAAGTCTACTTGGGCCT
R.a GAGCTGTAACTCAGTTGGCGAGAGGTACACCTGATAAGTGTAAAGTCAGCAGTTCAAATCTGCTCAGGCTC
      *  **  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *
trnI (CAU)
C.s GTGCTTATAGTTAAT-GGT--AGAGCATACCGCTCATAACGGTAATTGTATAGGTTCAAATCCTATTAGGCGC
P.l CGGTTCTAGTTAATTTGGT--AAAACATAGTTCTCATGAAGCTAGCAATGCAGGTTCAAGTCTGCGGAACCG
P.i AGGCTTATAGTTAATTTGGT-TAGAGCATACCGCTCATAACGGTGTAGTTGTAGGTTCAAGTCTACTAAGCCT
C.r GAGCTCATAGTTCAATTTGGT--AGAACATATCGCTCATAACGGTAATTGTATAGGTTCCATCCTATTGGGCTT
R.a GGGCTTGTAGTTAAGT-GGTAAAACGCA--CTGCTCATAACTGTGTAATCGGAGGTTCCGAATCCTTTCAAGCTC
      *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *
trnM (CAU) (élongation)
C.s ATTAAGATAACTTA-ATCGG-TAGAGTAGTGGAATCATAATCCATTGTTATGGGTTCAAGTCCCATCTTGTGAT
P.l AGCGGTGTAGTTCAG--CGGTTAGAATGTTGGAATCATATCCCAAATGTCAAGGGTTCGAGTCCCTTCTCCGTT
P.i GATGATGTAGTTTA--ATGG-TAGAGCGTGGAATCATAATCCATATGTTGTAGGTTCAAATCCTACCATCATT
C.r GACAAAATAGCTCAGTTTGGTTAGAGCGGTGGAATCATAATCCATAGGTCGTGAGTTCGAGTCTCACTTTGTGTC
R.a GGCGGTATAGCTCAG--CGG-TAGAGCAACGGAATCATAACTCGTCATTTCGTAGGTTCAAATCCTACTGCCGTC
      **  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

```

Figure 24 Alignements de séquences de *trnI* (GAU), *trnI* (CAU) et de *trnM* d'élongation (CAU)

C.s : *Chrysodidymus synuroideus*, P. l : *Pylaiella littoralis*, P.i : *Phytophthora infestans*, C.r : *Cafeteria roenbergensis*, R.a : *Reclinomonas americana*. Les astérisques et les grisés mettent en valeur les nucléotides identiques dans les 5 séquences de chaque *trn*.

Aucun *trn* thréonine (T) n'est présent dans ce génome, comme c'est le cas également dans la plupart des génomes mitochondriaux (Gray *et al.*, 1998).

Le gène de l'ARNt tryptophane (W), codé dans le génome mitochondrial de *P. littoralis*, a un anticodon (CCA), et non pas (ACU) comme c'est le cas quand le code génétique est modifié (par exemple chez *Chondrus crispus*, Leblanc *et al.*, 1995). En l'absence de tout indice contraire, le code universel est donc utilisé.

Les trois ARNt qui ne sont pas codés dans le génome mitochondrial de *P. littoralis* sont peut-être importés du cytosol, comme cela a été montré pour d'autres modèles végétaux (Maréchal-Drouard *et al.*, 1995) et chez la levure (Tarassov *et al.*, 1995). Toutefois, en l'absence d'études biochimiques réalisées sur les ARNt des mitochondries de *P. littoralis*, il n'est pas certain que les gènes mitochondriaux soient effectivement à l'origine d'ARNt fonctionnels.

Nous allons maintenant nous intéresser aux gènes dont les produits sont potentiellement traduits en protéines.

1.2.3. Les gènes codant des protéines

Le génome mitochondrial de *P. littoralis* contient la plupart des gènes généralement présents dans les génomes mitochondriaux comparables (Tableau II, page 33), c'est-à-dire ceux des protistes au sens large (en incluant des organismes pluricellulaires comme les algues).

1.2.3.1. Les gènes de protéines ribosomiques

Dix-sept gènes codant des protéines ribosomiques sont présents dans le génome mitochondrial de *P. littoralis* (Tableau IV, page 55). Certains d'entre eux sont rarement codés au niveau mitochondrial, comme le gène *rpl31* qui n'a été décrit auparavant que dans le génome mitochondrial de *Reclinomonas americana* (Lang *et al.*, 1997), alors que des gènes présents dans plusieurs autres génomes sont absents de celui de *P. littoralis*, comme *rsp1* et *rpl11* (Tableau II, page 33).

Les gènes des protéines ribosomiques sont souvent regroupés, comme dans les autres génomes mitochondriaux et plastidiaux. Leur ordre plus ou moins bien conservé correspond à des portions d'opérons bactériens. Plusieurs arrangements sont ainsi reconnaissables dans les génomes mitochondriaux des hétérocontes, qui présentent de plus des réarrangements spécifiques (Figure 25, page 67). Par exemple, le couple *rps2-rps4* suit *rps8-rpl6*, qui est un souvenir de l'opéron spectinomycine (*spc*).

opéron S10												opéron <i>spc</i> (spectinomycine)											
<i>C. m</i>	Mitochondries									S3	L16			L14	L5	S14	S8						
<i>M. p</i>			S10				L2	S19		S3	L16				L5	S14	S8	L6					
<i>A. c</i>							L2	S19		S3	L16			L14	L5	S14	S8	L6					
<i>C. r</i>						S13	L2	S19		S3	L16					S14	S8	L6	S2	S4			
<i>P. i</i>							L2	S19		S3	L16			L14	L5	S14	S8	L6	S2	S4			
<i>C. s</i>							L2	S19		S3	L16			#		#	S8	L6	S2	S4			
<i>P. l</i>			#				L2	S19		S3	L16			L14	L5		S8	L6	S2	S4			
<i>R. a</i>			<i>tufA</i>	S10				L2	S19		S3	L16			L14	L5	S14	S8	L6	L18			
<i>R. p</i>	α	<i>tufA</i>	S10	L3	L4	L23	L2	S19	L22	S3	L16	L29	S17	L14	L24	L5	S14	S8	L6	L18	S5		
<i>E. c</i>	γ		S10	L3	L4	L23	L2	S19	L22	S3	L16	L29	S17	L14	L24	L5	S14	S8	L6	L18	S5		
<i>Syn.</i>	c			*	L3	L4	L23	L2	S19	L22	S3	L16	L29	S17	L14	L24	L5		S8	L6	L18	S5	
<i>C. p</i>	Plastes		#	*	L3			L2	S19	L22	S3	L16		S17	L14		L5		S8	L6	L18	S5	
<i>P. p</i>			#		L3	L4	L23	L2	S19	L22	S3	L16	L29	S17	L14	L24	L5		S8	L6	L18	S5	
<i>G. t</i>			#		L3	L4	L23	L2	S19	L22	S3	L16	L29	S17	L14	L24	L5		S8	L6	L18	S5	
<i>O. s</i>			#		L3	L4	L23	L2	S19	*	L22	S3	L16	L29	S17	L14	L24	L5		S8	L6	L18	S5
<i>E. g</i>							L23	L2	S19	L22	S3	*	L16			L14		L5		S8			
<i>M. p</i>							L23	L2	S19	L22	S3		L16			L14				S8	*		

(suite)		—— <i>spc</i> ——→				—— opéron α ——→				S9				—— opéron <i>str</i> ——→						
<i>C. m</i>	Mitochondries						S11	L20												
<i>M. p</i>							S13	S11								S12	S7			
<i>A. c</i>							S13	S11							L11	S12	S7			
<i>C. r</i>						#														
<i>P. i</i>							S13	S11								S12	S7			
<i>C. s</i>							S13	S11							S14	L14	S12	S7		
<i>P. l</i>							S13	S11					S10	L31		S12	S7			
<i>R. a</i>				<i>secY</i>			S13	S11		<i>rpoA</i>		S1			L31		S12	S7	#	
<i>R. p</i>	α	L30	L15	<i>secY</i>	*	S13	S11		<i>rpoA</i>	L17	S20	L13	S9	L31		S12	S7	<i>fusA</i>	#	
<i>E. c</i>	γ	L30	L15	<i>secY</i>	L36	S13	S11	S4	<i>rpoA</i>	L17		L13	S9	L31		S12	S7	<i>fusA</i>	<i>tufA</i>	
<i>Syn.</i>	c		L15	<i>secY</i>	*L36*	S13	S11		<i>rpoA</i>	L17*		L13	S9	L31		S12	S7	<i>fusA</i>	<i>tufA</i>	
<i>C. p</i>	Plastes			<i>secY</i>	L36	S13	S11		<i>rpoA</i>				S9			S12	S7		<i>tufA</i>	S10
<i>P. p</i>				<i>secY</i>	L36	S13	S11		<i>rpoA</i>			L13	S9	L31		S12	S7		<i>tufA</i>	S10
<i>G. t</i>				<i>secY</i>	L36	S13	S11		<i>rpoA</i>			L13	S9	L31		S12	S7		<i>tufA</i>	S10
<i>O. s</i>				<i>secY</i>	L36	S13	S11		<i>rpoA</i>			L13	S9	L31		S12	S7		<i>tufA</i>	S10
<i>E. g</i>					L36			S4	S11							L20	S12	S7		<i>tufA</i>
<i>M. p</i>					L36			S11		<i>rpoA</i>						L20	S12	S7		

Figure 25 Comparaison entre des opérons bactériens de protéines ribosomiques et des groupes des gènes mitochondriaux et plastidiaux correspondants

Les opérons bactériens S10, spectinomycine (*spc*), alpha et streptomycine (*str*) sont comparés avec les groupements de gènes homologues mitochondriaux (partie supérieure) et plastidiaux (partie inférieure). Les gènes contigus sont encadrés, et se suivent d'un tableau à l'autre quand leur bordure n'est pas en trait plein (en particulier, pour *A. castellanii*, l'opéron putatif commence à la fin du deuxième tableau). Les astérisques signalent qu'une ou des séquences codant des protéines non ribosomiques font partie de l'opéron putatif, mais ne sont pas représentées. Le gris plus foncé met en évidence des arrangements atypiques. Les gènes indiqués en blanc sur fond noir correspondent à un réarrangement spécifique aux hétérocontes. # signale des gènes présents dans un autre opéron représenté. Le gène plastidial S12 de *M. polymorpha* est scindé en deux parties. *C. m*: *Cyanidioschyzon merolae*; *M. p*: *Marchantia polymorpha*; *A. c*: *Acanthamoeba castellanii*; *C. r*: *Cafeteria roenbergensis*; *P. i*: *Phytophthora infestans*; *C. s*: *Chrysodidymus synuroides*; *P. l*: *Pylaiella littoralis*; *R. a*: *Reclinomonas americana*; *R. p*: *Rickettsia prowazekii*, α -protéobactérie; *E. c*: *Escherichia coli*,

1.2.3.2. Les gènes des autres protéines mitochondriales

- *nad11*

B. tau.Nu	29	NLIEVFVDGQSVMVPEGTTVLQACEKVGQMIPR FCY -HERL---SVAGN CRMCLVEI -----EKAP
N. cra.Nu	33	EV-ELTIDGKKVSIEAGSALIQACEKAGVTIPRY CY -HEKL---MIAGN CRMCLVEV -----EKVP
R. ame.Mi		MVN VFVDGLSVEVKKGATILQACAQVGIEIPR FCY -HERL---SIAGN CRMCLVEV -----EKS
P. lit.Mi		LLTISVNDLV IWLKKGSTVIQACQVAGA QVPR FCY -HDKL---FIAGN CRMCLVEV -----SKSP
R. pro.Ba		MIKLIIDGSEIEISEGSTVYQACIQAGKEIPH FCY -HARL---KIAGN CRMCLVEI -----EKSQ
R. cap.Ba		MSTLRKIIIDGIEVEVDPSLTLIQACEQAGIEVPR FCY -HERL---SIAGN CRMCLVEV ----GGPP
P. den.Ba		MADLRKIKIDDITIEVDNMPTLIQACEMAGIEVPR FCY -HERL---SIAGN CRMCLVEV ----GGPP
A. eut.Ba		MS--IQITIDGKTLTTEEGRTLVDVAENGVYIPTLCYLKD KP ---CLGT- CRVC S VKV -----NG--
E. col.Ba		MA--TIHVDGKEYEVNGADNLLEACL SLGLDIPYFCW -HP-ALG-SVGA- CRQCAV KQYQNAEDTRG
N. ova.Hy	21	MISLKIDGKIIISVPKGIMLADAICKAGANVP TMCY -HP-DLP-TSGGI CRVCLVES ----AK-SPG
D. vul.Ba		M-N--A-FINGKEVRCEPGRTILEAAARENGHFIP TLC --ELADIGHAPGT- CRVCLVEIWRD -KEAGP
S. 6803Ba		MS-VVTLTIDDDKAIAIEEGASILQA AKEAGVIP T LIC --HLEGIS-EAAA- CRICMVEV -----EGTN
A. var.Ba		MS-VKTLLTINDQLISAQEETLLQA QAEAGIHPI T LIC --HLEGVG-DVGA- CRICLVEV -----AGSN

(* *

** * *

<i>B. tau.</i>	KVVAACAM	0	PVMKGWNILTNSEKTKKAREGVMEFLLAN H PLDC P ICDQGGEC D LQDQSMFSGSDRSRFL	
<i>N. cra.</i>	KPVASCAM	0	PVQPGMVVKTNPLTHKAREGVMEFLPAN H PLDC P ICDQGGEC D LQDQSMRYGRDRGRFH	
<i>R. ame.</i>	KPVASCAM	0	PVMDNMKIFNTPLVKKAREGVLEFLLVN H PLDC P ICDQGGEC D LQDLTMVYGS DRGRFH	
<i>P. lit.</i>	KPQASCAL	0	PFLPGLRIFTNTALVRKAQESVMELLLL H PLDC P ICDQGGEC E LQEQSFNFGSDRGRFF	
<i>R. pro.</i>	KPVASCAM	0	PVSKGMVIHTDTPMVKKAREGVMEFLLIN H PLDC P ICDQGGEC D LQDQAFRYGKGTNRFH	
<i>R. cap.</i>	KPTASCAM	8	PNGEPSVIKTNSPMVKKAREGVMEFLLIN H PLDC P ICDQGGEC D LQDQAMAYGGSVSRFR	
<i>P. den.</i>	KPAASCAM	8	PEGAPSEIRTNSPMVKKAREGVMEFLLIN H PLDC P ICDQGGEC D LQDQAMAYGVDFSRFR	
<i>A. eut.</i>	NVAAACTV	0	RVSKGLNVEVNDPELVDMRKALVEFLFAEGN H NC P SCEKSGRC Q LQAVGYEVDMMVSRFP	
<i>E. col.</i>	RLVMS CMT	0	PASDGTFFISIDDEEAKQFRESVVEWLMTNHP H DC P VEEGGN C HLQDMTVMTG--HSFRR	
<i>N. ova.</i>	YPIISCRT	0	PVEEGMEIVTQGS KMKEYRQANLALMLSR H PNAC L SCTSN T NC K TQELSANMNIGQCGFA	
<i>D. vul.</i>	QIVTSCTT	0	PVEEGMRIFTRTPEVRRMQRLQVELLLADHD H DC A ACARHGD C ELQDVAQFVGLTGTRHH	
<i>S. 6803</i>	KLMPACVT	0	AVSEEMVHTNTEKLQNYRRMTVELLFSEGN H V C AICVANGN C ELQDMAITVGMDHSRFK	
<i>A. var.</i>	KLLPACVT	0	KVAEGMEVSTNSDRLLQRYRTIVEMFLFAEGN H IC S VCVANN N C E LQDLAIEMGMDHVRLE	
	(*)		(* * * *)	
<i>B. tau.</i>	E--GKRAVEDKNIGP-LVKTI-MT R CIQ T R C IRFASEIAGVDDLGTG-RGNDMQVGTYIEK--MFM-SE			
<i>N. cra.</i>	EVGGKQAVEDKNMGP-LIKTS-MN R CIQ T R C VRFANDIAGAPELGSTG-RGNDLQIGTYLEKN---LDSE			
<i>R. ame.</i>	EY--KRGVEDKNIGP-LIKTV-MT R CI H C T R C VRFATEVAGVPDLGTVG-RGRDTEISTYIQK--VFNSE			
<i>P. lit.</i>	FF--KNSLGDTFWGS-LIKTV-LR R CV V T R CVRVRYTHQIGGSDLGTS-NRGGHSEIGMF-KEN--TLKTE			
<i>R. pro.</i>	EN--KRSIKDKYMGP-LIKTA-MT R CIQ T R C IRLANDIAGIEEIGAI-NRGEHMEVTSYLEQ---TLDSE			
<i>R. cap.</i>	EV--KRTSDNLNLGP-LVKTE-MT R CI S C T R C VRFTTEVAGITQMGQTG-RGADSEITSYLD---MTLDSN			
<i>P. den.</i>	E--PKRATEDLNLGP-LVETH-MT R CI S C T R C VRFTTEVAGITQMGQTG-RGEDSEITSYLNQ---TLESN			
<i>A. eut.</i>	YRFPVRVV-DH--ASEKIW-LERD R CIF C Q R CV E FIRDKASGRKIFSIHRGPESRIEIDAELANAMP-PE			
<i>E. col.</i>	YRFTKRTHRNQDLGP--FISHEMN R CI A C Y RCVRYKYDADGTDLGvy---GAHDNVYFGRPEDGQ-LESE			
<i>N. ova.</i>	NATPPKNDSDYMTT-AIE-RDND K CIN D IC V HTCSL-QGLNALGFYNEEGHAVKSMGTLD-----VSEC			
<i>D. vul.</i>	FDPYARS-RTRDVSSPSV-RDMG K IR C L R CVAVCRNVQGVDAVVTGN-GIGTE-IGLRHNRSQSASDC			
<i>S. 6803</i>	YQFPKR--EV-DLSH-PMFGIDHN R CIL T R C VRVCEI-EGAHVWDVAYRGAECKIVSGLNPWGTVDAC			
<i>A. var.</i>	YHFPNR--KV-DISHDR-FGVDHN R CV L T R CIRVCEI-EGAHTWDMAGRGTNSHVITDLSQPWGTS DTC			
	(** * **)			
<i>B. tau.</i>	L-SGNIIDIC P VGALTSPYAFTA-RPWETRKTESIDVMDAVGNSNIVVSTRTG	second domaine		
<i>N. cra.</i>	L-SGNVIDL C PVGALTSPYAFTA-RPWELKKTESIDVLDGLGSNIRVDTRGL	second domaine		
<i>R. ame.</i>	L-SGNVIDL C PVGALTSPYAFTA-RSWELQSTESIDVSDAIGSNIRIDVRGS	second domaine		
<i>P. lit.</i>	T-SGGVIEL C PVGWLSKKKLCF-F. ✕			
<i>R. pro.</i>	I-SGNMIDIC P VGALNSKPYAFKA-RKWELKHTASIGVHDAEGSNSKPYAFKA	second domaine		
<i>R. cap.</i>	LQ-GNIIDL C PVGALTSPYAFTA-RPWELVKTESIDVMDALGSNIRIDAKGR	second domaine		
<i>P. den.</i>	MQ-GNIIDL C PVGALVSKPYAFKA-RPWELTKTESIDVMDALGSSIRIDTKGR	second domaine		
<i>A. eut.</i>	-QVKEAVAIC P VGTILEKRVGYD--DPIGRKYE-IQSVRARALEGEDK. ✕			
<i>E. col.</i>	FS-GNLVEIC P TGVFTDKKHSEYRNRKWDQFAPSICQCSIGCNISPGERYG	second domaine		
<i>N. ova.</i>	IQCGQCINR C PTGAITEKSEIRPVLDAINIQRLVFQMAPSIRVAVA-EE-FG	second domaine		
<i>D. vul.</i>	VGCGQCTLV C PVGALAGRDDVERVID-Y-LYDPEIVTVFQ-FAPAVRVGL-IG	second domaine		
<i>S. 6803</i>	TSCGKCVDAC P TGSIFHKGETTA-EKIGDRRKVEFLATARKEKEWVR. ✕			
<i>A. var.</i>	TSCGKCVNAC P TGAIFYQGSSVG-EMKRDRAKLDFLVTAREKQQWNL. ✕			
	(**)			

Figure 26 Alignement de la séquence d'acides aminés déduits du gène *nad11* de *P. littoralis* avec celles du premier domaine d'autres gènes et de séquences de *hoxU* d'eubactéries

Les séquences consensus des domaines de liaison FeS sont indiquées par des astérisques. Le symbole ✕ indique la fin de la séquence de *P. littoralis* et de celles des *hoxU*. Les indications après les noms des espèces réfèrent à : Ni, gène nucléaire d'une protéine mitochondriale ; Mi, gène mitochondrial d'une protéine mitochondriale ; Ba, gène d'eubactérie. Noms des espèces et références des séquences de l'alignement : *B. tau.* : *Bos taurus*, P15690 ; *N. cra.* : *Neurospora crassa*, P24918 ; *R. ame.* : *Reclinomonas americana*, AF007261 ; *P. lit.* : *Pylaiella littoralis* AF110139 ; *R. pro.* : *Rickettsia prowazekii* (α-protéobactérie) AJ235273 ; *R. cap.* : *Rhodobacter capsulatus* (α-protéobactérie) AF029365 ; *P. den.* : *Paracoccus denitrificans* (α-protéobactérie) M84572 ; *A. eut.* : *Alcaligenes eutrophus* (β-protéobactérie) M55230 ; *E. col.* : *Escherichia coli* (γ-protéobactérie) P33602 ; *N. ova.* : *Nyctotherus ovalis* (cilié, les 261 premiers acides aminés de l'ORF [Fe]-hydrogénase nucléaire d'un polypeptide de l'hydrogénosome ont été alignés) Y16775 ; *D. vul.* : *Desulfovibrio vulgaris* (δ-protéobactérie) X57838 ; *S. 6803* : *Synechocystis* sp. PCC6803 (cyanobactérie) X97610 ; *A. var.* : *Anabaena variabilis*

ATCC29413 (cyanobactérie) X79285. Les nombres indiqués au début et dans la séquence indiquent le nombre d'acides aminés additionnels qui ne sont pas montrés dans l'alignement (Figure 2 de l'article 2, Annexe 10).

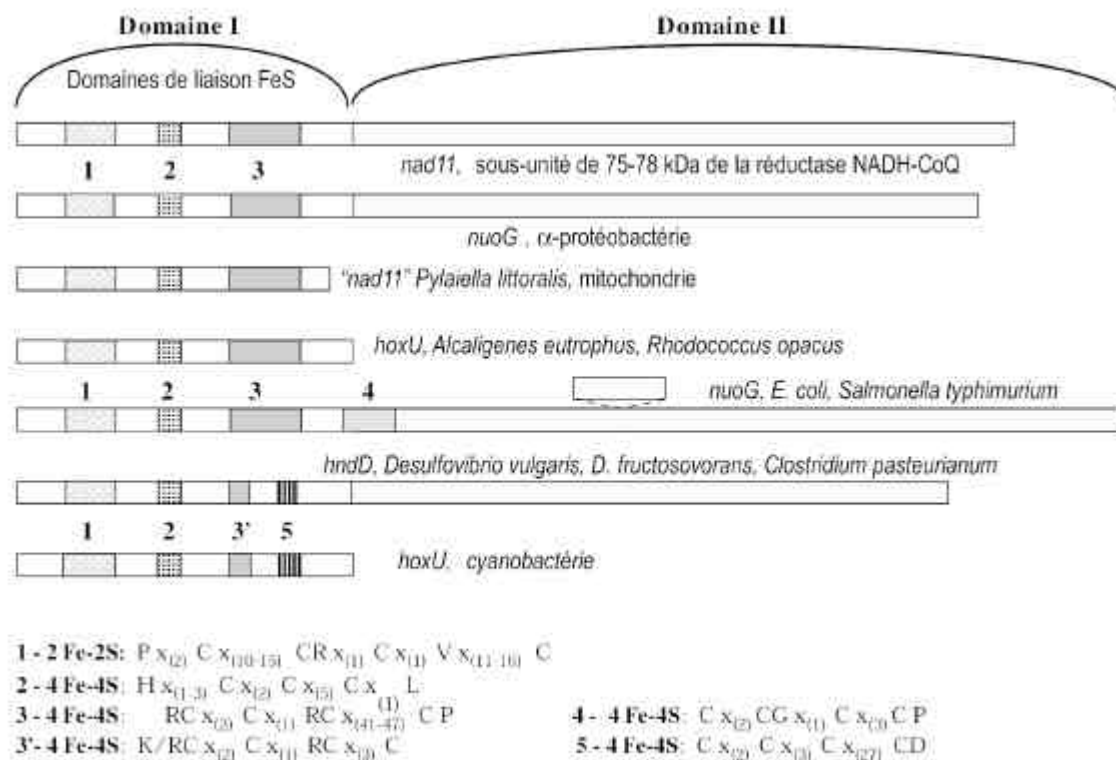


Figure 27 **Représentation schématique de l'organisation des gènes relatifs aux gènes *nad11* mitochondriaux**

Les gènes représentés sont : le gène nucléaire de la sous-unité mitochondriale de 75 KDa, de la NADH-CoQ réductase mitochondriale ; les gènes *nuoG* (*nuo7* ou *hndD*, *hydC*) d' α -, de γ - et de δ -protéobactéries ; le gène de la [Fe]-hydrogénase de l'hydrogénosome d'un cilié ; les gènes *hoxU* d'*Alcaligenes eutrophus* (β -protéobactérie), de *Rhodococcus opacus* (actinomycète) et de cyanobactéries. Les séquences consensus des domaines de liaisons FeS sont reprises d'après Appel & Schulz, 1996. (Figure 3 de l'article 2, Annexe 10)

De plus, le gène de *P. littoralis* n'a pas un ATG comme codon de début, mais un TTG. J'ai montré que ce gène était non seulement transcrit, mais aussi que le codon de début n'était pas modifié par un mécanisme post-transcriptionnel (Annexe 10, et Figure 28 page 71).

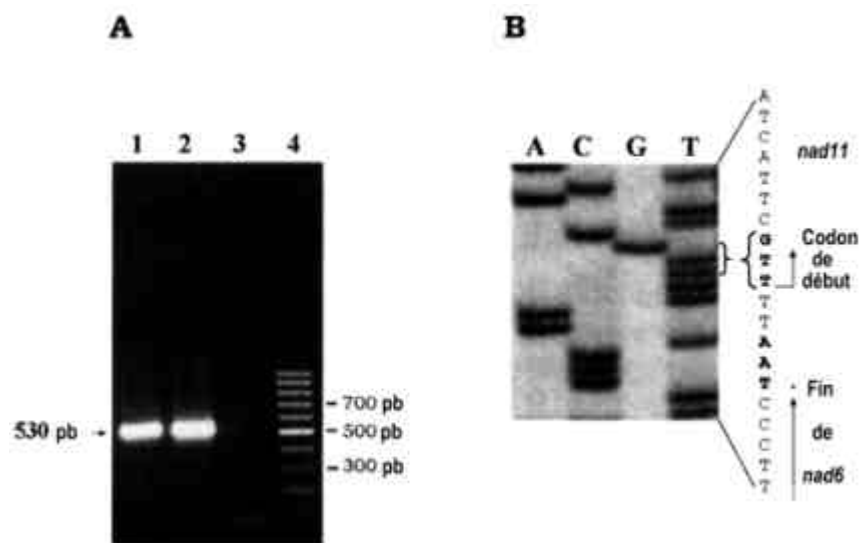


Figure 28 **Analyse du transcrit du gène mitochondrial *nad11* de *P. littoralis* par amplification d'ADNc (RT-PCR)**

Les amorces utilisées sont situées à 86 nt en amont et 463 nt en aval de l'extrémité 5' du gène *nad11*. Le fragment amplifié, de 549 nt, comprend 81 nt du gène *nad6*. (A) Piste 1, contrôle positif (amplification à partir d'ADN). Piste 2, fragment amplifié par RT-PCR. Piste 3, contrôle négatif (transcriptase reverse omise du milieu réactionnel). Piste 4, marqueur de poids moléculaire (BioLadder 100™, Eurogentec). (B) Séquence partielle du fragment amplifié par RT-PCR, montrant la jonction entre les gènes *nad6* et *nad11*. La séquence est identique à la séquence de l'ADN, indiquant que le codon de début TTG n'est pas édité au niveau ARN. (Figure 1 de l'Annexe 11)

NB : D'autres génomes mitochondriaux d'hétérocontes sont disponibles depuis la parution de l'article : le *nad11* de *Cafeteria roenbergensis* (numéro d'accès AF193903) est un gène court, comme celui de *P. littoralis*, leurs extrémités carboxyles se terminent pratiquement au même niveau, par contre, les gènes correspondant de *Phytophthora infestans* (U17009) et de *Chrysodydimus synuroideus* (AF222718) ont conservé les deux domaines.

- *atp8*

L'*atp8* comporte le domaine 5' relativement bien conservé. La taille de la protéine codée peut être variable, de 45 aa (*C. Synuroideus*) à 234 aa (*Prototheca wickerhamii*). Celle de *P. littoralis* est de 55 aa. Les autres organismes, dont l'ATP8 est

petite, sont des champignons (de 48 à 57 aa), l'algue verte *Pedinomonas minor* (48 aa) et l'hétéroconte *C. roenbergensis* (77 aa). Chez les animaux et les plantes vertes, cette protéine, au contraire, est de grande taille.

<i>R. ru</i>	MPQFDPS-SFPSQIVWLVIALVAMYF-VMS-RLAIPRLAEVLEQRQLI-NDDLK-QAE	(+107)	161
<i>R. ca</i> (26)	MPQLDFS-TFPNQIFWLLLALGAIYW-LL-KNIAIPRIAAILADRAGTIS-GDLAA-AE	(+106)	160
<i>R. pr</i>	MPQFDID-TYYSQIFWLLIVTFGLLYILVY--KFIAPNAEEIFNNRQKNI-QDNI---TQ	(+106)	158
<i>R. am</i>	MPQLDKV-TFFSQYFWLLIFFLTFYFFVL--KIVLPTVV-TFKLR-KK--KLEAMA-SE	(+81)	132
<i>P. li</i>	MPQFDTM-TFFNQVFWLVSVIFAFYMTVV--RYMLPVLAFSLKSRSKNL-KLATTPNSK.		55
<i>L. di</i>	MPQFDTM-TFFNQVFWLILIVFNFYLVV--RFILPSLAFSLKSRIKHL-KV--TVDSR.		53
<i>C. sy</i>	MPQFDDFY-SFSVQIFWVLSFIVYFFVL--NFFIKFFSEALKFQFK.		45
<i>P. in</i>	MPQFDQF-SFFNQVSWFLFFFFNFYFFVT--YFFLPKICYNLKFRKKKIIFDN-K-K-K	(+77)	130
<i>C. ro</i>	MPQLDKEL-F-TEYFFVIAVLLSLHS----DYYVSENFLRLNSQ-WFL-HDFFT-KSR	(+27)	77
<i>C. me</i>	MPQLDRVIIIV-TQIFWLLIMIVAYSFVI--KRILPSSFRILKIRENFI-KDLI-LNVE	(+76)	130
<i>P. pu</i>	MPQLDRVIIIF-SQIFWLFMLFLVAYISYA--HFVLSNVLKIFLVRWWKLRKDI---TQ	(+81)	133
<i>C. cr</i>	MPQLDRIVF-SQIFWLLFIIFVLIYIVLT-HFFLPKFIKSLKSRKQII---EANTDTE	(+86)	140
<i>A. ca</i>	MPQLDKL-SFATQYFWLTLLFFGLYFLSV--NFFVILVFNKLNLRN-IYKIWYFFLYR	(+88)	143
<i>P. wi</i>	MPQLDLV-SFLSQYFWLLVAFIGLYIYLY-KN-FLPKMYRIYSVRELR-SHK-SH-DSK	(+181)	234
<i>P. mi</i>	MPQLDFTN-WTILVISIFLFLFFFSIFV--KFFMPRIVRFLKVS NKVLID.		48
<i>M. po</i>	MPQLDQF-TYLTQFVWLCVFYMTFYVLLY--NDGLPKISRIIKLRKRLVSQE--KVGAE	(+118)	172
<i>T. ae</i>	MPQLDKL-TYFSQFWLCLLFFTFYILLENNNGILGISRIKLRLNQLLSHRGGEIRSK	(+98)	156
<i>T. ru</i>	MPQLIPFF-FFNQVVF-TLISLSFIFFVFS-KYILPWIVRLYVSRNQYNS-L.		48
<i>S. ce</i>	MPQLVPFY-FMNQLTYGFLLMITLLI-LFS-QFFLPMLRLYVSRLLFI-SKL.		48
<i>P. an</i>	MPQLVPFY-FVNEITFTFII-LAITVYILS-KYILPRFVRLFLSRTFI-SKLLG.		50
<i>Y. li</i>	MPQLVPFY-FTNQMFYGA-SLSVIVYLF-SMYILPHYTEMVYTRMFI-TKT.		48
<i>H. wi</i>	MPQLVPFY-FLNQLTYGFLLLI-ILLVLF-S-QFLLPRIILRYISRLFI-SKL.		48
<i>A. ma</i>	MPQLEPLY-FINSISWTYLA-FGITFVLVS-KVFLPLNLKTQMIRLTL-IQ.		47
<i>N. cr</i>	MPQLVPFY-FVNEITFTFVII-TLMVYILS-KYILPRFVRLFLSRTFI-SKL-SDI-SKK.		54

Figure 29 Alignement de séquences d'ATP8 de différents organismes

Seule la première partie de la protéine est représentée. Les nombres entre parenthèses indiquent le nombre d'acides aminés non montrés, les autres correspondent au nombre total d'acides aminés des protéines. Les points signalent la fin des gènes. Les espèces sont : α -protéobactéries : *R. ru* : *Rhodospirillum rubrum* (S01149) ; *R. ca* : *Rhodobacter capsulatus* (Y12313) ; *R. pr* : *Rickettsia prowazekii* (E71709) ; Protiste : *R. am* : *Reclinomonas americana* (S78156) ; Hétérocontes : *P. li* : *Pylaiella littoralis* (AF034976) ; *L. di* : *Laminaria digitata* (non publié) ; *C. sy* : *Chrysodidymus synuroideus* (AF222718) ; *P. in* : *Phytophthora infestans* (U17009) ; *C. ro* : *Cafeteria roenbergensis* (AF193903) ; Algues rouges : *C. me* : *Cyanidioschyzon merolae* (G58931) ; *P. pu* : *Porphyra purpurea* (T11232) ; *C. cr* : *Chondrus crispus* (Z47547) ; Amibe : *A. ca* : *Acanthamoeba castellanii* (S53808) ; Algue verte : *P. wi* : *Prototheca wickerhamii* (T11925) ; Champignons : *P. mi* : ; *M. po* : *Marchantia polymorpha* (M68929) ; *T. ae* : *Triticum aestivum* (X59153) ; *T. ru* : *Trichophyton rubrum* (S65035) ; *S. ce* : *Saccharomyces cerevisiae* (AJ011856) ; *P. an* : *Podospora anserina* (Q02653) ; *Y. li* : *Yarrowia lipolytica* (S51501) ; *H. wi* : *Hansenula wingei* (S58742) ; *A. ma* : *Allomyces macrogynus* (S63656) ; *N. cr* : *Neurospora crassa* (S44065).

- cox2

Le gène *cox2* de *P. littoralis* code une protéine de 1282 aa au lieu des 260 à 280 aa habituels. Cette différence est due à une insertion de 1006 aa, dans le cadre de lecture du gène. D'après un alignement de séquences de nombreuses protéines homologues, cette insertion est localisée entre les acides aminés 184 et 186 de la

séquence de la protéine COX2 de *Rickettsia prowazekii*, qui correspondent à une région variable selon les gènes. La taille des insertions va de 0 aa, chez certaines bactéries (*Rhodobacter sphaeroides*), à 30 aa chez d'autres (*Streptomyces coelicor*), avec des tailles intermédiaires, par exemple chez les hétérocontes *P. infestans* (7 aa) et *C. roenbergensis* (28 aa). L'insertion de *P. littoralis* ne présente aucune homologie avec des séquences connues (recherches infructueuses par BLAST, aussi bien x, que n ou p). En particulier, ni les séquences consensus des introns de groupe II, ni les structures secondaires typiques des introns de groupes I ou II, ni même les séquences caractéristiques des intéines n'ont été identifiées. Le seul motif potentiel repéré est une fermeture à leucine (*leucine-zipper*). D'après des expériences d'hybridations d'ADN sur ARNs totaux, avec trois sondes différentes, correspondant aux extrémités du gène *cox2* (1 et 3) et à l'insertion (2), le gène *cox2* est cotranscrit avec d'autres gènes l'entourant et n'est pas épissé au stade ARN (Figure 30, page 73). Ceci contraste avec les introns de groupe II du gène de l'ARNr 23S (Chapitre III.1.2.4, page 74), qui s'épissent très rapidement. En effet, par hybridation d'une sonde d'ADN, correspondant au gène de l'ARNr 23S, sur les ARNm totaux, seul un ARNm dont la taille correspond à la forme épissée du transcrit est détectable (Costa *et al.*, 1997 ; Fontaine *et al.*, 1995b).

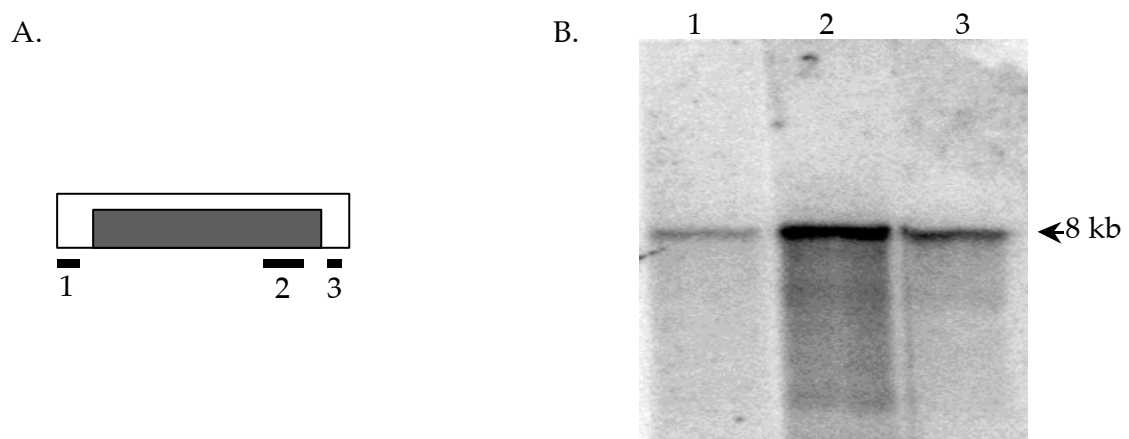


Figure 30 Hybridations de sondes d'ADN spécifiques au gène *cox2* de *P. littoralis* sur ARNs totaux

A. □ : cadre ouvert de lecture total ■ : insertion en phase ■ : sonde nucléotidique ; 1 : première partie du *cox2* ; 2 : insertion ; 3 : deuxième partie du *cox2* . B. Hybridation des trois sondes sur des transferts d'ARN.

Aucun gène du complexe II n'est codé dans le génome mitochondrial de *P. littoralis*, comme c'est le plus souvent le cas (Tableau IV, page 55). En effet, des sous-unités de la succinate déshydrogénase (SDH), ne sont codées que dans les mitochondries de *Reclinomonas americana* et des algues rouges, *Cyanidioschyzon merolae*, *Porphyra purpurea* et *Chondrus crispus*.

1.2.3.3. Les gènes de protéines inconnues

Comme la plupart des génomes mitochondriaux, celui de *P. littoralis* comprend des cadres ouverts de lecture (ORFs) ne correspondant à aucun gène connu. Il s'agit des ORFs 97, 127, 224, 237 et 261, le nombre d'acides aminés qu'ils codent détermine leur nom. Certains d'entre eux présentent des caractéristiques comparables à celles de gènes mitochondriaux, comme nous le verrons plus loin, alors que pour d'autres, des doutes sont émis quant à leur réalité, c'est-à-dire la possibilité qu'ils soient traduits en protéines, quand bien même ils seraient transcrits.

1.2.4. Les introns et leurs ORFs

Deux gènes comprennent des introns, le gène de l'ARN de la grande sous-unité ribosomique (23S) et le gène *cox1*. Ils sont tous de groupe II, mais de lignées différentes, IIA et IIB. Certains comprennent des ORFs.

- Les 4 introns de groupe IIB de l'ADNr 23S (Fontaine *et al.*, 1995b).

Les deux premiers comportent des ORFs affiliés à des transcriptases réverses.

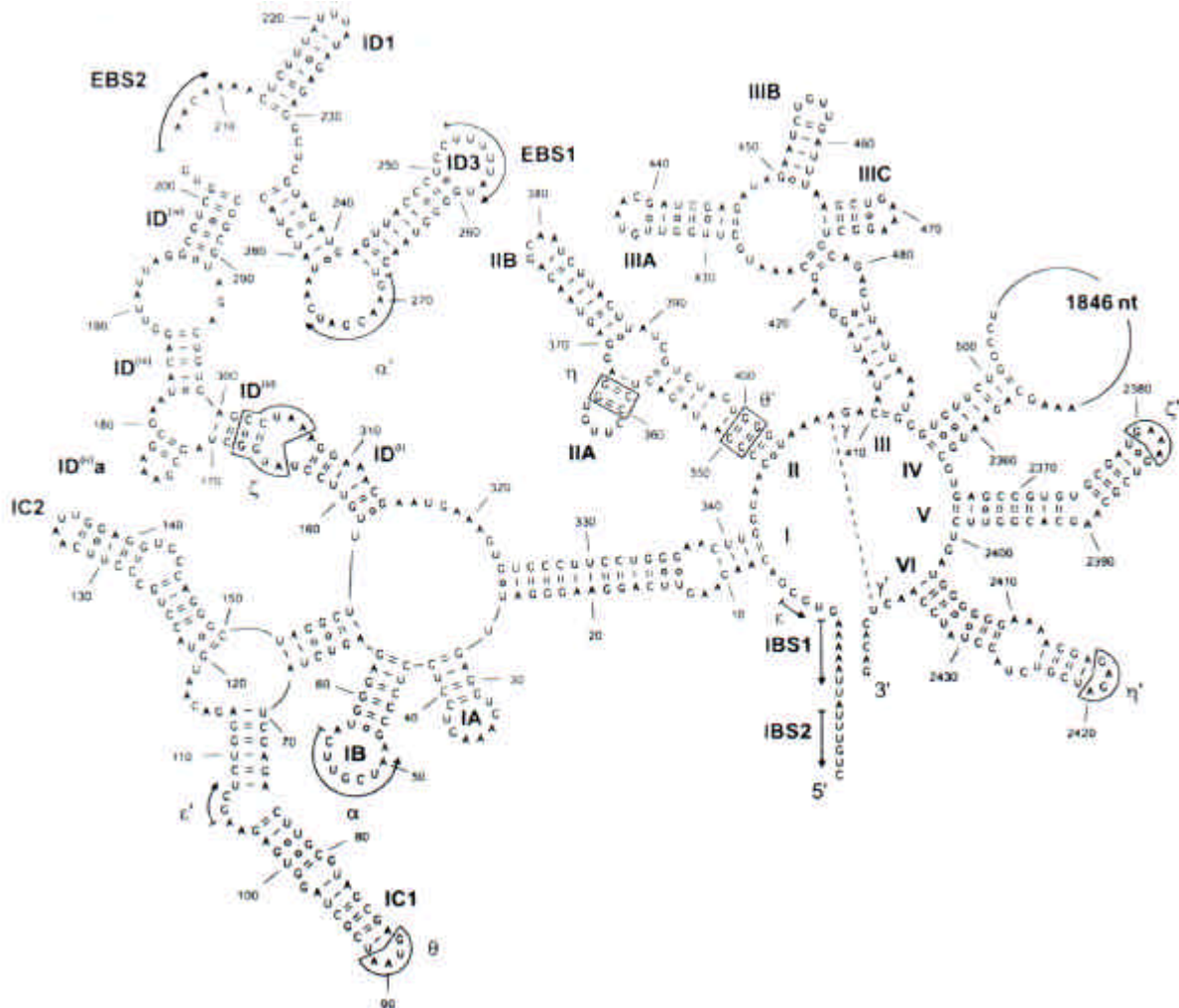
Le second intron de l'ADNr 23S est autoépissable, et beaucoup plus réactif que les autres introns de groupe IIB étudiés jusque là (Costa *et al.*, 1998 ; Costa *et al.*, 1997 ; Costa & Michel, 1999). Cet intron a probablement conservé des caractéristiques primitives perdues dans les autres introns qui ont dérivé.

- Les 3 introns de groupe IIA du gène *cox1* (Fontaine *et al.*, 1997).

Chacun comporte un ORF à plusieurs domaines, affiliés à des transcriptases réverses. D'après des analyses phylogénétiques (Figure 32), elles appartiennent à une lignée typiquement mitochondriale, qui est apparentée à deux ORFs d'introns trouvés dans le plasmide de catabolisme aromatique pNL1 de l' α -protéobactérie *Sphingomonas aromaticovorans* (Romine *et al.*, 1999).

Par contre, les ORFs affiliés à des transcriptases réverses des introns de groupe IIB de *P. littoralis* sont proches d'autres gènes homologues trouvés dans des introns de groupe II de génomes de cyanobactéries ainsi que dans les génomes

plastidiaux de l'algue verte *Scenedesmus obliquus* et du cryptophyte *Pyrenomonas salina* (Fontaine *et al.*, 1997), mais aussi dans le génome mitochondrial de l'algue rouge *Porphyra purpurea* (Burger *et al.*, 1999) et dans le plasmide pO157, d'une



souche entéro-hémorragique d'*Escherichia coli* (Makino *et al.*, 1998). Une explication plausible de cette étrange filiation peut être celle de transferts latéraux, réalisés par l'intermédiaire d'un vecteur inconnu, entre des organismes éloignés phylogénétiquement. Cela implique aussi que les deux types d'introns de groupe II ne sont pas obligatoirement transmis en même temps.

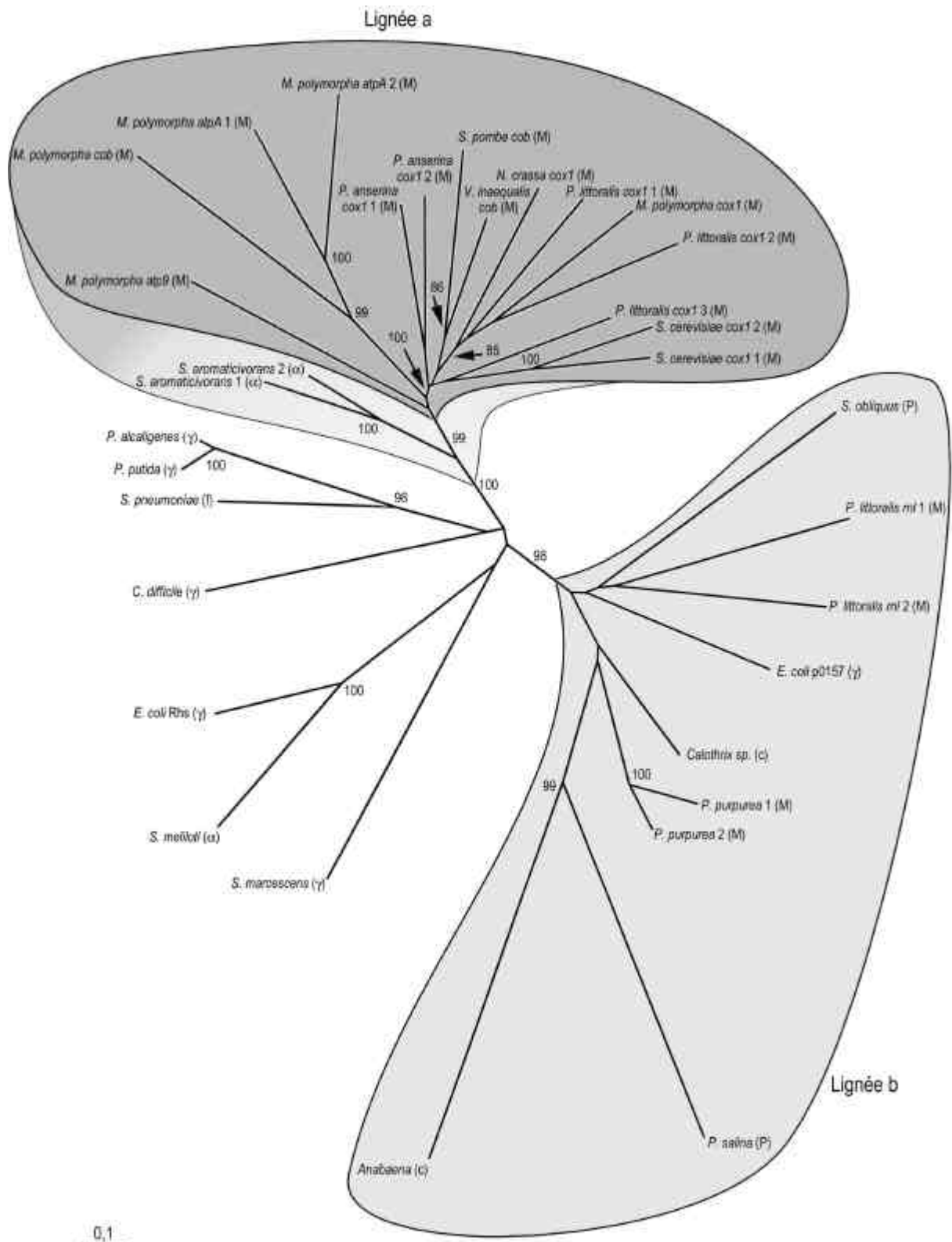
Figure 31 **Structure tertiaire du second intron de l'ADNr 23S de *P. littoralis***

Figure reproduite de Costa *et al.*, 1998.

Figure 32 **Arbre non raciné de valeurs de divergence entre des séquences d'acides aminés d'ORF d'introns de groupe II (→)**

Arbre obtenu par la méthode du plus proche voisin (*neighbour-joining*), à partir de 327 positions conservées. La barre d'échelle représente 0,1 substitution d'acide aminé par site. Seules les valeurs de *bootstrap* supérieures à 80 sont indiquées. M : mitochondrial, P : plastidial. Les espèces sont les suivantes (numéro d'accèsion) : α -protéobactéries : *Sinorhizobium meliloti* (Y11597) ; *Sphingomonas*

aromaticivorans, plasmide pNL1, *matRa* et ORF404 (AF079317); γ -protéobactéries : *E. coli*, plasmide p0157 (AB011549); *E. coli*, élément mobile *Rhs* (S50828); *Pseudomonas alcaligenes*, plasmide RP4 (U77945); *Serratia marcescens*, plasmide R471a, *RetA* (AF027768); *Pseudomonas putida*, plasmide pRA500, *matP1* (AF101076); Firmicutes : *Clostridium difficile*, transposon conjugatif (g1418413); *Streptococcus pneumoniae* NCTC11906 (g2804732); Cyanobactéries : *Anabaena* sp. PCC7120, ORF439 (U13767); *Calothrix* PCC7601 (S40013); Mitochondries : champignons : *Podospora anserina*, dans *cox1* (X55026); *Venturia inaequalis*, dans *cob* (AF004559); *Schizosaccharomyces pombe*, dans *cob* (x02819); *Saccharomyces cerevisiae*, a11 et a12 dans *cox1* (NC001224); *Neurospora crassa*, *cox1* (S07649); Mitochondries : algue rouge : *Porphyra purpurea*, ORF544 et 546 dans *rnl* (AF114794); algue brune : *Pylaiella littoralis*, ORF557 et 568 dans *rnl* (Z48620), ORF757, 795 et 748 dans *cox1* (Z72500); plante : *Marchantia polymorpha*, dans *atpA*, *atp9*, *cob*, *cox1* (M68929); Plastides : cryptophyte : *Pyrenomonas salina*, dans *cpn60* (S51490); algue verte : *Scenedesmus obliquus*, dans *petD* (P19593).



1.2.5. Motifs particuliers

1.2.5.1. Les régions promotrices

Comme nous l'avons vu précédemment (Chapitre I.3.3, page 35), il a été montré que la transcription des génomes mitochondriaux était réalisée par une ARN polymérase de type phagique. Cependant, neuf promoteurs de type bactérien (boîtes -35 et -10) ont été identifiés dans le génome mitochondrial de *P. littoralis* (Figure 33). Dans celui de *R. americana*, qui comprend les gènes de l'enzyme bactérienne, plusieurs promoteurs de ce type sont identifiables (S. Loiseaux de Goër, non publié).

Un article sur des promoteurs à facteur σ -70 de *P. littoralis* a été publié (Delaroque *et al.*, 1996). Des expériences d'extensions d'amorces avaient alors permis d'établir que certains d'entre eux pouvaient être fonctionnels.

TTGGAG	GTA-ATAAATAGATAATTG	TAATTT	<i>trnW</i>
TTGGAG	--ACCAAAGTTCTACCAAT	TGAACT	<i>tatC</i>
TTGTAG	ACAGGTTAGGTTCAAAATC	TTTTGT	<i>rpl14</i>
TTGAAG	AATTCCAAGATT--TTGTT	TGTGAT	<i>rps13</i>
TTGAAG	ATTTATAA-CTATATTACC	TATAAT	16S
TTGAAA	--AT-ATTTTTACGCTTTA	TACCTT	<i>trnS1</i>
TTGATT	TAATCAAGGGTTAATTGTT	TTTAGT	ORF261
TTGACT	GTGTCAAGCCTAGGCCA--	TAAATG	<i>rpl2</i>
TTGGCC	CCAGTCAGATTATTTTAAA	TTTTTT	<i>rpl31</i>
TTGACA	16-19 nt	TATAAT	Consensus
T₈₂T₈₄G₇₈A₆₅C₅₄A₄₅		T₈₀A₉₅T₄₅A₆₀A₅₀T₉₆	<i>E. coli</i>

Figure 33 Promoteurs de *P. littoralis*

Figure de l'article 3, Annexe 11. Alignement de régions promotrices eubactériennes putatives du génome mitochondrial de *P. littoralis*. Les numéros sous le consensus réfèrent aux occurrences en pourcentage, des bases le plus souvent rencontrées dans les promoteurs de *E. coli* (Lewin, 1994).

Un alignement de la région du promoteur du gène de l'ARNr 16S de *P. littoralis* avec une séquence similaire en amont du gène *nad2* de *R. americana* et plusieurs autres séquences d'eubactéries (Figure 34, page 79), montre des caractéristiques conservées, en amont des boîtes -35. Elles comprennent le motif TGTx₆₋₁₂ACA, déjà décrit dans de nombreuses régions régulatrices de protéobactéries (Buck *et al.*, 1986 ; Gicquel-Sanzey & Cossart, 1982 ; Pemberton *et al.*, 1998). Certaines de ces séquences peuvent se replier en deux épingles à cheveux différentes, chacune commençant dans l'hexamère TTTTGT.

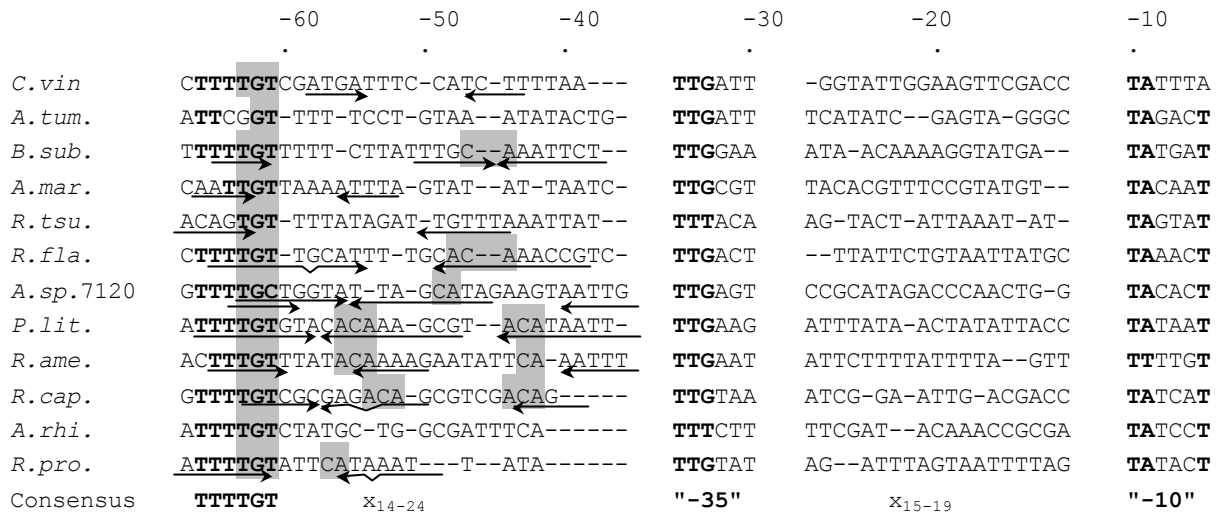


Figure 34 Comparaisons de promoteurs de *P. littoralis* et d'autres organismes

Figure de l'article 3. Alignement de régions promotrices putatives de génomes d'eubactéries et de mitochondries, montrant des motifs conservés. Les espèces sont : *C. vin.* : *Chromatium vinosum* (γ -protéobactérie, *rbcl*, D90204); *A. tum.*: *Agrobacterium tumefaciens* (α -protéobactérie, ORF1 en amont de la région *virD*, M17989); *B. sub.*: *Bacillus subtilis* (Bactérie Gram+, *secA*, D10279); *A. mar.*: *Anaplasma marginale* (α -protéobactérie, facteur de transcription potentiel, M32868); *R. tsu.*: *Rickettsia tsutsugamushi* (α -protéobactérie, *tsr56*, M63380); *R. fla.*: *Ruminococcus flavefaciens* (Bactérie Gram+, *endA*, S55178); *A. sp.*: *Anabaena sp.* (Cyanobactérie, facteur de transcription, U14596); *P. lit.*: *Pylaiella littoralis* (hétéroconte, *rns*); *R. ame.*: *Reclinomonas americana* (bicosoecide, *nad2* mitochondrial, AF007261); *R. cap.*: *Rhodobacter capsulatus* (α -protéobactérie, *crtI*, X52291); *A. rhi.*: *Agrobacterium rhizogenes* (α -protéobactérie, *virA*, X51418); *R. pro.*: *Rickettsia prowazekii* (α -protéobactérie, *dnaG*, U02878). Les flèches indiquent des tiges bouclées potentielles et des palindromes. Les régions régulatrices potentielles TGT et ACA sont surlignées.

Les promoteurs qui se font face, devant les opérons ribosomiques en sens inverse *rps2-rps19-rps3-rpl16* et *rps13-rps11*, peuvent interagir durant la transcription, comme cela a été postulé pour d'autres organismes (Beck & Warren, 1988).

1.2.5.2. Origine de réplication

Les origines de réplication des génomes mitochondriaux sont connues principalement chez les champignons et les animaux (Lecrenier & Foury, 2000). Chez certains organismes, comme des algues rouges, des structures similaires sont identifiées (Leblanc *et al.*, 1995). Aucune structure comparable à ce qui a été décrit précédemment dans la littérature n'existe dans le génome mitochondrial de *P. littoralis*.

1.2.6. Organisation des gènes entre eux

1.2.6.1. Chevauchements de gènes

Sur les 72 gènes que code la partie typiquement mitochondriale du génome de *P. littoralis*, 30 se chevauchent, soit 15 paires de recouvrement, de 1 à 24 nt, entre 2 gènes.

Plusieurs cas peuvent être caractérisés :

- 1 seul nucléotide : A
Le dernier nucléotide du codon stop, toujours TAA ici, est le premier du codon de début, ATG.
2 cas dans le sens principal : *rpl6 / rps2* et *nad9 / cob*.
1 cas dans le second sens : ORF127/*rpl16*.
- Début / stop en 4 nucléotides : ATGA
2 cas dans le sens principal : *rps8 / rpl6* et *nad3 / rps14*.
- Début / stop en 7 à 16 nucléotides : ATG...A
1 cas : ATG_nTGA, dans le sens principal : *rps12 / rps7*.
6 cas ATG_nTAA :
5 cas dans le sens principal : *cox2 / nad4*, *rps13 / rps11*, *rps2 / rps4*,
nad11 / nad3 et *nad5 / nad6*.
1 cas dans le second sens : *rpl2 / rps19*.
- Stop / stop : → TCA.....TAA (Fin *nad1*)
(Fin *tatC* = TGA) AGTATT.....←
1 cas, 24 nt : *tatC / nad1*.
- Début d'un gène d'ARNt impliqué
2 cas : 5S/*trnfM*, *rpl5 / trnG*.

1.2.6.2. Les espaces intergéniques

Ils représentent 4,8 % du génome considéré, ce qui correspond à un génome compact. Ils sont généralement courts, bien que le plus long compte 545 nt, mais 6 seulement ont plus de 100 nt. Les deux espaces intergéniques les plus longs encadrent un groupe de 3 ORFs (voir Figure 18 page 58), l'ensemble constituant une région riche en GC, qui est susceptible de se replier en structures secondaires. La taille moyenne des espaces intergéniques est de 49 nt.

1.3. La région comprenant une ARN polymérase de type phagique

Je traite de cette région à part car, de par son organisation – encadrée par un jeu de répétitions inverses – et les caractéristiques des gènes qu'elle code – une ARN polymérase de type phagique et des ORFs inconnus – elle n'est vraisemblablement pas d'origine mitochondriale.

1.3.1. Le jeu de répétitions

Dans l'article décrivant cette région (Rousvoal *et al.*, 1998, Annexe 9), seules les principales répétitions inverses étaient décrites. La découverte des autres répétitions nous a conduit à faire de nouvelles vérifications des zones charnières, par amplifications et séquençage des régions directement en amont et en aval des répétitions. Cela nous a conduit à une modification de la séquence, réduisant l'ORF104 à un ORF64. L'ORF158 chevauchait l'ORF121 de 82 nt, alors qu'un second ATG réduisait le chevauchement à 4 nt. C'est l'option qui a finalement été adoptée dans l'article sur la séquence complète (Oudot *et al.*, soumis, Annexe 11), d'où un ORF132 au lieu de 158.

Toutes les répétitions sont représentées Figure 35. Il apparaît que plusieurs modules arrangés différemment se retrouvent répétés, dans le même sens ou en sens inverse, en 2 ou 3 exemplaires.

Les premières répétitions observées, encadrant l'ensemble de la zone, faisaient penser à un plasmide linéaire qui se serait intégré. La situation plus complexe qui s'est avérée par la suite est plus difficile à interpréter. L'existence de la répétition inverse dans l'intron 3 du gène de l'ARNr 23S est également surprenante : serait-elle le témoin de l'arrivée concomitante de ces deux séquences ou seulement celui d'un réarrangement au sein de la molécule d'ADN mitochondrial de *P. littoralis* ?

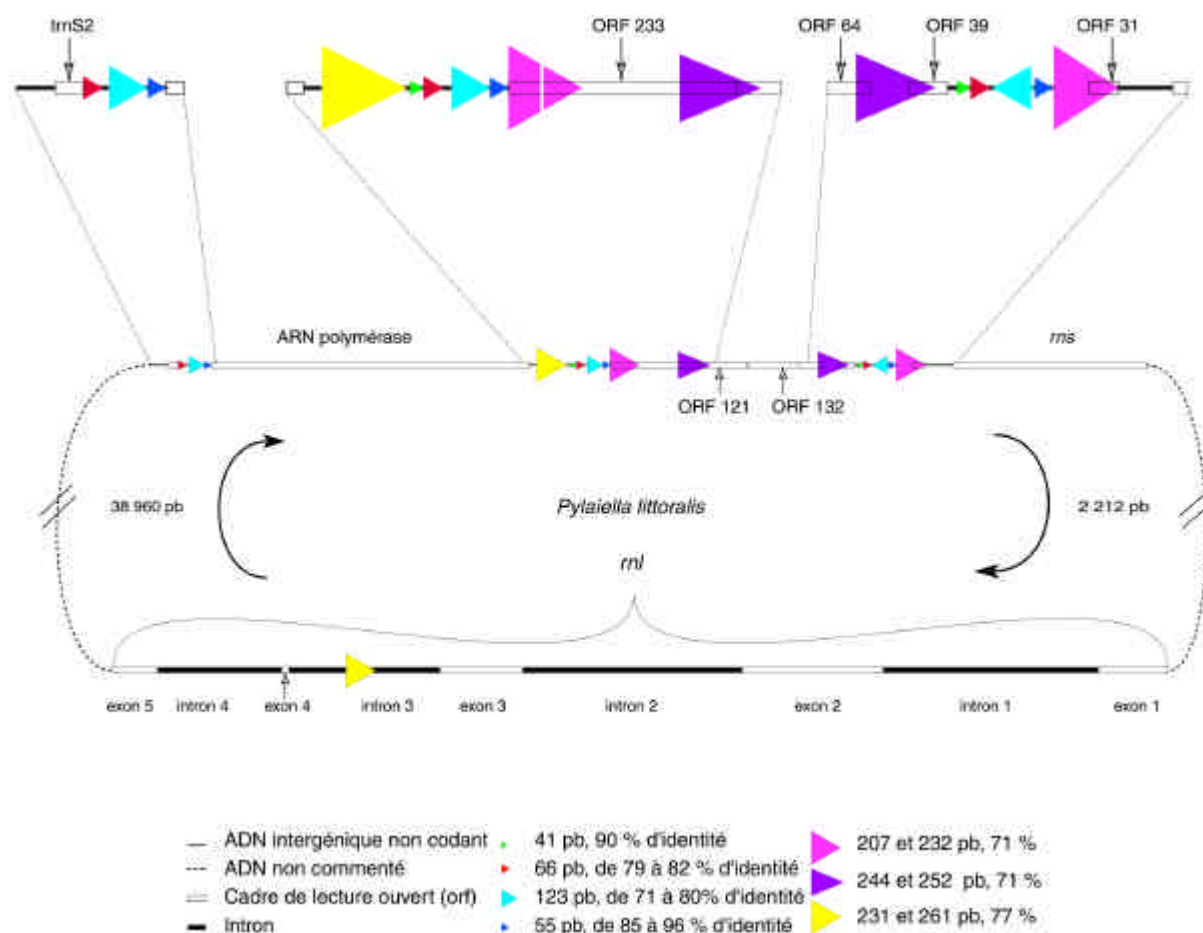


Figure 35 **Représentation schématique des répétitions de la région de l'ARN polymérase**

Figure de l'Article 1, Annexe 9.

1.3.2. L'ARN polymérase

Le gène de l'ARN polymérase code une protéine de 824 aa qui contient 10 des 11 domaines caractéristiques de cette enzyme, ainsi que les résidus catalytiques (Figure 36 page 83). Des expériences d'amplification d'ADNc (RT-PCR) ont montré que le gène était transcrit. Aucun gène nucléaire n'a été mis en évidence par hybridation avec une sonde d'ADN spécifique au gène mitochondrial sur de l'ADN total enrichi en nucléaire, seul le gène mitochondrial lui-même était révélé (Annexe 9).

<i>P.lit.Mit</i>	0	-	MTKKIQIDNIKLN	-40-	KLTTNPLPYLG-QVN	-35-	LLT-AISLTILTCLFHKAS
<i>A.tha.NuM</i>	245	-	IGEAVE-QEVRIN	-74-	RLI-QLLMENA-YIQ	-55-	VIP-YLPMLIPPQNW--TG
<i>S.cer.NuM</i>	537	-	VGKAIEME-FRSE	-60-	VLIS-MLIQVA-KVS	-52-	VQPQLLPMLEPKPWN--
<i>H.sap.NuM</i>	508	-	FSRHVVQRQ-RV-	-57-	KLLAEMLVQAT-QM-	-51-	FEAVDVPMLCPPLPW--TS
SP6 phage	110	-	VAERIE-DQVRFS	-60-	TLL-EIL-EGSVFYN	-42-	--A-YAPCVIPPRPWR-TP
T7 phage	140	-	IGRAIE-DEARFG	-62-	RCI-EMLIESTGMV-	-36-	ISPMFQPCVVPKPKW--TG
<i>Z.may.plM</i>	289	-	---KIEYN--RII	-62-	EV-KKPVFLF-DKKN	-56-	SDP-YITNLTPLSSYR---
			domaine 1		domaine 2		domaine 3
<i>P.lit.Mit</i>	-25-	QRD-KEIYKEEND-GE-KTKL-KK	-61-	EW-VEVAKQY--ENT-FTCLPM-L---	CPPLT		
<i>A.tha.NuM</i>	-30-	KEQLEPVYEALDTLGNTKWKINKK	-62-	ELKLEVARKMKDEEGFYYPHNVDPRGRAYPIH			
<i>S.cer.NuM</i>	-30-	NGDIDRVYDGLNVLGRTPWTVNRK	-61-	NYKLEIARAFLEGEK-LYFPHNLDPRGRAYPLS			
<i>H.sap.NuM</i>	-34-	---LHGALDALTQLGNCARVNGR	-67-	LYRLSLAQHLR-DRVFWLPHNMDFRGRTPPCP			
SP6 phage	-28-	QKQMPKVYKAINALQNTQWQINKD	-82-	VRMVGQARKYSAFESIYFVYAMDSRSRVYVQS			
T7 phage	-29-	DVYMPEVYKAINIAQNTAWKINKK	-65-	EFMLEQANKFANHKAIWFYPYMDWRGRVYAV-			
<i>Z.may.plM</i>	-19-	EKDY-GVFD-----IHIDRE	-24-	DF-IQ--KHWS-----VLVSVGL-LRPKN--LA			
			domaine 4		domaine 5		
<i>P.lit.Mit</i>	17-	G-INLRGGGYLTDSEIQK-N-KT	-42-	NKLLIPNYKESY-MVAQQTRKEY	-4-	FKTR	
<i>A.tha.NuM</i>	0-	PYLN-HLGSDLRCGILEFCEGKP	-50-	KRWVL-NAEDPFQCLA--ACINL	-11-	AISH	
<i>S.cer.NuM</i>	0-	PHFN-HLGNDMSRGLLIFWHGK-	-49-	DRWWTT-ADKPWQALA--TCFEL	-11-	FISH	
<i>H.sap.NuM</i>	0-	PHFN-HLGSDFVARALLEFAQGRP	-49-	RKWWMG-AEEPWQTLA--CCMEV	-11-	YVSH	
SP6 phage	0-	STLSPQ-SNDLGKALLRFTEGRP	-51-	TQ-W-AKADAPYEFLA--WCFEY	-14-	FRTH	
T7 phage	0-	SMFNPQ-GNDMTKGLLTAKGKP	-46-	ENTWWAEQDSPFCFLA--FCFEY	-9-	YNCS	
<i>Z.may.plM</i>	0-	-LFKRKEALRLLSLLFK-HEE-	-37-	-KIYFPIFLD-FR--GRNYRH--	-13-	LIIF	
			domaine 5		domaine 6		
<i>P.lit.Mit</i>		RAEEHDSATNYLAE-TDFAID-IADKLQGLDLHFAVRHDGRG-RIY	-22-	DYYFSKKTDRNWE			
<i>A.tha.NuM</i>		IPIHQDQDSCNGLQHYAALGRDKLGA--DAVNLVTG---E-KPADVY	-35-	DRKLVKQT----VM			
<i>S.cer.NuM</i>		QPVHQDGTGTCNGLQHYAALGGDVEGAT-Q-VNLVPS---D-KPQDVY	-30-	TRKVVVKQT----VM			
<i>H.sap.NuM</i>		LPVHQDQDSCNGLQHYAALGRDSVGAAS--VNLPS---DV-PQDVY	-29-	TRKVVVKQT----VM			
SP6 phage		LPVHQDQDSCSGIQHYSAAMLREDEVA--KAVNLKPS---DA-PQDIY	-47-	TRSLTKKP----VM			
T7 phage		LPLAFDQDSCSGIQHFSAMLREDEVG--RAVNLLPS---ET-VQDIY	-54-	TRSVTKRS----VM			
<i>Z.may.plM</i>		D-ESDDSAHTIYR--E-ALEFIYNKIEDMQSKPTF---FE-KDIF	-23-	TKDLSVLR----Y-			
			domaine 7		domaine 8		
<i>P.lit.Mit</i>	SLVL	-256-	NTRKIKRATLPNFIHHIDSLLAHLVI	-5-	LKPLFTVHD	AFYVR-----LIDM	
<i>A.tha.NuM</i>	TSVY	-108-	MARRQMTAFAPNFIHSLDG--SHMMM	-9-	L-SFAGVHD	SFWTHACDVIDMN-	
<i>S.cer.NuM</i>	TNVY	-125-	NARRQKAGLPPNFIHSLDA--SHMLL	-9-	LD-FASVHD	SYWTHASDIDTMNV	
<i>H.sap.NuM</i>	TVVY	-111-	NTRKQKNGFPPNFIHSLDS--SHMML	-9-	L-TFVSVHD	CYWTHAADVSVMNQ	
SP6 phage	TLPY	-131-	DEAAMMGAAAPNFVHGDA--SHLIL	-9-	VTSLIAVHD	SFGTHADNTLTLRV	
T7 phage	TLAY	-130-	DAHKQESGIAPNFVHSDQG--SHLR-	-11-	IESFALIH	SFGTIPADAANLFK	
<i>Z.may.plM</i>	TPVF	-208-	DIRKSSTSTFANFIHQKDAFTA-IQL	-11-	SIPYIAVHD	NFITMP-EYASILP	
			domaine 10		domaine 11		
<i>P.lit.Mit</i>	AFLKEAYFQA	-45-	NWMITREAVDFKRPRSNRILS.	(819	acides aminés)		
<i>A.tha.NuM</i>	TVLREKFVEL	-29-	DFDL-RKYLE-----STYFFN.	(976	acides aminés)		
<i>S.cer.NuM</i>	-VLREQFIKL	-124-	DFDVT--VLR----NSQYFFS.	(1351	acides aminés)		
<i>H.sap.NuM</i>	-VCREQFVRL	-41-	AFDL-EQV-K----RSTYFFS.	(1230	acides aminés)		
SP6 phage	A-LKGQMVAM	-30-	EFDL-NEIMD-----SEYVFA.	(874	acides aminés)		
T7 phage	A-VRETMVDT	-33-	NLNL-RDILE-----SDFafa.	(883	acides aminés)		
<i>Z.may.plM</i>	TLYRDSIFRM	-140-	NGTQA-DSLD-KGEDDYCIHY.	(1098	acides aminés)		

Figure 36 **Alignement des séquences d'acides aminés déduits de l'ARN polymérase de type phagique de *P. littoralis* avec des gènes homologues d'autres organismes**

Les séquences traduites incluses dans cet alignement sont celles de gènes nucléaires codant les ARN polymérases mitochondriales d'*Arabidopsis thaliana* (Hedtke *et al.*, 1997), de *Saccharomyces cerevisiae* (Masters *et al.*, 1987) et d'*Homo sapiens* (Tiranti *et al.*, 1997), ainsi que des gènes d'ARN polymérase des phages SP6 (Kotani *et al.*, 1987) et T7 (Grachev & Pletnev, 1984) et des plasmides mitochondriaux S2 de *Zea mays* (Levings, 1983 ; Kuzmin, 1988). Seuls les domaines plus ou moins conservés sont montrés, numérotés comme dans Oeser, 1988. La séquence de *P. littoralis* est la plus courte et commence juste avant le domaine I. Les acides aminés D537 et HD811-812 (numérotation

à partir du gène de T7), en caractères gras, sont les résidus catalytiques critiques pour la fonction de polymérase (voir Sousa *et al.*, 1993). Figure de l'Annexe 9.

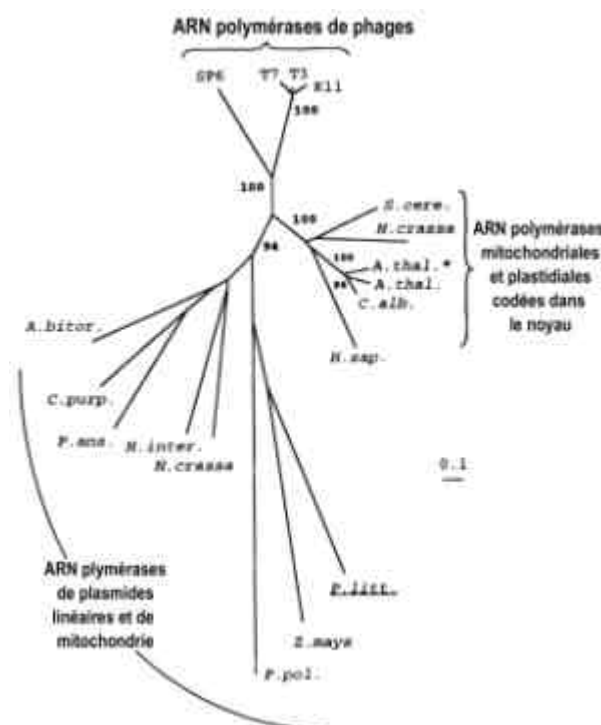


Figure 37 Arbre phylogénétique non raciné construit à partir d'un alignement de régions conservées de séquences d'acides aminés d'ARN polymérases de type phagique

465 positions ont été utilisées. Les numéros d'accension des séquences utilisées en plus de celles de la Figure 36 (page 83) sont indiqués à la suite des noms d'espèces. Séquences d'acides aminés déduits des gènes des ARN polymérases des phages T3 (X02981) et K11 (X53238), de l'ARN polymérase mitochondriale codée dans le noyau de *Chenopodium album* (Y08067), *Neurospora crassa* (L25087), de l'ARN polymérase plastidiale codée dans le noyau d'*A. thaliana*, indiquée par une astérisque (Hedtke *et al.*, 1997), et des gènes des plasmides linéaires des champignons *Physarum polycephalum* (ORF1130, D29637), *Saccharomyces kluyveri* (X54850), *Podospora anserina* (X60707), *Claviceps purpurea* (X15648), *Neurospora crassa* (X55361), *Neurospora intermedia* (Z52106) et *Agaricus bitorquis* (X63075). La topologie de cet arbre est identique à celle de l'arbre le plus parcimonieux obtenu à partir du même alignement. Les valeurs de *Bootstrap* supérieures à 90 sont indiquées. Figure de l'Annexe 9.

La Figure 38, page 85 représentent les scénarios possibles de l'évolution de la transcription des génomes mitochondriaux.

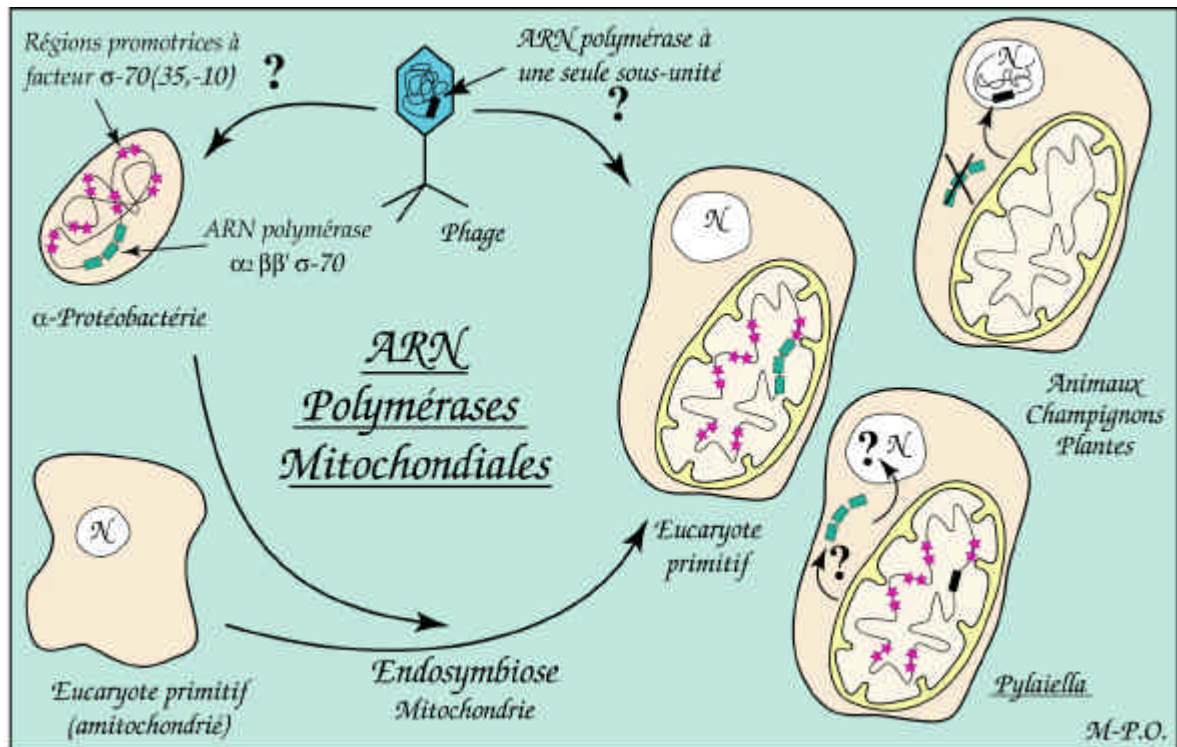


Figure 38 Scénario possible de l'évolution de la transcription dans les mitochondries

Figure de l'Annexe 9.

1.3.3. Les gènes de protéines inconnues

Six ORFs de plus de 30 codons ont été identifiées en aval du gène de l'ARN polymérase. Seule l'ORF132 n'est pas du tout impliquée dans le jeu complexe de répétitions. Dans le cas des autres ORFs, des portions entières sont conservées, au niveau de certaines répétitions.

1.3.4. Les espaces intergéniques

Les espaces intergéniques de cette région sont principalement compris dans les répétitions. Ils représentent 25 % de cette partie. Beaucoup plus longs que les intergènes mitochondriaux, puisqu'ils comptent 291 nt en moyenne et que sur 5, 4 ont une taille supérieure à 100 nt.

1.4. Analyse comparative des différentes régions

La séparation en "mitochondrial" et "non-mitochondrial", que j'ai choisi d'adopter pour présenter l'ensemble du génome mitochondrial de *P. littoralis*, est justifiée, outre son côté caricatural, par deux paramètres d'analyse des séquences, au moins.

1.4.1. Pourcentage en bases (A+T)

La comparaison des contenus en bases de génomes différents a permis de constater que les génomes organitiques étaient plus riches en (A+T) que les génomes nucléaires. C'est la particularité mise à profit pour séparer l'ADN nucléaire de celui des organites (Chapitre II.2.4.2, page 45). Cette caractéristique s'amplifie dans les génomes mitochondriaux qui ont le plus évolué, c'est-à-dire qui sont les plus dérivés par rapport aux génomes bactériens, de même chez ces derniers dans la majorité des cas de bactéries parasites (Campbell *et al.*, 1999). Le plus souvent, dans les génomes mitochondriaux des protistes, le pourcentage en (A+T) est supérieur pour les régions non codantes, que pour les régions codantes (Gray *et al.*, 1998).

Le contenu moyen, de l'ensemble de la molécule d'ADN mitochondrial de *P. littoralis* en (A+T), 62,0 %, gomme des différences locales (Tableau VIII).

Les gènes codant des ARNs, ribosomiques et de transferts, comprennent respectivement 56,5 % et 52,1 % de (A+T). Cette caractéristique des ARNs s'explique par le fait que les repliements de ces molécules ont une énergie libre d'autant plus grande que des paires G-C les stabilisent fortement. Les introns et leurs transcriptases réverses ont un contenu moyen en (A+T) de 58,6 %, qu'ils soient de groupe IIA ou IIB, et en dépit du fait que les gènes dans lesquels ils sont insérés ont des proportions de (A+T) différentes, 60,6 % pour *cox1* et 56,4 % pour le 23S.

Les gènes codant les protéines mitochondriales ont un contenu en (A+T) qui varie entre 60 et 70 %. Les espaces intergéniques ont en moyenne 71 % de (A+T).

Les ORFs 97 et 237 ainsi que les espaces qui les encadrent (les deux plus grands), ont des contenus en (A+T) atypiques, soit, respectivement, 53,1 % et 58,7 % pour les ORFs, et 65,3 % pour les régions intergéniques. Ces valeurs nous font penser que ces ORFs n'en sont pas, c'est-à-dire que même si elles sont transcrites, elles ne sont sans doute pas traduites mais auraient plutôt un rôle en tant qu'ARNs. Plusieurs repliements sont possibles dans cette région. Nous avons cherché s'il pouvait s'agir de l'ARN de la RNase P, mais aucun motif conservé, même limité aux quelques nucléotides considérés comme indispensables (Chen & Pace, 1997 ; Lang *et al.*, 1997) n'a pu être identifié. De même, bien

qu'un bras potentiel d'ARNt existe, les autres structures caractéristiques des ARNtm ne sont pas présentes (communication personnelle de Williams K., voir Keiler *et al.*, 2000).

Tableau VIII Pourcentages en (A+T) par régions du génome mitochondrial de *P. littoralis*

Gène / Région					% (A+T)		
Partie mitochondriale	Sans les introns	Gènes codant des ARNs	ARNt	52,1	55,2	63	
			ARNr (<i>rnl+rns+rn5</i>)	56,5			
		Gènes codant des protéines	Toutes les protéines mitochondriales (aucun ORF)	64,3	64,4		
		Les ORFs mitochondriaux	ORF127	69,8	60,1		
			ORF97	53,1			
			ORF224	64,1			
			ORF237	58,7			
			ORF261	60,6			
	Les entre-gènes			70,6			
	Les gènes avec des introns	<i>rnl</i>	le gène lui-même	56,4		58,8	Introns et région du gène de l'ARN polymérase
			les ORFs des introns	59,4	58,1		
			les introns sans les ORFs	58,1			
		<i>cox1</i>	le gène lui-même	60,6		58,8	
			les ORFs des introns	58,6	58,4		
			les introns sans les ORFs	55,4			
Région du gène de l'ARN polymérase	<i>rpo</i>			65,0	63,8	60,1	
	ORFs			63,0			
	Entre-gènes			62,9			

Dans le cas de la région de l'ARN polymérase, la valeur moyenne est de 63,8 %, ce qui est proche de la valeur comparable du génome mitochondrial, soit toute la partie mitochondriale exceptée les gènes d'ARNs, 64,4 %. Cette valeur ne gomme pas, cette fois, des différences importantes : 65,0 % (A+T) pour l'ARN polymérase, 63,0 % pour les ORFs et 62,9 % pour les régions intergéniques. Celles-ci n'ont donc pas une composition

moyenne en bases (A+T) différente des gènes qu'elles séparent, ce qui peut poser la question de la réalité des ORFs en tant que régions codant des protéines.

La région de l'ARN polymérase a une composition en bases (A+T) homogène, quelle que soit le type de région (codant protéine/entre gène) contrairement au reste du génome mitochondrial de *P. littoralis*, comme cela vient d'être montré.

Au cours de l'évolution, le contenu en bases (A+T) a tendance à s'homogénéiser dans une molécule d'ADN (Lawrence & Ochman, 1998). Ainsi, les différences de composition constatées entre les introns et les gènes dans lesquels ils sont insérés, par exemple, peut être le reflet soit de leur invasion récente, soit de l'évolution lente de ceux-ci ou de la molécule dans son ensemble.

1.4.2. Usage des codons et biais de la troisième position

L'usage des codons en lui-même ne semble pas révéler de biais particulier. Tous les codons sont utilisés dans les deux grandes parties de la molécule. Les trois codons stop sont utilisés, avec une préférence pour TAA (73,6 %) par rapport à TGA et TAG (13,2 % chacun). Par contre, un biais très important apparaît quand on considère le nucléotide en troisième position des codons. Il est connu que le T est souvent préféré (Unseld *et al.*, 1997) à plus de 30 % en 3^e position des codons des gènes mitochondriaux de plantes. Dans le cas de *P. littoralis*, cette tendance est très forte, elle est de plus à moduler, selon le sens de transcription des gènes. En effet, dans le cas des gènes codés dans le sens minoritaire, c'est le A qui est préféré en fin de codon, ce qui va dans le sens d'une différenciation de la composition de base des deux brins d'ADN. Ainsi, seulement 5 gènes mitochondriaux ont une utilisation du T (ou du A) inférieure à 40 %, elle est chez eux de 37 ou 38 % (Tableau IX). Les ORFs des introns ont une utilisation plus faible du T en 3^e position, soit 31 % pour ceux du gène *cox1* et 32 % pour ceux du 23S.

Les autres ORFs "mitochondriales" présentent des utilisations variées du T (ou du A). Les ORFs 224, 261 et 37 sont crédibilisées par, respectivement 50 %, 44 % et 37 %, alors que les ORFs 237 et 97 peuvent être mises en doute, avec respectivement 34 % et 24 %.

Dans la région de l'ARN polymérase, seuls deux ORFs, 121 et 39 ont une utilisation du T en 3^e position de type mitochondrial, avec 43 % chacune. Pour les autres, elle est de 28 % à 33 %, et 29 % pour l'ARN polymérase elle-même.

Tableau IX **Distribution des nucléotides TCAG en 3^e position dans les codons des gènes et ORFs codés par l'ADN mitochondrial de *P. littoralis* et les codons stop**

Les grisés verticaux horizontaux signalent les gènes codés sur le second brin. Les grisés ponctuels les plus foncés mettent en évidence les pourcentages d'utilisation du T (ou du A, voir texte) supérieurs à 40 %, les plus clairs correspondent aux pourcentages de 37 à 39 %. La région du gène de l'ARN polymérase est indiquée en caractères gras.

Gènes	3 ^e position des codons				Codons stop
	T	C	A	G	
ORFs des introns de <i>rnl</i>	32	19	29	20	TAA,TAA
<i>atp9</i>	50	9	30	11	TAA
<i>rps8</i>	43	10	34	13	TGA
<i>rpl6</i>	46	10	30	13	TAA
<i>rps2</i>	42	8	35	15	TAA
<i>rps4</i>	42	14	27	17	TAG
<i>nad1</i>	48	12	23	17	TAA
<i>tatc</i>	33	19	38	10	TGA
ORF261	44	12	20	24	TAG
ORF237	34	17	29	20	TAA
ORF97	24	16	31	29	TAA
<i>rps12</i>	37	8	44	11	TGA
<i>rps7</i>	42	10	34	14	TAA
<i>nad4L</i>	53	9	24	14	TAA
<i>rpl14</i>	38	8	36	18	TAA
<i>rpl5</i>	48	9	25	18	TAA
ORF127	33	16	37	15	TAG
<i>rpl16</i>	29	13	46	12	TAA
<i>rps3</i>	33	11	41	15	TAA
<i>rps19</i>	26	15	51	9	TAA
<i>rpl12</i>	33	15	38	13	TAA
<i>rps13</i>	42	17	26	16	TAA
<i>rps11</i>	45	7	34	14	TAA
<i>cox3</i>	45	12	24	19	TAG
<i>atp6</i>	50	10	22	18	TAG
<i>nad2</i>	47	12	27	14	TAA
<i>cox1</i>	47	15	20	18	TAA
ORFs des introns de <i>cox1</i>	31	22	27	20	TAG, TAA, TAA
<i>nad9</i>	46	10	28	16	TAA
<i>cob</i>	47	14	26	13	TAA
<i>cox2</i>	51	12	22	15	TAA
<i>cox2</i> insert	39	10	37	15	
<i>nad4</i>	45	14	25	16	TAG
<i>nad5</i>	49	11	24	15	TAA
<i>nad6</i>	43	14	28	15	TAA
<i>nad11</i>	46	14	27	13	TAA
<i>nad3</i>	55	10	23	12	TGA
<i>rps14</i>	38	9	37	15	TAA
<i>atp8</i>	46	11	25	18	TAA
<i>rps10</i>	42	6	36	17	TGA
<i>rpl31</i>	46	6	39	10	TAA
<i>rpo</i>	29	18	37	15	TAA
ORF233	33	17	31	19	TAA
ORF121	43	12	22	22	TGA
ORF132	29	20	35	16	TAA
ORF64	32	25	29	14	TAA
ORF39	43	13	30	15	TAA
ORF31	28	16	28	28	TAA
ORF224	50	15	18	17	TAA
<i>nad7</i>	47	9	27	17	TGA

Ce critère semble corrélér le parti pris de discrimination entre les deux grandes régions de la molécule d'ADN mitochondrial de *P. littoralis*.

1.5. Les résultats négatifs

Dans cette partie, je voudrais signaler des expériences qui ont été faites mais dont les résultats négatifs ne permettent pas de tirer des conclusions définitives. Il peut toutefois être intéressant de savoir ce qui n'a pas été concluant, afin d'envisager d'autres expériences.

1.5.1. Des amplifications

1.5.1.1. Second domaine du gène *nad11*

La présence d'un gène *nad11* "tronqué" au niveau du premier domaine, dans le génome mitochondrial de *P. littoralis* nous a fait nous interroger sur l'existence d'un second domaine, seul ou faisant partie d'un gène *nad11* complet, dans le génome nucléaire.

Afin de vérifier cette hypothèse, j'ai dessiné des amorces dégénérées (GARGARTGGATHWSNGAYAA en sens, et TCNCCRTCRTGNCCYTGRTA en sens complémentaire) à partir d'un alignement de séquences de six gènes *nad11*, aussi bien mitochondriaux (*Acanthamoeba castellanii* et *Dictyostelium discoideum*) que nucléaires (*Neurospora crassa*, *Solanum tuberosum*, *Bos taurus* et *Homo sapiens*) et du gène homologue d'une α -protéobactérie (*Paracoccus denitrificans*).

Un contrôle positif concluant a été réalisé avec un plasmide contenant le gène *nad11* de la pomme de terre (don de A. Rasmusson), mais nous n'avons pas pu mettre en évidence le deuxième domaine dans le génome nucléaire.

1.5.1.2. ARN polymérase de type phagique

Nous avons tenté d'amplifier une ARN polymérase de type phagique dans le génome nucléaire de *P. littoralis*, après la publication de *Sequences homologous to yeast mitochondrial and bacteriophage T3 and T7 RNA polymerases are widespread throughout the eukaryotic lineage* (Cermakian *et al.*, 1996). Les auteurs ont obtenu des amplifications avec 8 espèces alors qu'avec 16 autres leurs résultats étaient négatifs (Tableau X, page 91).

Nous avons utilisé les trois amorces définies dans cet article : GTIAARCARACIGTIATGAC en sens, RTCIARISWRTGIACRAART et TCISWIGCRTGIGTCCARWA en sens complémentaire.

Tableau X **Espèces testées pour l'amplification d'une partie d'un gène d'ARN polymérase phagique dans Cermakian *et al.*, 1996**

Les grisés foncés mettent en évidence les espèces chez lesquelles l'amplification n'a pas donné de résultat, les plus clairs correspondent aux types d'organismes pour lesquels un résultat est positif et un autre est négatif.

Espèces	Type	Amplification
<i>Triticum aestivum</i>	Plantes terrestres	oui
<i>Dennstaedtia punctilobula</i>		non
<i>Pycnococcus provasolii</i>	Algues vertes	oui
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>		non
<i>Palmaria palmata</i>	Algues rouges	non
<i>Chondrus crispus</i>		non
<i>Mastocarpus stellatus</i>		non
<i>Gracilaria sordida</i>		non
<i>Cyanophora paradoxa</i>	Glaucocystophyte	non
<i>Isochrysis</i> sp Tahiti	Haptophyte	oui
<i>Cryptomonas</i> Φ	Cryptophyte	oui
<i>Cryptothecodinium cohnii</i>	Dinoflagellé	non
<i>Thraustochytrium aureum</i>	Hétéroconte hétérotrophe	oui
<i>Crithidia fasciculata</i>	Flagellés	non
<i>Euglena gracilis</i>		non
<i>Goniomonas truncata</i> Stein		non
<i>Reclinomonas americana</i>		non
<i>Jakoba libera</i>		non
<i>Acanthamoeba castellanii</i>	Protozoaires amoeboïdes	oui
<i>Naegleria fowleri</i>		oui
<i>Tetrahymena pyriformis</i>	Ciliés	oui
<i>Giardia lamblia</i>	Eucaryotes amitochondriés	non
<i>Trichomonas vaginalis</i>		non

La séquence du gène présent dans le génome mitochondrial de *P. littoralis* ne permettait pas son amplification par ces amorces.

1.5.1.3. ARN polymérase de type bactérien

L'identification des promoteurs de type bactérien, à facteur σ -70, nous a conduit à chercher une ARN polymérase de type bactérien, à plusieurs sous-unités ($\alpha_2\beta\beta'$). J'ai pour cela dessiné des amorces dégénérées à partir d'un alignement de gènes *rpoB* disponible sur le site internet de l'INRA de Toulouse, Prodom (<http://protein.toulouse.inra.fr/prodom.html>). J'ai choisi deux domaines adjacents bien conservés entre gènes bactériens et plastidiaux. Les amorces sont GAYATMGAYCAYYTNGG en sens (ID : 346, ProDom34.2), TGCATRRTTNSWNCCCAT (plutôt plastidial) et TGCATRRTTNGCNCCCAT (plutôt bactérien) en sens complémentaire (ID : 691, ProDom34.2). Je n'ai pas obtenu de résultats positifs.

1.5.2. Détection de la protéine COX2

Afin de savoir si le produit du gène *cox2* est traduit, et le cas échéant s'il conserve l'insertion ou non, des détections immunologiques ont été réalisées sur des transferts de protéines de *P. littoralis* (Annexe 8).

Tout d'abord, un anticorps anti-COX2 de levure a été utilisé à Strasbourg sur des transferts de protéines d'organites de *P. littoralis* (je remercie Dr G. Bonnard d'avoir consacré de son temps et de ses anticorps à ces essais). Il a reconnu de nombreuses protéines, alors qu'il donne généralement des résultats "propres". Un contrôle positif a également été réalisé, avec des anticorps polyclonaux contre les sous unités α et β de l'ATP synthase de levure. Il a donné de très bons résultats, indiquant que l'extraction des protéines et leur transfert permettaient bien une détection immunologique.

Comme c'était l'anticorps qui ne convenait pas, nous avons alors fait faire des anticorps de lapin contre des peptides synthétiques (Eurogentec), choisis dans la séquence protéique déduite de celle du gène. Le premier a été choisi à partir d'alignements de séquences de COX2, dans un domaine conservé, afin de pouvoir utiliser l'anticorps contre des protéines homologues d'autres organismes. Le second fait partie de l'insertion.

Les contrôles positifs réalisés avec différentes quantités des peptides de synthèses, déposés sur membrane, ont montré que la méthode de détection choisie (ECL, Amersham) permettait de révéler 5pg du peptide cible, mais pas l'autre, ni de la BSA, utilisée comme second témoin négatif.

Par contre, sur les transferts de protéines de *P. littoralis*, de nombreuses protéines de toutes tailles ont toujours été révélées par les deux anticorps, mais aussi par les sérums pré-immuns des différents lapins, et cela, même avec des dilutions importantes des sérums.

1.6. Conclusion sur le génome mitochondrial de *P. littoralis*

Le génome mitochondrial de *P. littoralis* présente un ensemble de caractéristiques qui n'ont jamais été trouvées ensemble dans une telle molécule : des introns de groupe II de lignées différentes contenant chacun un gène codant une protéine multidomaine complète (apparentée aux transcriptases réverses), un gène d'ARN polymérase de type phagique, des promoteurs à facteurs σ -70, par exemple.

L'ensemble des ces caractéristiques peut faire penser que ce génome évolue lentement, par rapport à d'autres génomes mitochondriaux très modifiés. Cela peut expliquer qu'il a retenu certaines caractéristiques de son eubactérie d'origine, comme de nombreux groupes de gènes de protéines ribosomiques et des promoteurs à facteurs σ -70. Par rapport aux autres génomes mitochondriaux d'hétérocontes connus actuellement, il présente le plus grand nombre de caractères ancestraux. Par contre, *Reclinomonas americana* offre un état encore plus proche de celui de la protéobactérie d'origine.

2. Le génome mitochondrial de *Laminaria digitata*

2.1. Présentation générale de l'objectif

En se basant sur nos connaissances du génome mitochondrial de *P. littoralis*, il s'agissait d'étudier certaines régions particulières de celui de *Laminaria digitata* : le gène *nad11*, la zone promotrice du gène de l'ARN de la petite sous-unité du ribosome, l'ARN polymérase et les introns. Après plusieurs tentatives infructueuses du clonage de l'ADN organitique (ADN extrait de mauvaise qualité et en quantité insuffisante), nous avons opté pour une approche par séquençage direct de produits d'amplifications par PCR, en espérant que les séquences des deux génomes seraient suffisamment ressemblantes pour permettre l'usage d'amorces de *P. littoralis*. L'essai préliminaire étant concluant, la méthode fut adoptée. Cependant, cet essai concernait le gène de l'ARN de la grande sous-unité ribosomique et non pas un gène codant une protéine. Quand les amplifications ont concerné des gènes codant des protéines, le succès fut plus mitigé. J'ai donc été amenée à dessiner des amorces dégénérées, à partir d'alignements de séquences.

Les résultats qui suivent vont beaucoup plus loin que les premiers objectifs fixés, car finalement 60 % du génome mitochondrial de *L. digitata* sont maintenant séquencés (Tableau XI). Les régions qui ne le sont pas ont toutes été amplifiées, ce qui nous permet d'avoir une estimation de la taille des fragments qui manquent, et de penser que la molécule d'origine est circulaire.

2.2. Caractérisation du génome mitochondrial de *L. digitata*

La ressemblance du génome mitochondrial de *L. digitata* avec celui de *P. littoralis* n'a pas de commune mesure avec ce à quoi on pouvait s'attendre. Ces deux génomes ont pratiquement le même contenu et peuvent être alignés. Cependant, la majeure partie des séquences qualifiées de "non mitochondriales" dans *P. littoralis* sont absentes dans *L. digitata*, soit la région de l'ARN polymérase, les introns de groupes II (du gène *cox1* et du 23S), ainsi que la majorité des ORFs. Il faut noter également que même si de très fortes homologies existent entre les séquences nucléotidiques des deux génomes, aucun site d'enzymes de restriction utilisé lors du clonage de la molécule de *P. littoralis* n'est conservé dans celui de *L. digitata*.

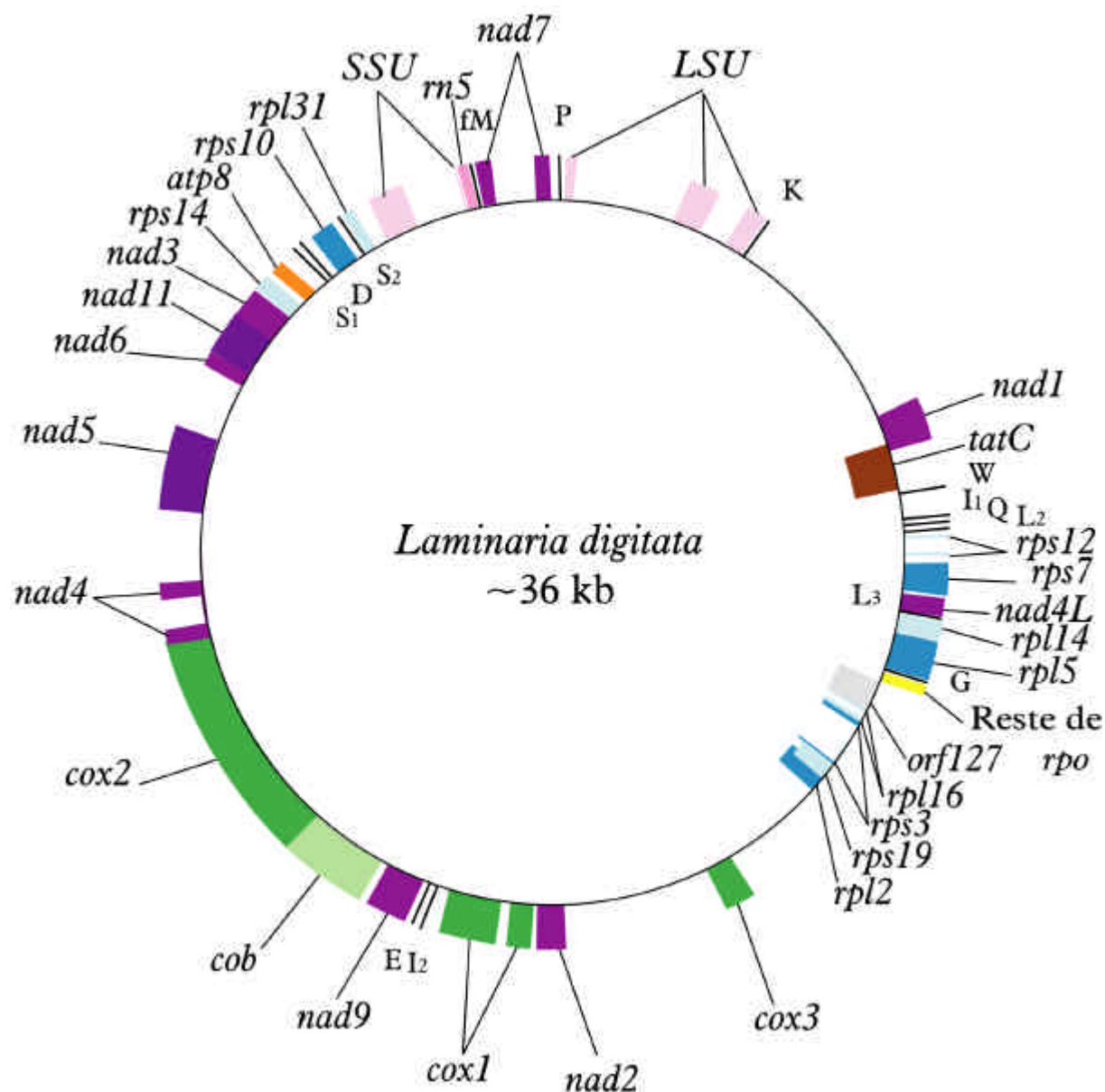


Figure 39 Carte génique du génome mitochondrial de *Laminaria digitata*

Les gènes et les ORF sont représentés par des blocs pleins. Les gènes représentés sur le cercle extérieur sont transcrits dans le sens des aiguilles d'une montre et inversement pour ceux représentés dans le cercle intérieur. Des blocs de hauteurs différentes permettent de voir les chevauchements de gènes. Les *trn* sont représentés par des barres noires, avec la lettre de l'acide aminé correspondant. Seules les parties séquencées sont représentées.

Les représentations comparatives des deux génomes mitochondriaux permettent de se rendre compte de ces très fortes homologues (Figure 40 et Figure 45, Figure 46, Figure 48 et Figure 49 pages 106 et suivantes).

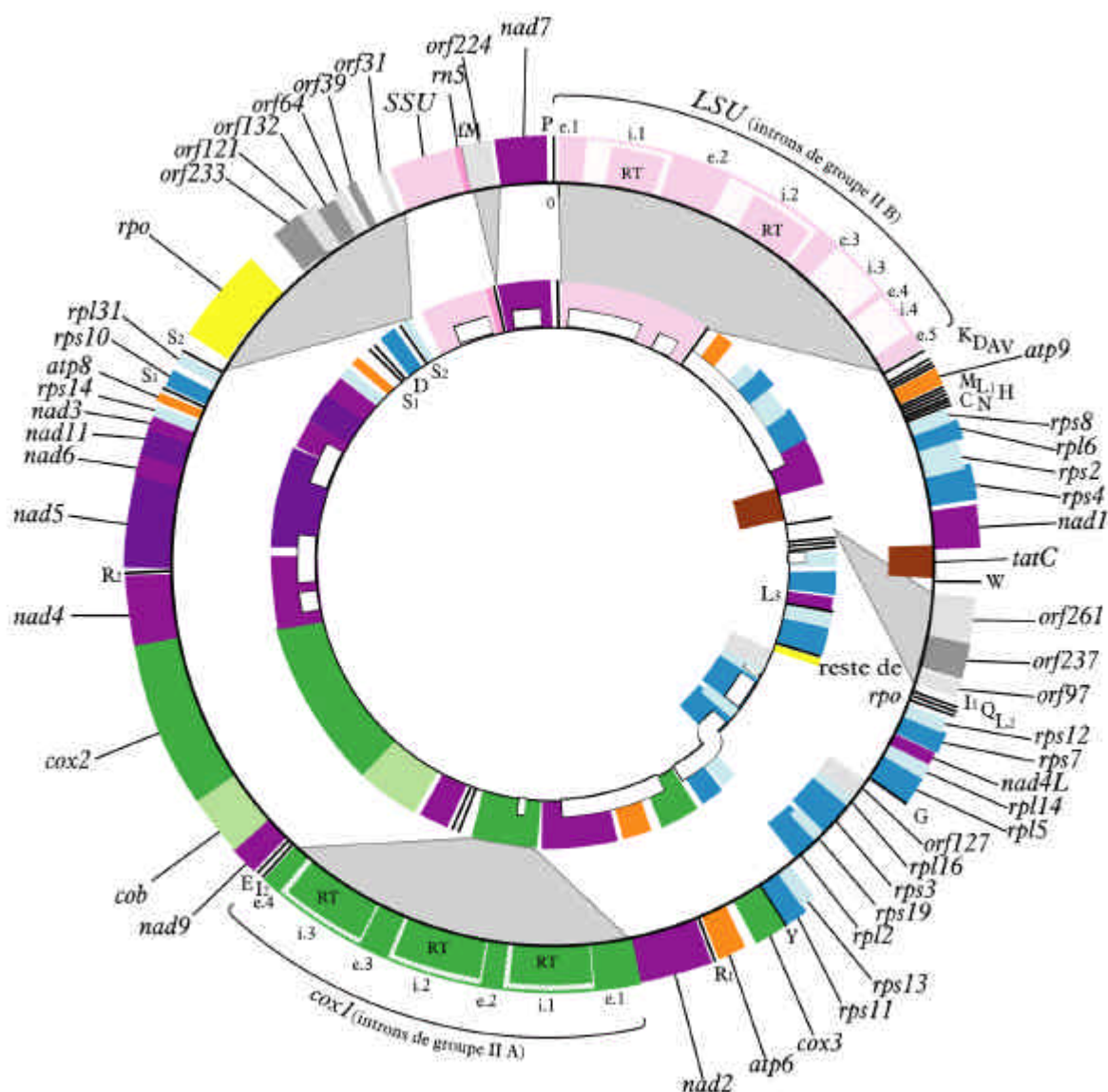


Figure 40 Cartes géniques comparatives circulaires des génomes mitochondriaux de *Laminaria digitata* et de *Pylaiella littoralis*

Les deux cartes sont représentées à la même échelle. La partie extérieure est celle du génome mitochondrial de *P. littoralis*, la partie intérieure est celle de *L. digitata*. Les parties non séquencées du génome mitochondrial de *L. digitata* sont extrapolées à partir de celui de *P. littoralis*, elles sont signalées par des blocs blancs entourés de noir. Les gènes et les ORFs sont représentés par des blocs pleins. Les gènes représentés sur les cercles extérieurs sont transcrits dans le sens des aiguilles d'une montre et inversement pour ceux représentés dans les cercles intérieurs. Des blocs de hauteurs différentes permettent de voir les chevauchements de gènes. Les *trn* sont représentés par des barres noires, avec la lettre de l'acide aminé correspondant. Les parties grisées entre les deux génomes mettent en évidence les différences.

Le Tableau XI page 98 présente les coordonnées des portions du génome mitochondrial de *L. digitata* qui sont connues, les portions non séquencées sont extrapolées à partir des coordonnées de celui de *P. littoralis* (Tableau V, pages 56-57).

Tableau XI **Tableau analytique et prévisionnel de l'ensemble de la molécule d'ADN mitochondrial de *Laminaria digitata* par comparaison avec celui de *P. littoralis***

Plusieurs lignes peuvent correspondre à un seul gène dont plusieurs parties sont séquencées. Les colonnes de 2 à 11 indiquent le nombre de nucléotides par catégorie (voir en-têtes) alors que dans les colonnes 12 à 14 il s'agit des coordonnées des 1^{ers} et derniers nucléotides des gènes ou des parties de gènes. Le début du gène de l'ARNr 23S est pris comme origine. Les grisés verticaux aident à suivre les colonnes, alors que les horizontaux signalent les gènes codés sur le second brin. Les restes d'un gène d'ARN polymérase sont indiqués en caractères gras (ils commencent avant l'ORF, voir texte). La partie centrale, plus claire et en pointillés, correspond à des données de *P. littoralis*, utilisées comme prévisions.

Gènes	À partir des séquences mitochondriales de <i>Laminaria digitata</i>					Prévisions à partir des séquences mitochondriales de <i>Pylaiella littoralis</i>					Coordonnées "mixtes" résultantes		
	Chevauchement	Entre-gène	Nombre de nt codant des acides aminés	Nombres d'acides aminés codés	Nombre de nt codant une partie de gène d'ARN	Chevauchement	Entre-gène	Nombre de nt codant des acides aminés	Nombres d'acides aminés codés	Nombre de nt codant une partie de gène d'ARN	Coordonnées du 1 ^{er} nt d'une partie du gène	Coordonnées du dernier nt de la partie du gène codant une protéine	Coordonnées du dernier nt codant une partie de gène d'ARN
<i>rnl</i>					146					1376	1		1522
<i>rnl</i>					389					317	1523		2228
<i>rnl</i>					471						2229		2699
<i>trnK</i>		46			75						2746		2820
<i>trnD</i>							151			72	2972		3043
<i>trnA</i>							69			72	3113		3184
<i>trnV</i>							17			71	3202		3272
<i>atp9</i>							57	228	75		3330	3557	
<i>trnM</i>							60			72	3618		3689
<i>trnL1</i>							9			82	3699		3780
<i>trnH</i>							9			73	3790		3862
<i>trnC</i>							3			72	3866		3937
<i>trnN</i>							1			72	3939		4010
<i>trnF</i>							35			72	4046		4117
<i>rps8</i>							9	378	125		4127	4504	
<i>rpl6</i>							4	492	163		4501	4992	
<i>rps2</i>							1	612	203		4992	5603	
<i>rps4</i>							11	798	265		5593	6390	
<i>nad1</i>			636	211			42	345	114		6433	7413	
<i>tatC</i>	54		765	254							7360	8124	
<i>trnW</i>		18			72						8143		8214
<i>trnI2</i>		215			72						8430		8501
<i>trnQ</i>		17			71						8519		8589
<i>trnL2</i>		3			80						8593		8672
<i>rps12</i>		1	41	12				149	49		8674	8863	
<i>rps12</i>			204	67							8864	9067	
<i>rps7</i>		55	498	165							9123	9620	
<i>nad4L</i>		24	303	100							9645	9947	
<i>trnL3</i>		7			81						9955		10035
<i>rpl14</i>		7	387	128							10043	10429	
<i>rpl5</i>		8	555	184							10438	10992	
<i>trnG</i>	11				73						10982		11054

Tableau XI (suite)

Gènes	Chevauchement	Entre-gène	Nombre de nt codant des acides aminés	Nombres d'acides aminés codés	Nombre de nt codant une partie de gène d'ARN	Chevauchement	Entre-gène	Nombre de nt codant des acides aminés	Nombres d'acides aminés codés	Nombre de nt codant une partie de gène d'ARN	Coordonnées du 1 ^{er} nt d'une partie du gène	Coordonnées du dernier nt de la partie du gène codant une protéine	Coordonnées du dernier nt codant une partie de gène d'ARN
<i>traces de rpo</i>		110	441	127							11108	11548	
ORF127	30		390	129							11519	11908	
<i>rpl16</i>		3	105	34				56	18		11912	12072	
<i>rpl16</i>		25	253	83							12098	12350	
<i>rps3</i>			60	19				734	243		12351	13144	
<i>rps3</i>	1		22	6							13144	13165	
<i>rps19</i>			261	86							13166	13426	
<i>rpl2</i>	14		135	44				630	209		13413	14177	
<i>rps13</i>						22		360	119		14200	14559	
<i>rps11</i>						11		465	154		14549	15013	
<i>trnY</i>							11			80	15025		15104
<i>cox3</i>							13	60	19		15118	15177	
<i>cox3</i>			537	178				222	73		15178	15936	
<i>atp6</i>							143	747	248		16080	16826	
<i>trnR</i>							57			72	16884		16955
<i>nad2</i>			582	193			5	905	301		16961	18447	
<i>cox1e1</i>		10	330	110				147	49		18458	18934	
<i>cox1e2</i>			1116	372							18935	20050	
<i>trnI1</i>		82			71						20133		20203
<i>trnE</i>		32			71						20236		20306
<i>nad9</i>		77	573	190							20384	20956	
<i>cob</i>	1		1173	390							20956	22128	
<i>cox2</i>		54	435	145							22183	22617	
<i>cox2 insert</i>			3027	1009							22618	25644	
<i>cox2</i>			381	126							25645	26025	
<i>nad4</i>	10		64	20				591	196		26016	26670	
<i>nad4</i>			237	78				557	185		26671	27464	
<i>trnR</i>							18			87	27483		27569
<i>nad5</i>							5	269	89		27575	27843	
<i>nad5</i>			1005	334				712	236		27844	29560	
<i>nad6</i>			240	79		16		431	143		29545	30215	
<i>nad11</i>		2	624	207							30218	30841	
<i>nad3</i>		4	363	120							30846	31208	
<i>rps14</i>	4		291	96							31205	31495	
<i>atp8</i>		215	162	53							31711	31872	
<i>trnS1</i>		124			87						31997		32083
<i>trnD</i>		5			72						32089		32160
<i>rps10</i>		61	327	108							32222	32548	
<i>trnS2</i>		59			84						32608		32691
<i>rpl31</i>		8	207	68							32700	32906	
<i>rns</i>		237			467					549	33144		34159
<i>rns</i>					12						34160		34171
<i>rn5</i>		4			105						34176		34280
<i>trnfM</i>		22			74						34303		34376
<i>nad7</i>		96	297	98				597	198		34473	35366	
<i>nad7</i>			303	100							35367	35669	
<i>trnP</i>		72			71					71	35742		35883
		87									35971		
Totaux	125	1790	17273	5682	2644	43	736	10485	3421	3210			

L'ordre des gènes séquencés est identique à celui de leurs homologues chez *P. littoralis*, à l'exception de quelques *trns*. Certains chevauchements observés chez *L. digitata* sont les mêmes chez *P. littoralis*, alors que d'autres sont spécifiques. Les entre-gènes sont le plus souvent différents, ce qui rend la comparaison entre les deux molécules d'autant plus intéressante : cela permet d'identifier un gène ou un motif, sur la base d'une forte identité de séquence. Le gène de l'ARNr 5S a été identifié grâce à ce travail de comparaison entre les deux génomes : la ressemblance importante entre les deux séquences séparant les gènes de l'ARNr 16S et de l'ARNt formyl-méthionine, nous a fait chercher à quoi elles pouvaient correspondre.

Des séquences promotrices ont pu être identifiées, généralement aux mêmes endroits dans les génomes mitochondriaux des deux algues.

2.3. Ressemblances entre les génomes mitochondriaux de *L. digitata* et de *P. littoralis*

Toutes les séquences complètes de gènes codant des protéines de *L. digitata* ont été comparées avec celles des gènes homologues de *P. littoralis*. Les pourcentages d'homologie et de similitude sont indiqués dans le tableau suivant.

Tableau XII Comparaison entre les séquences complètes des gènes mitochondriaux de *L. digitata* avec celles des protéines homologues de *P. littoralis*

Protéine	Pourcentage d'identité	Pourcentage de similitudes
ATP8	67,3	80,0
RPL31	55,9	69,1
RPS19	81,8	88,6
RPS14	79,2	91,7
NAD4L	88,0	97,0
RPS10	55,3	63,2
NAD3	90,0	96,7
RPL14	85,9	94,5
ORF127	57,4	72,1
RPS7	60,6	78,2
RPL5	61,4	81,0
NAD9	86,8	95,3
NAD11	85,2	92,8
TATC	59,8	79,9
COB	90,8	95,6

2.3.1. Le nad11

Comme dans le cas de *P. littoralis*, le gène *nad11* de *L. digitata* correspond au premier tiers des gènes homologues, qu'ils soient codés dans les mitochondries ou au niveau des noyaux, car c'est un gène qui a souvent été transféré dans ce compartiment (Article 2).

```

P.l L L T I S V N D L V I W L K K G S T V
L.d M L N I S I N E L L V W V K K G S T V
L.d ATG CTT AAT ATA TCA ATT AAT GAG CTT CTT GTT TGG GTA AAA AAA GGT TCT ACA GTT
P.l TTG CTT ACT ATT TCT GTA AAT GAT CTT GTT ATT TGG TTA AAA AAG GGT TCT ACT GTT

P.l I Q A C Q V A G A Q V P R F C Y H D K
L.d I Q A C Q A A G A N I P R F C Y H D K
L.d ATA CAG GCT TGT CAA GCT GCC GGT GCA AAT ATT CCA CGA TTC TGT TAT CAT GAT AAG
P.l ATA CAA GCT TGT CAG GTT GCT GGT GCA CAG GTA CCA CGC TTT TGT TAT CAC GAT AAG

P.l L F I A G N C R M C L V E V S K S P K
L.d L F I A G N C R M C L V E V S N S P K
L.d CTT TTT ATA GCA GGT AAT TGT CGA ATG TGT CTT GTC GAA GTG AGT AAT TCC CCT AAA
P.l CTT TTT ATT GCG GGC AAT TGT CGT ATG TGT CTT GTT GAG GTT AGT AAA TCA CCT AAG

P.l P Q A S C A L P F L P G L R I F T N T
L.d P Q A S C A L P F L P N L R I F T N T
L.d CCA CAA GCA TCG TGT GCA TTG CCC TTT TTA CCC AAC TTA AGA ATT TTT ACA AAT ACG
P.l CCT CAA GCC TCG TGT GCA TTG CCC TTT TTA CCC GGT CTA AGA ATT TTC ACA AAC ACC

P.l A L V R K A Q E S V M E L L L L H H P
L.d A L V R K A Q E S V M E L L L L H H P
L.d GCA TTG GTA CGT AAG GCA CAA GAA TCT GTT ATG GAA TTG CTT CTT CTC CAC CAC CCC
P.l GCT TTA GTT CGT AAA GCC CAG GAA TCC GTA ATG GAA TTA TTA CTT TTA CAC CAC CCA

P.l L D C P V C D Q G G E C E L Q E Q S F
L.d L D C P V C D Q G G E C E L Q E Q S F
L.d TTG GAT TGT CCT GTG TGT GAT CAG GGA GGG GAA TGT GAA CTT CAG GAA CAA AGT TTT
P.l TTA GAT TGT CCG GTT TGT GAT CAA GGT GGT GAG TGC GAG TTA CAA GAG CAA AGT TTT

P.l N F G S D R G R F F F F K N S L G D T
L.d N F G S D R G R F L F F K N S L G D T
L.d AAT TTT GGG TCA GAC AGA GGT AGA TTT TTG TTT TTT AAA AAT TCT TTA GGT GAT ACC
P.l AAT TTC GGT TCA GAT AGA GGT AGA TTT TTC TTT TTT AAG AAT TCT TTA GGT GAT ACC

P.l F W G S L I K T V L R R C V V C T R C
L.d F W G G L I K T V L R R C I V C T R C
L.d TTT TGG GGA GGA CTT ATA AAA ACA GTA TTA CGT CGA TGT ATT GTT TGT ACA CGA TGT
P.l TTT TGG GGT AGT CTT ATT AAA ACC GTT TTA CGT CGT TGC GTC GTC TGT ACC AGA TGT

P.l V R Y T H Q I G G S D L I G T S N R G
L.d V R Y T H Q I G G N D S L G T S N R G
L.d GTA AGA TAT ACT CAC CAA ATT GGA GGA AAT GAC TCT TTG GGA ACG TCC AAT AGA GGG
P.l GTA CGC TAT ACC CAT CAA ATT GGT GGT AGT GAT TTA ATA GGT ACA TCT AAC CGG GGG

P.l G H S E I G M F K E N T L K T E T S G
L.d G H S E I G M F K E S V L K S E T S G
L.d GGG CAT TCT GAG ATT GGG ATG TTT AAA GAA AGT GTG TTA AAA AGT GAA ACG TCG GGT
P.l GGT CAT TCG GAG ATT GGA ATG TTT AAA GAA AAT ACA CTT AAA ACC GAA ACT TCT GGA

P.l G V I E L C P V G W L S K K K L C F F .
L.d G V I E L C P V C W Y N P R L I T .
L.d GGA GTT ATT GAA TTA TGC CCT GTT TGT TGG TAT AAC CCA CGT TTA ATT ACA TAA
P.l GGA GTT ATT GAG TTA TGC CCC GTT GGT TGG TTG TCT AAA AAA AAA TTA TGT TTC TTC TAA

```

Figure 41 Alignement des séquences des gènes *nad11* de *L. digitata* et *P. littoralis* et de leur séquence traduite

Par contre, le codon de début du gène est un ATG, et non un TTG comme chez *P. littoralis* (Figure 41, page 102). Le gène *nad3* qui le suit dans les deux génomes, chevauche la fin du gène *nad11* dans *P. littoralis*, alors qu'il est séparé par quatre nucléotides dans *L. digitata*.

2.3.2. Le *cox2*

Le gène *cox2* de *L. digitata* présente la même particularité que celui de *P. littoralis*, c'est à dire qu'il comporte une grande insertion codant 1009 aa (1006 aa chez *P. littoralis*) en phase avec le gène qui ne code lui-même que 271 aa (la taille habituelle de la protéine est de 260 à 280 aa). La séquence de cet insert est cependant beaucoup moins conservée que celles des autres gènes (Figure 42).

```

L.d MKFS---HKNIIRIT--SIVFFSLYYCSVGSM DASHPWQVGFQDPATPIMEGIIFFNGLLMTFMLFIACLVGWLLYKSL
P.1 MRIMNNIFKNISKIIPRLLLFFVQFHTVAYMDASHPWQTFQDPATPIMEGIIFFNGLLMGFMIISCLVGWLLYKSL

L.d TLFNEADHKDAVGFNHSTLLEVVTIIPAVILMVISVPSYNLLYAMDEVIDPSLTIKVVGHQWYWSYECSDFEVSPTIK
P.1 SLFNESVHATPVGFTHSTLLEVVTIIPAVILMIISVPSYNLLYAMDEVIDPSLTIKVVGHQWYWSYECSDFEVSPKDQ

L.d KDNLNQVEVSYKALKDMADLIEYSRVEVAKGEKQTQISIIKEFLESFEKGMEDVPQGATEMLSRRLWLVIKIILCNEGR
P.1 QESIKLVEEGQAALKRWLSCIEDDSITRGSSNKQPQTALTQELLDYLDNNLKEFSKEDSEIITNRLNTISS--LLSKD--

L.d KEFYGPLESHTLGMVSILSEVKGQLSEGSLLIKEQQDLVIKALKVFKQYIRIVNETEL---TAKT-----MDL-
P.1 -ESY-----NAVDALSAVKYPLEKGSLLPEQVDLVIKILNSFNKYNLTGNIQSEFTSKDFIEAFFFLSLNDLE

L.d -----FKS-LDEIKPGKGNTPSSDSSSGDLDSNTGSIVAE LNKVDEASYKWL ELRSAENFYERAETELSRALTQVF EAE
P.1 ALPVD FNSDSL PDKSGSGKFDDDDSSDDDGSVISELMYFDKSD-PYWEWCELVSAEKESDKDYFALKLALSNFFTSE

L.d CVCLRALARGEIKIPIEEMMANLDEGRIR-L---DKALVEAEIAENNLIDTQLIAHQLRLTRPEREGYSSEFEWNAADV
P.1 RRCNNAALLEPEPEDENRPFLELVEDFIKDLRFKKAKPIADLSESKLIDTQLIVHQLRLTRPEREYSSYFALDRAVT

L.d EFKFSGHELENAKIELNNAKASAKWAKIDLLASQVNALTAEYFQADAEWASKDPAIIRSKVLLKGDYDWNEKCLKSESK
P.1 EVNFAEVDVNIALIELENAKFNSHWCIEELAAANVNKLTAEYQLADASSAVTDPRLLRS AWINKKGYYSWHKFLKLVAK

L.d KVLDRHELKFM LAHEELKSANTILDKFQSGLTAEELSKNSIADSSSEFMALEKQTISVAEEFEKGDILANAKEELK
P.1 NLSEVERMAFLRADEELSGANSLLGKAQINLTLEELERSNAIADNAKAKFLAMEREVIPAMEEFNRGKFIVAEAKKELE

L.d NYKAVSERAEIRLERSQAADFDFKAVSSRAEAVSKGAESFFNTAKEKLTGVELDLNFITPKMLLDNLSKYSIGIKTEFD
P.1 NFEELADRGQIRLAKAQASFDKVKPTLDRAKAKLKAADTIYHRAKARLVGAGPMIESAEGTLEA--AENNFKSVKEKYN

L.d QAVSLVNIKSDLD TAKDRLEVVKGYVDNTVKRLDDTPVIYELPKVTDKSNEYFDNFLWEIHNEDLITVKAQLKGSEAV
P.1 KATLAVLNANSDLVVCERLKTVNANLIKTEQAFEDTGLLRTYTPKEGSPVEYYPNYLWEMRKEDLAFVKTLQKTD TAR

L.d LEESKISL FNAEQALTESFIKLI EVELKKGAQIDFL-KVDLDISSTLS-SEKELVGIEITYIGDLKLN LGHIVREKVIS
P.1 LESVYTS LNEAERQLNHISCELLESELIKGQILINSPGHYDID-AEMLKKT DNYLSGVKLEIAEATY LKALTCFEL--D

L.d NFDSGSSTCLKVIINMI-DNDLSKASSVSGSVKPAFIKDTTGCDISGMIESASDSAWVKTLKVDVNAAISDYEEASCIL
P.1 NSDN-SKLVLKRAEKALTSARLKD TNGYSGLI FT RDMEFTKSKDLIDSYAESCLSAT-KA-ELD--GAEVDYSRATDIL

L.d SQARKILDKTADDLLTTSKLSNNNS-IDSLLSLQTATDNSLESTSNLIK TALVSSSAIDTILEPGSLQAKSSFEVLKAK
P.1 SKGESLLKAVSVDL---AKDY-NNSCLDTLRVLHKKT VLSLTQRIEQVILMRLELSPLDIKLEPGLLQSKSYQEVLLAK

```

```

L.d AELANVKWFAARVSRSLDTFMQESVKPFNRQFSNVSVVEPNGTLASDNSLSGS--DAAGE-DGNSGN--KSKEE--IKEM
P.l AELANIKWLCAARVAKTLDIPLYDEAKPFNVQFSYLKTESP-----TSDSSNSNLEDGDSTSDGNSGDKKKPKTEDEIKEI

L.d LSKLETREIDYTHSGLRGEVLQTFRELIETVDQKTADDVKNMLYEALLSITNEEGEKNKSLKTQIKMIHDLIEHHKEIG
P.l LSKVSVIKTPDNLEELKTEIHTFGHLLKTMCKEQADRLLLVFDESFNMSMVKEEVDKTQELKSQINLIKGNID-----T

Fin de l'insert.
L.d GEEETTERQRINFDSYLI TDDDLVIPEVSGSGKAGKVFRLLLEVNDRLVVPNTNHIRVLVTSADVLHSAVPSLGKVDVA
P.l CNTQEVDVERINFDSYLI ADEDLVIPEASGTGKAGKVFRLLLEVNDRLVFPNTNHIRLLVTSADVLHSAVPSLGKVDVA

L.d CPGRLNQVFLFIKREGVFYGCSELCGVNHGFMPIVVQAVNQDEYLTWVGKRLCS.
P.l CPGRLNQVFI FVKREGVFYGCSELCGVNHGFMPIVVQAVSQDDYLTWVGKRLCS.

```

Figure 42 Alignement des séquences traduites des gènes *cox2* de *L. digitata* et *P. littoralis*

L.d : *Laminaria digitata* ; *P.l* : *Pylaiella littoralis*.

2.3.3. L'ORF127

Comme chez *P. littoralis*, un ORF suit l'opéron de gènes codant des protéines ribosomiques L2, S19, S3 et L16, qui se trouve dans les deux algues sur le brin complémentaire. Elle est la seule ORF mitochondriale de *P. littoralis* à avoir été conservée dans le génome mitochondrial de *L. digitata*. L'homologie est tellement importante (Tableau XII page 100 et Figure 43), que nous lui avons attribué le nom d'ORF127, comme dans *P. littoralis*, bien que l'ORF de *L. digitata* code 129 acides aminés.

```

P.l MF T P R K R H L R R K R F F L T K K K T F A L F N G S N L K T Y E I D E I R L S L I N A K L Y F I P L Y L K P P V L G V G Y P L V
L.d MF T P R K R H L R K K R F F L P K Q R T F A L F N G S N L K T S Q I S K I R V L L Q N A K L Y S V P L Y L N P P K L G L G C P L I

P.l I I I Y D D L K D L R L N T P E I M K K M N C L G L S I N S F W Y S A D I F K S D K T T N L N A K L L A L F L K K N K S K .
L.d M I I Y E T L Q D L Q T N V P E I A L Q L D C L G V S I D K K W Y S I H F L E N T N T I A L N K K A L S L L L V K Y N A I N K .

```

Figure 43 Alignement des séquences traduites des ORFs127 de *L. digitata* et de *P. littoralis*

2.3.4. Les régions promotrices

Parmi celles qui ont été repérées dans le génome mitochondrial de *P. littoralis* (Figure 33 page 78), une seule est conservée à l'identique, il s'agit de celle qui se trouve en amont du gène *tatC*. Dans d'autres cas, des boîtes -35 et -10 différant de un à plusieurs nucléotides sont présentes aux mêmes endroits. Enfin, dans le cas du gène de l'ARNr 16S, un promoteurs potentiels sont identifiables mais leurs séquences diffèrent de celle de *P. littoralis* (Figure 44).

<i>P. littoralis</i>	ORF31	TTGAAG ATTTATAACTATA-TTACC TATAAT	→ 16S
<i>L. digitata</i>	<i>rpl31</i>	TTGTGT TTT-ATAT-AATATTCGCA TATTAT	→ 16S
<i>P. littoralis</i>	<i>atp8</i>	TTGAAA ATATTT--TTACGCTT-TA TACCTT	→ <i>trnS1</i>
<i>L. digitata</i>	<i>atp8</i>	TTGTAT ACAAAGTTATAC--AAATT TTAACT	→ <i>trnS1</i>
<i>P. littoralis</i>	<i>nad4L</i>	TTGTAG ACAGGTTAGGTTCAAAATC TTTTGT	→ <i>rpl14</i>
<i>L. digitata</i>	<i>nad4L</i>	TGGTAG ACACGGCAGATTCAAAATC TTTTGT	→ <i>rpl14</i>
<i>P. littoralis</i>	<i>rps10</i>	TTGGCC CCAGTCAGATTATTTTAAA TTTTTT	→ <i>rpl31</i>
<i>L. digitata</i>	<i>trnD</i>	TTGTGG GTTATTTTTTTAGAACTTC TAAAAAT	→ <i>trnA</i>
<i>P. littoralis</i>	<i>tatC</i>	TTGGAG GTAATAAATAGATAA-TTG TAATTT	→ <i>trnW</i>
<i>L. digitata</i>	<i>tatC</i>	TTGTAA ATAATATATTGA---GATT TTAAGT	→ <i>trnW</i>
<i>P. littoralis</i>	<i>trnW</i>	TTGGAG A--CCAAAGTTCTACCAAT TGAAC	→ <i>tatC</i>
<i>L. digitata</i>	<i>trnW</i>	TTGGAG A--CCAAAGTTCTACCAAT TGAAC	→ <i>tatC</i>

Figure 44 Comparaisons des séquences promotrices putatives des génomes mitochondriaux de *Laminaria digitata* et de *Pylaiella littoralis*

2.3.5. Les ARNt

La plupart des gènes d'ARNt de *L. digitata* séquencés se trouvent aux mêmes endroits que leurs homologues de *P. littoralis*, ils leur ressemblent beaucoup. La comparaison entre les séquences des gènes d'ARNt des deux algues donne des pourcentages d'identité supérieurs à 80 %.

Tableau XIII Pourcentages d'identité entre les séquences des gènes d'ARNt des génomes mitochondriaux de *L. digitata* et de *P. littoralis*

<i>trn</i>	% d'identité
S1	82,76
D	84,72
L2	87,65
fM	87,84
I2	90,28
S2	91,76
N	92,96
W	94,44
P	97,18
Q	97,18
G	98,63

2.3.6. Les entre-gènes

Trois seulement sont identiques :

- un d'un seul nucléotide (A, entre le gène de l'ARNt L2 et *rps12*)
- un de deux nucléotides (TT, entre les gènes *nad6* et *nad11*)

- un de quatre nucléotides (AGAG, entre les gènes des ARNr 16S et 5S, dont les extrémités ne sont déterminées qu'approximativement) .

2.4. Différences entre les génomes mitochondriaux de *L. digitata* et de *P. littoralis*

2.4.1. Autour du gène de l'ARN polymérase

2.4.1.1. Modifications en amont du site d'insertion dans *P. littoralis*

Comme je l'ai déjà signalé, le gène de l'ARN polymérase, ainsi que les séquences qui l'accompagnaient chez *P. littoralis*, ne sont plus présents chez la laminaire, entre les gènes de l'ARNt sérine 2 (S2) et de l'ARNr 16S. Deux différences sont à noter dans cette région : la présence d'un gène supplémentaire, celui d'un ARNt acide aspartique (D), ainsi qu'une inversion entre les gènes de *rpl31* et de l'ARNt S2 (Figure 45, page 106). Le promoteur identifié dans *P. littoralis* en amont du gène *rpl31* n'existe pas dans la laminaire.

2.4.1.2. Traces d'un gène codant une ARN polymérase

Dans une autre région du génome mitochondrial de *L. digitata*, au niveau du site de jonction entre séquences codant en sens opposé (*trnG* > <ORF127), une séquence absente de *P. littoralis* présente des similitudes avec une partie du gène de l'ARN polymérase (Figure 47, page 106). Cette séquence comporte un cadre ouvert de lecture, dont la fin chevauche celle de l'ORF127 sur 30 nucléotides. Cependant, les ressemblances avec le gène de l'ARN polymérase de *P. littoralis* débutent avant le codon de début (ATG) de cet ORF, et après un codon stop (TAA).

Les 17 nucléotides le précédant présente une homologie relative avec ceux qui séparent les gènes de l'ARNt G et de l'ORF127, chez *P. littoralis*.

Il semblerait donc qu'un gène d'ARN polymérase de type phagique a été présent dans le génome mitochondrial de *L. digitata*, mais qu'il en a été éliminé après des restructurations, n'en laissant que des traces.

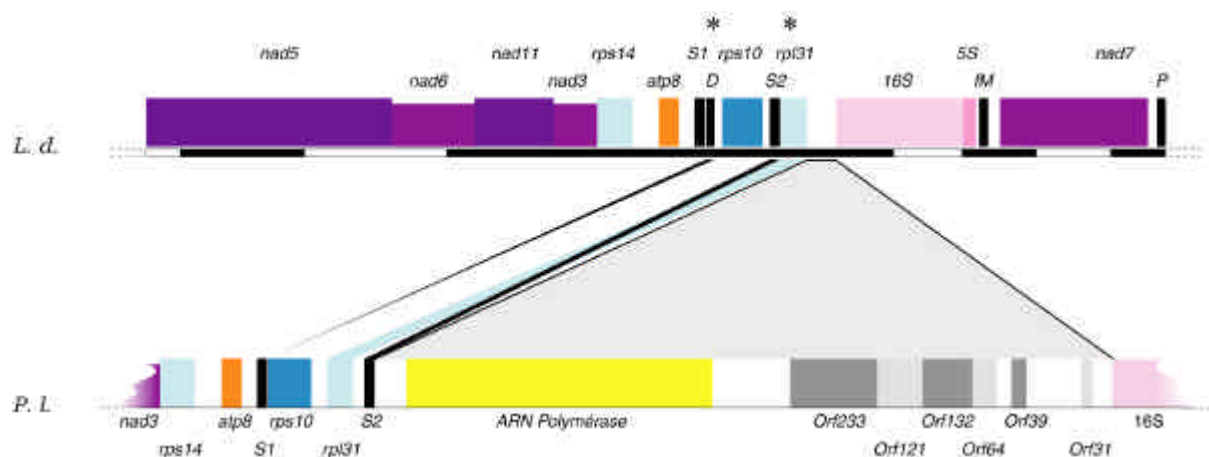


Figure 45 Comparaison de la région du génome mitochondrial de *L. digitata* homologue à celle de *P. littoralis* comprenant le gène de l'ARN polymérase

L. d. : *Laminaria digitata*, *P. l.* : *Pylaiella littoralis*. Les gènes et les ORF sont représentés par des blocs pleins, de couleurs. Des blocs de hauteurs différentes permettent de voir les chevauchements de gènes. Les *trn* sont représentés par des barres noires, avec la lettre de l'acide aminé correspondant. Les parties séquencées du génome mitochondrial de *L. digitata* sont indiquées en noir dans la barre sous les blocs de gènes, alors que du blanc indique les parties non séquencées. Les traits entre les portions des deux génomes mettent en évidence les différences.

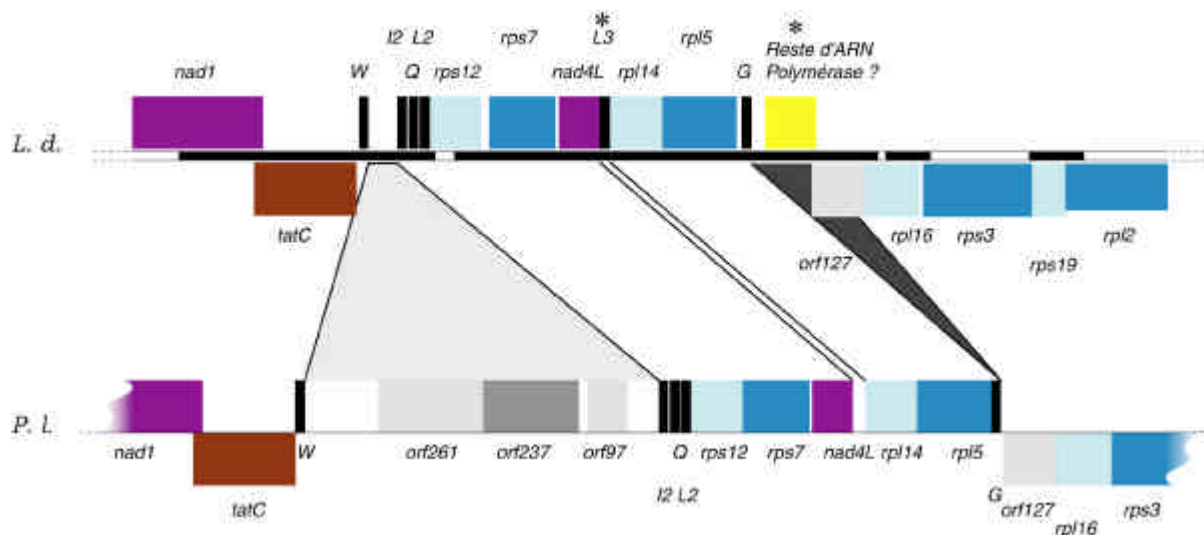


Figure 46 Comparaison de la région du génome mitochondrial de *L. digitata* comprenant un gène *rpo* potentielle avec son homologue chez *P. littoralis*

L. d. : *Laminaria digitata*, *P. l.* : *Pylaiella littoralis*. Les gènes et les ORF sont représentés par des blocs pleins, de couleurs. Des blocs de hauteurs différentes permettent de voir les chevauchements de gènes. Les *trn* sont représentés par des barres noires, avec la lettre de l'acide aminé correspondant. Les parties séquencées du génome mitochondrial de *L. digitata* sont indiquées en noir dans la barre sous les blocs de gènes, alors que du blanc indique les parties non séquencées. Les traits entre les portions des deux génomes mettent en évidence les différences.

P.l	D	I	Y	H	A	I	Q	K	H	V	V	K	K	Y	P	I	V	Q	E
L.d	D	I	Y	Y	I	I	H	K	N	V	L	Q	D	Y	P	I	L	N	K
L.d	GAT	ATC	TAC	TAT	ATA	ATA	CAT	AAA	AAT	GTT	TTG	CAA	GAC	TAT	CCT	ATA	TTA	AAC	AAA
P.l	GAT	ATT	TAT	CAT	GCG	ATT	CAA	AAG	CAT	GTC	GTA	AAA	AAG	TAT	CCG	ATT	GTT	CAA	GAA
P.l	M	D	R	K	T	Y	K	G	I	I	M	R	M	S	Y	G	E	G	V
L.d	M	Y	R	D	E	Y	K	A	I	I	M	K	M	S	Y	G	E	S	S
L.d	ATG	TAT	AGG	GAT	GAG	TAC	AAA	GCA	ATA	ATT	ATG	AAA	ATG	TCT	TAC	GGG	GAA	AGT	TCT
P.l	ATG	GAT	AGG	AAA	ACC	TAT	AAA	GGA	ATC	ATA	ATG	CGT	ATG	AGT	TAC	GGC	GAG	GGT	GTT
P.l	Y	S	R	K	K	T	L	Y	E	Y	L	K	T	L	E	-	-	N	E
L.d	L	S	I	G	Y	A	I	K	K	Y	F	N	G	I	E	F	V	K	K
L.d	CTC	AGT	ATA	GGC	TAC	GCT	ATT	AAA	AAA	TAT	TTT	AAT	GGA	ATA	GAA	TTC	GTA	AAA	AAA
P.l	TAT	AGT	CGA	AAA	AAA	ACA	TTA	TAC	GAA	TAC	TTG	AAA	ACT	CTA	GAA	---	---	AAT	GAG
P.l	E	F	K	K	N	K	-	N	K	G	T	L	L	L	D	M	A	K	A
L.d	N	S	R	E	Y	Y	T	N	K	G	-	I	D	P	D	S	T	L	N
L.d	AAT	TCT	AGA	GAA	TAT	TAT	ACA	AAT	AAA	GGG	---	ATA	GAC	CCG	GAT	TCT	ACA	TTA	AAT
P.l	GAA	TTC	AAA	AAA	AAT	AAA	---	AAT	AAG	GGT	ACT	CTT	TTA	CTC	GAT	ATG	GCT	AAA	GCC
P.l	Y	D	Q	A	I	Y	K	E	F	P	K	F	K	T	F	T	D	Q	A
L.d	F	N	L	C	L	T	I	Y	Y	I	K	Y	-	P	S	S	P	S	K
L.d	TTC	AAC	CTA	TGT	CTG	ACC	ATA	TAC	TAC	ATT	AAA	TAT	---	CCC	AGT	AGT	CCC	TCT	AAA
P.l	TAT	GAC	CAG	GCA	ATT	TAC	AAA	GAA	TTT	CCT	AAA	TTT	AAA	ACC	TTT	ACT	GAT	CAG	GCA
P.l	D	K	I	V	S	I	R	T	K	L	N	L	G	I	N	F	N	I	S
L.d	G	I	Q	S	Y	I	Y	T	F	V	-	L	Y	R	N	S	M	L	T
L.d	GGA	ATA	CAA	TCC	TAT	ATT	TAT	ACA	TTT	GTA	---	TTA	TAC	CGA	AAC	TCA	ATG	CTA	ACA
P.l	GAC	AAA	ATA	GTC	AGT	ATC	CGT	ACA	AAA	TTA	AAC	CTA	GGT	ATT	AAC	TTT	AAT	ATA	TCT
P.l	N	I	F	K	T	N	Q	Y	Y	N	M	D	K	A	T	T	Y	S	F
L.d	V	V	T	Y	I	T	-	I	V	N	V	-	K	T	L	L	C	S	Y
L.d	GTA	GTT	ACT	TAC	ATT	ACT	---	ATT	GTT	AAC	GTT	---	AAA	ACA	CTC	TTA	TGT	TCT	TAT
P.l	AAT	ATC	TTT	AAA	ACA	AAC	CAA	TAT	TAT	AAT	ATG	GAT	AAG	GCG	ACA	ACT	TAT	TCT	TTT
P.l	R	D	F	D	G	K	S	K	R	I	T	M	Y	I	P	E	K	I	T
L.d	T	K	G	L	T	F	T	R	V	L	F	V	Y	S	V	V	L	N	.
L.d	ACC	AAA	GGT	TTA	ACC	TTT	ACC	CGT	GTT	TTA	TTT	GTT	TAT	AGC	GTT	GTA	CTT	AAC	TAA
P.l	CGG	GAT	TTC	GAC	GGC	AAA	AGT	AAA	CGG	ATT	ACA	ATG	TAC	ATC	CCG	GAG	AAA	ATC	ACC

Figure 47 Comparaison de la séquence du gène de l'ARN polymérase du génome mitochondrial de *P. littoralis* avec son homologue potentiel chez *L. digitata*

Les surlignages mettent en évidence les acides aminés, et les nucléotides, identiques entre les deux séquences. Le gène de l'ARN polymérase de *P. littoralis* commence 1614 nt avant la séquence montrée, et 414 nt suivent.

2.4.2. Les introns

2.4.2.1. Gène de l'ARNr 23S

Le séquençage de trois portions de ce gène nous a appris que les introns 2, 3 et 4 de *P. littoralis* n'étaient pas présents dans le génome mitochondrial de *L. digitata* (Figure 48, page 108). D'après la taille des différentes amplifications réalisées (non montré), le premier intron serait également absent.

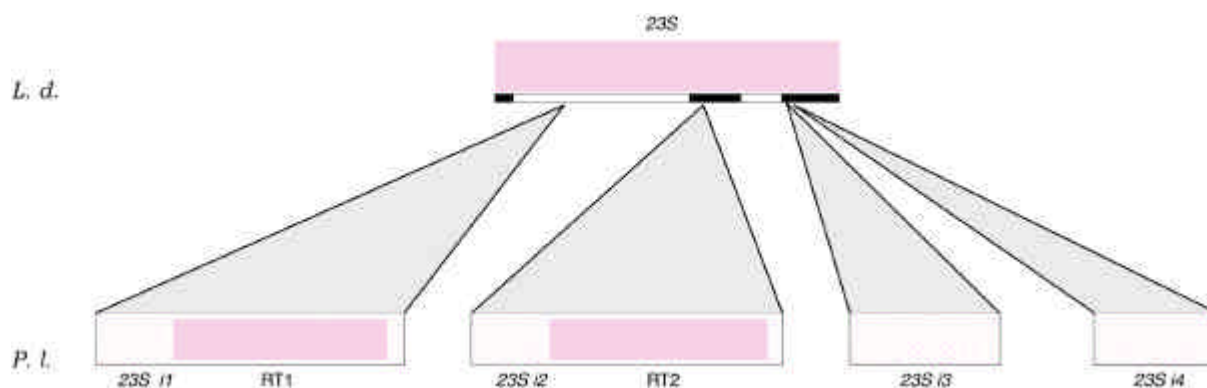


Figure 48 Comparaison du gène de l'ARNr 23S des génomes mitochondriaux de *L. digitata* et *P. littoralis*

L. d. : *Laminaria digitata*, *P. l.* : *Pyraliella littoralis*, RT : transcriptase reverse. Les gènes et les ORF sont représentés par des blocs pleins, de couleurs. Les introns (i) sont représentés par des pointillés. Les parties séquencées du génome mitochondrial de *L. digitata* sont indiquées en noir dans la barre sous les blocs de gènes, alors que du blanc indique les parties non séquencées. Les traits entre les portions des deux génomes mettent en évidence les différences.

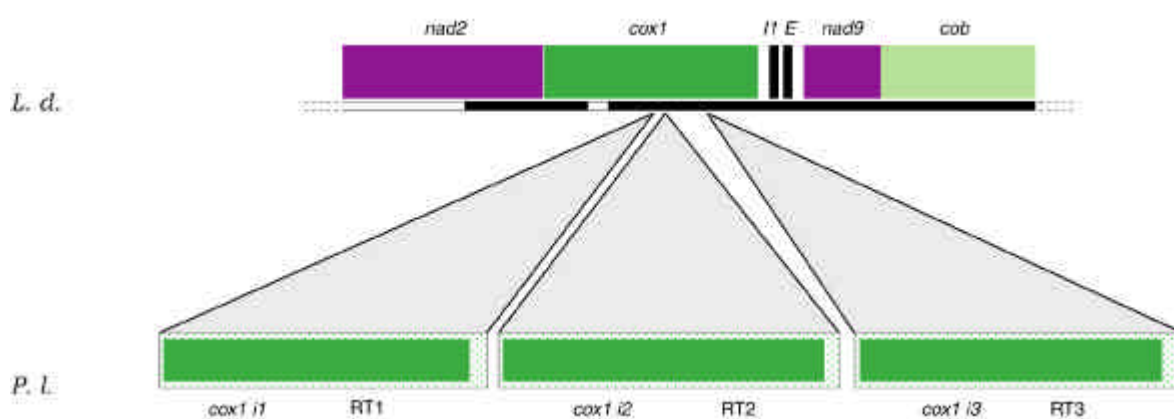


Figure 49 Comparaison de la région du gène *cox1* des génomes mitochondriaux de *L. digitata* et *P. littoralis*

L. d. : *Laminaria digitata*, *P. l.* : *Pyraliella littoralis*, RT : transcriptase reverse. Les gènes et les ORF sont représentés par des blocs pleins, de couleurs. Les introns (i) sont représentés par des pointillés. Les parties séquencées du génome mitochondrial de *L. digitata* sont indiquées en noir dans la barre sous les blocs de gènes, alors que du blanc indique les parties non séquencées. Les traits entre les portions des deux génomes mettent en évidence les différences.

2.4.2.2. Gène *cox1*

Les trois introns du gène *cox1* de *P. littoralis* sont absents de celui de *L. digitata* (Figure 49, page 108). Bien qu'il ne soit pas, lui non plus, entièrement séquencé, les sites d'insertions des trois introns de *P. littoralis* le sont, et la taille de la séquence manquante a été vérifiée par amplification.

2.4.3. Les ORFs mitochondriaux 224 et 97-237-261

La plupart des ORFs mitochondriaux de *P. littoralis* sont absents du génome mitochondrial de *L. digitata*, qu'il s'agisse de l'ORF224, entre le *trnfM* et le gène *nad7* ou du groupe des trois ORFs 97-237-261 (Figure 40 page 97 et Figure 46 page 106), entre les *trn* tryptophane et isoleucine (CAU).

2.4.4. Trois différences au niveau d'ARNt

Deux des trois cas ont déjà été évoqués. Il s'agit d'une part de la translocation entre les gènes *trnS2* et *rpl31*, et d'autre part de la présence d'un *trnD* entre les gènes *trnS1* et *rps10* (Figure 45, page 106). Nous ne savons pas s'il existe un autre gène d'ARNt D chez la laminaire au même endroit que dans le génome mitochondrial de *P. littoralis*, car cette région n'a pas été séquencée. En se référant au Tableau XII, page 100, il est intéressant de constater que les valeurs les plus faibles sont celles correspondant aux gènes codant les ARNt S1 et D, soit 82,76 et 84,72 %.

Le troisième cas est singulier, car il donne l'impression que cette fois, c'est le génome mitochondrial de *P. littoralis* qui a conservé la trace d'un gène présent dans celui de *L. digitata*. Un *trn* leucine 3 (CAA) est en effet présent chez *L. digitata*, entre les gènes *nad4L* et *rpl14* (Figure 46, page 106). La séquence qui sépare ces deux gènes chez *P. littoralis* a une grande homologie avec *trnL3* (82,72 %) mais elle ne code pourtant pas *a priori* un gène d'ARNt, car plusieurs nucléotides habituellement conservés ne le sont pas (G18 et C56), le bras D ne peut pas se former et les trois autres bras présentent des mésappariements importants (Figure 50).

```

L. d GCTTCCATGGTGAAACTGCTAGACACGGCAGATTCAAATCTTTGTCTTTTGACGTGCTGGTTCGAATCCGGCTGGAAGT
P. l GCTTCTATGGCGAAACTTGTAGACAGGTTAGGTTCAAATCTTTGTCTTTTGACGTCTGGTTTGAATCAAGTTAAAAGT

```

Figure 50 **Alignement des séquences du *trnL3* de *L. digitata* et de la région homologue de *P. littoralis***

2.5. Conclusion sur le génome mitochondrial de *L. digitata*

Ce qui est connu pour l'instant du génome mitochondrial de *L. digitata*, semble indiquer qu'il a gardé certaines des caractéristiques "primitives" de celui de *P. littoralis*, des promoteurs à facteur σ -70 potentiels et de nombreux gènes de protéines ribosomiques, bien qu'il ait évolué par rapport à lui.

En débutant ce travail, nous pensions que les deux génomes mitochondriaux seraient beaucoup plus différents l'un de l'autre. Ces deux algues brunes sont en effet considérées comme très éloignées, au niveau évolutif, en raison de leur cycle de vie et de l'organisation de leur thalle (de Reviers & Rousseau, 1999). Cet éloignement a eu lieu rapidement, car la spéciation des algues brunes est assez récente, à l'échelle de l'évolution. De plus, si on considère les arbres phylogénétiques obtenus à partir de gènes codant les ARNs ribosomiques (Figure 7, page 18), *P. littoralis* et *L. digitata* appartiennent à des groupes différents et bien séparés. C'est pourquoi il est tout à fait étonnant que ces deux génomes soient aussi semblables.

Toutefois, plusieurs points restent à préciser. Les parties non encore séquencées sont-elles bien comparables aux régions homologues de la molécule d'ADN mitochondrial de *P. littoralis* ? En effet, parmi les zones qui ne sont pas connues, des réarrangements sont toujours possibles. En particulier, juste après le gène de l'ARNr 23S, il y a plusieurs gènes d'ARNt chez *P. littoralis*, dont celui d'un ARNt D. Or, dans le génome de la laminaire, un tel gène existe dans une autre région, dans le voisinage du gène de l'ARN polymérase de *P. littoralis*.

Ces résultats et ces questions restés en suspens suggèrent qu'il serait intéressant de terminer le travail commencé chez *L. digitata*, mais également de comparer divers génomes mitochondriaux d'algues brunes, et ce d'autant plus que la phylogénie de ce groupe est encore mal définie, et que les gènes des ARNr nucléaires des algues brunes se sont révélés décevants au niveau de leur information phylogénétique (de Reviers & Rousseau, 1999).

3. Comparaisons entre différentes espèces d'algues brunes

Les conclusions de la partie précédente nous ont conduits à initier quelques comparaisons de plusieurs régions de gènes mitochondriaux choisis entre différentes espèces d'algues brunes.

De plus, des différences avaient déjà été observées entre les génomes mitochondriaux de souches de *P. littoralis* de provenances différentes, en particulier des souches chez lesquelles le cycle de reproduction sexué n'a jamais été observé.

Plusieurs couples d'amorce ont donc été utilisés sur trois autres espèces d'algues brunes, afin d'approfondir les résultats obtenus par la comparaison entre la souche axénique du *P. littoralis* de Roscoff et *L. digitata*.

3.1. Le *nad11*

L'amplification et le séquençage d'une partie du premier domaine a généralement donné de bons résultats avec les algues étudiées (Figure 51, page 112). Les amorces utilisées sont GGIAAYTGYCGNATGTG en sens, et CRYAYTCICCCICCYTGRTC en sens complémentaire.

Cette séquence représente le début qui peut permettre par la suite d'obtenir celle de la fin du gène, et de savoir ainsi si le gène comprend ou non les deux domaines de l'enzyme. La méthode utilisée pour *L. digitata* a consisté à mettre à profit la conservation de l'ordre des gènes. L'amorce dégénérée, dessinée à partir d'un alignement de gènes *nad3*, a permis d'amplifier un produit principal de la taille attendue avec l'ADN de *P. littoralis* d'Helgoland et de *Sphacelaria*. Le séquençage à partir du *nad3* a bien confirmé que le gène *nad11* de l'autre souche de *P. littoralis* était court, il n'a pas donné de résultats avec le *Sphacelaria*. Avec l'ADN de *F. serratus*, des fragments ont été amplifiés, mais les séquences obtenues ne correspondaient pas aux gènes recherchés.

Les tentatives d'amplification du second domaine du gène *nad11* (voir Chapitre III.1.5.1.1, page 90) se sont toutes soldées par des échecs.

```

H.sa *Nu*CLVEI-----EKAPKVVAACAM-----PVMKGWNILTNS---EKSKKAREGVMEFLLAN
B.ta *Nu*CLVEI-----EKAPKVVAACAM-----PVMKGWNILTNS---EKTKKAREGVMEFLLAN
S.tu *Nu*CLVEV-----EKSPKPVASCAM-----PALPGMKIKTDTF-I--AKKAREGVMEFLLMN
N.cr *Nu*CLVEV-----EKVPKPVASCAM-----PVQPGMVVKTNST-L--THKAREGVMEFLLAN
D.di *M**CLVYV---TNEE--KLAAACGI-----PLDENFDDESIEIDEILKAREGVMEFLLIN
A.ca *M**CLVEDL---KQV-KPLASCAI-----NVSNMNIYNTT--L-KVKKARESVLEFLLAN
S.sp *M**                                           KVKKAREGVMEFLLIN
F.se *M**CLVEV-----GNAPKPQASCAL-----PFMPNMRITYTNTA-L--VRKAQEFVMELELLH
L.di *M**CLVEV-----SNSPKPQASCAL-----PFLPNLRIFTNTA-L--VRKAQESVMELELLH
P.liH*M**      SPKPQASCAL-----PFLPGLRIFTNTA-x--xxxxxEVMELELLIN
P.liR*M**CLVEV-----SKSPKPVASCAL-----PFLPGLRIFTNTA-L--VRKAQESVMELELLH
C.ro *M**CLVDV-----KGSPKPIVACAS-----PYAPSMRINVEST-L--TQKARESVLEFLLIN
R.am *M**CLVEV-----EKSPKPVASCAM-----PVMNKMIFTNTP-L--VKKAREGVLEFLLVN
R.pr *B**CLVEI-----EKSQKPVASCAM-----PVSKGMVHTDTF-M--VKKAREGVMEFLLIN
R.ca *B**CLVEVV---GGPPKPTASCAMQIKDLRPGPNGEPSVIKTNST-M--VKKAREGVMEFLLIN
P.de *B**CLVEVV---GGPPKPAASCAMQVKDLRPGPEGAPSEIRTNST-M--VKKAREGVMEFLLIN
R.op *B**CSVKL---NG-T-VVAACTI-----RVANGMKIEVDEPEVDMRKAN---VELLFAR
E.co *B**CAVKQYQNAEDTRGLVMSGMT-----PASDGTFTSIDD-E--EAKQFRESVVEWLMTN
N.ov *H**CLVES---AK-SPGYPIISCRT-----PVEEGMEIVTQGS---KMKEYRQANLALMLSR

```

Figure 51 Alignement de la portion de séquences de gènes *nad11* amplifiée

Nu : gène nucléaire d'une protéine mitochondriale ; M : gène mitochondrial d'une protéine mitochondriale ; B : gène protéobactérien ; H : gène nucléaire d'une protéine d'hydrogénosome. *H.sa* : *Homo sapiens* (X61100) ; *B.ta* : *Bos taurus* (P15690) ; *S.tu* : *Solanum tuberosum* (X85808) ; *N.cr* : *Neurospora crassa* (P24918) ; *D.di* : *Dictyostelium discoideum* (AB000109) ; *A.ca* : *Acanthamoeba castellanii* (S53832) ; *S.sp* : *Sphacelaria* sp. (non publié) ; *F.se* : *Fucus serratus* (non publié) ; *L.di* : *Laminaria digitata* (non publié) ; *P.liH* : *Pylaiella littoralis* souche d'Helgoland (non publié) ; *P.liR* : *Pylaiella littoralis* souche de Roscoff (AF110139) ; *C.ro* : *Cafeteria roenbergensis* (AF193903) ; *R.am* : *Reclinomonas americana* (AF007261) ; *R.pr* : *Rickettsia prowazekii* (AJ235273) ; *R.ca* : *Rhodobacter capsulatus* (AF029365) ; *P.de* : *Paracoccus denitrificans* (M84572) ; *R.op* : *Rhodococcus opacus* (U70364) ; *E.co* : *Escherichia coli* (P33602) ; *N.ov* : *Nyctotherus ovalis* (Y16775).

3.2. Le *cox2*

Cette amplification n'a donné des résultats positifs qu'avec la laminaire, tout d'abord, puis avec le *Sphacelaria* (Figure 52, page 113). Les amorces sont, en sens GGNCAYCARTGGTAYTGG et en sens complémentaire GGCATRAANCCRTGRTTNAC. Le fragment amplifié a une longueur de 2,4 kb, dans le cas où l'insert est présent, sinon elle est de l'ordre de 260 nt.

Alors que le gène de *L. digitata* contient l'insertion en phase, comme celui de *P. littoralis*, le gène de *Sphacelaria* ne la contient pas.

```

N.cr*M*SYQY-PDF-----LDSND-EFIEFD-SYIVPESDLEEGA-----
D.di*M*SYEY-GD-NA-----SNLIEFD-SYMYVERDLAEGQ-----
A.th*M*TYEY-SDYNS-----SDE--QSLTFD-SYMIPEEDLELQ-----
M.po*M*TYEY-SDYNS-----SDE--QSLTFD-SYMIPEEDLELQ-----
N.ol*M*SYEY-SDY-----PETIAFD-SYMIPEEDLELQ-----
P.wi*M*SYEY-SDYSI-----ADD--QSIADF-SYMIPEEDLELQ-----
A.ca*M*SYEY-SDYSV-----VY-SN-RMLDYD-SYMIHEAELNLGD-----
C.cr*M*SYEY-SDY-----LNEDD-DSINYD-SYMIPEEDLELQ-----
P.pu*M*SYEY-SDY-----TNDD-EAITFE-SYMIPEEDLTSGQ-----
C.me*M*SYEY-SDY-I-----GENG--EIINF-D-SYIPEEDLELQ-----
C.ca*M*SYEY-SDY-----VNEEN-EFLAFH-SYILPEEDLELQ-----
C.ro*M*SYEF-VNPPYLYKDMKLHGL--SDLSKQFF--SDDSGS-VITYD-SYMSNDDAVSRE-----
P.in*M*SYEY-SD-NL-----EFSD-EPLIFD-SYMQEEDDLAIGQ-----
S.sp*M*SYEY-SDYVNQIAE-----SNEENI-TKV--KGKFD-SYLVPEEELMIPKPYKSV-----KGANV
L.di*M*SYEC-SDFEVSPTIKK-DN-L X KNRGEEET--TER--QRINF-D-SYLI TDDDLVPEVSGSG-----KAGKV
P.li*M*SYEC-SDFEVSP--KDQQESI X LIKGNIDTCNTQEV DVERINF-D-SYLI ADEDLVPEASGTG-----KAGKV
R.am*M*SYEY-SDYT-----TDSESLAFD-SYMLPESELKEGQ-----
R.pr*a*HYIY-PDY-----DNLEFD-SVMISDKNLQIGQ-----
R.sp*a*GYEY-PD-----EEISFE-SYMI GSPATGGDNMSPEVEQQLEAGYT
B.ja*a*SYAY-PD-----NGKF-EFD-SLMAQDKQP-----
P.de*a*SYEY-PN-----DGVAFD-ALMLEKE--ALAD-----AGYS
M.tu*A*KFGYXPERKRAMVSKPE-GK----DKYGEE--LVGPVRGLNT-EDR-TYL-NFDKV--ETLGTS-----
S.co*A*CFNH-IEDVPGSTGDAKTSKELAGI--PDRFIEDFPA-NA-GGVYD-CGTPGTENPQTGN-----
Syn *c*IFTY-PE-----TG-----

```

Zone de l'insertion

X : inserts (Figure 42, page 103)

```

M.tu*g** X QRVNFKDGTLTYDGAD
M.po*M** X IPMVIPETTIKFD
A.ca*M** X SIDRFAAMEMMYKGMGYLKDRSLLSYLY

```

```

N.cr*M*--LRMLEVDNRVIL-PELTHVRFIITAGDVIHDFAVPSLGVKCDAYPGRLNQVSVFI-----NREGVFGQCSEIC
D.di*M*--LRLLEVDNAMVV-PVKTHIRLIITSGDVLHSAIPSGIKVDVAPGRLNQIGLYV-----KREGTFYGCSELC
A.th*M*--SRLLEVDNRVVV-PAKTHLR IIVTSADVPHSWAVPSSGVKCDVAPGRLNQISILV-----QREGVYFGQCSEIC
M.po*M*--LRLLEVDNRVVV-PAKTHLRMIITSAADVLSHSAVPSLGVKCDVAPGRLNQTSIFI-----KREGVYFGQCSELC
N.ol*M*--LRLLEVDNRVVV-PAHTHIRIIITAADVLHSAVPSLGIKCDVAPGRLNQVSTFI-----QREGVYFGQCSEIC
P.wi*M*--YRLLEVDNRVVV-PVDTHIRVITAADVLHSAIPSLGVKCDVAPGRLNQIPMFI-----KREGVYFGQCSELC
A.ca*M*--LRLLEVDNRVFL-PKNTHIRLLITSSDVLHSAVPSFGVKVDVAPGRLNQTSILY-----KNTGTFGQCSELC
C.cr*M*--FRLLEVDNRMI-PINTHIRVIVTAADVLSHSAVPSFRSKCDAPGRLNQTSLFI-----KREGVYFGQCSEIC
P.pu*M*--LRLLEVDNRMI-PVNTHIRVITAADVLHSAVPSLGIKCDVAPGRLNQSSIFV-----KREGIFYGCSEIC
C.me*M*--FRLLEVDNR IIV-PVNTHIRVIVTSADVLSHSAVPSLGVKCDGIPGRLNQISLFI-----KREGVYFGQCSELC
C.ca*M*--FRLLEVDNR IIV-PVNTHIRVITAADVLHSAVPSLGVKCDAPGRLNQISFFI-----KREGIYFGQCSEIC
C.ro*M*--QRLLEVDNR IIV-PVNTHIRVITAADVLHSAVPSLGVKCDACPGRLNQTSMFI-----KREGIFYGCSEIC
P.in*M*--FRLLEVDNRVVL-PIYTHIRALVTGADVLSHSAIPSLGVKVDSCPGRLNQIFLFI-----KRDGVYFGQCSEIC
L.di*M*--FRLLEVDNRVVL-PTNTHIRVITGADVLSHSAVPSLGVKVDACPGRLNQVFLFI-----KREGVYFGQCSELC
P.li*M*--FRLLEVDNRVFL-PTNTHIRVITGADVLSHSAVPSLGVKVDACPGRLNQVFI-----KREGVYFGQCSELC
R.am*M*--LRLLEVDNRIFL-PTHTHIRVITGADVLSHSAVPSLGVKVDACPGRLNQASIFL-----KREGIFYGCSEIC
R.pr*a*--KRLLEVDNR IIV-PENTTVRFLITAGDVIHDFAVPSLGFKIDVAPGRINETWTRV-----TKKG VYFGQCSELC
B.sp*a*RDEFLLATDNTAMVV-PVNKTIVVQVTGADVLSHSAVPSFGVKVDVAPGRLAQLWFA-----EREGIFFGQCSELC
B.ja*a*--RLLGVDNEMVV-PVNKTIVVQVTGADVLSHSAVPSFGVKVDVAPGRLAQLWFA-----EREGIFFGQCSELC
P.de*a*EDEYLLATDNPVVV-PVGKKVLVQVTATDVIHAWTIPAFVAVKQDAPGRIALWFSV-----DQEGVYFGQCSELC
M.tu*A*-----TEIPVLVLP SGKRIEFQMASADVIHAFVWPEFLFKRDVMPNPVANNVNVFQIEEITKTGA FVGHCAEMC
S.co*A*-----PGPTLWL-PKGKTVRFVLT SRDVIHSAFVWVFPFLMKQDVI PGHTNAFEVTP-----KEGTFLGKCAELC
Syn *c*-----IISGELHA--PIDRPVQLNMEAGDVIHAFWIPQLRLKQDVIPGRGSTLVFNA-----STPGQYPVICAEELC

```

Figure 52 Alignement de la portion de séquences de gènes *cox2* amplifiée

M : mitochondrie ; a : α -protéobactérie ; A : actinomycète ; c : cyanobactérie. *N. cr* : *Neurospora crassa* (P00411) ; *D. di* : *Dictyostelium discoideum* (X81884) ; *A. th* : *Arabidopsis thaliana* (Y08501) ; *M. po* : *Marchantia polymorpha* (M68929) ; *N. ol* : *Nephroselmis olivacea* (AF110138) ; *P. wi* : *Prototheca wickerhamii* (U02970) ; *A. ca* : *Acanthamoeba castellanii* (U12386) ; *C. cr* : *Chondrus crispus* (Z47547) ; *P. pu* : *Porphyra purpurea* (AF114794) ; *C. me* : *Cyanidioschyzon merolae* (D89861) ; *C. ca* : *Cyanidium caldarium* (Z48930) ; *C. ro* : *Cafeteria roenbergensis* (AF193903) ; *P. in* : *Phytophthora infestans* (U17009) ; *S. sp* : *Sphacelaria* sp. (non publié) ; *L. di* : *Laminaria digitata* (non publié) ; *P. li* : *Pylaiella littoralis*

(AF110139); *R. am* : *Reclinomonas americana* (AF007261); *R. pr* : *Rickettsia prowazekii* (AJ235273); *R. sp* : *Rhodobacter sphaeroides* (M57680); *B. ja* : *Bradyrhizobium japonicum* (U33883); *P. de* : *Paracoccus denitrificans* (X05828); *M. tu* : *Mycobacterium tuberculosis* (Z70283); *S. co* : *Streptomyces coelicolor* (AL049497); *Syn* : *Synechocystis* sp. CCP 6803 (D90905).

3.3. Le 16S

Le choix de cette région a été motivé par la présence du promoteur en amont du gène. La connaissance du début du gène permet en effet un "ancrage" pour l'amplification ultérieure de la séquence en amont. Les amorces utilisées sont en sens GTTTGATCCTGGCTCAGA et en sens complémentaire CTAAGSATCAAAGGCTTGG. Elles permettent l'amplification d'un fragment de 240 nt (Figure 53).

Bien que ce fragment soit de petite taille, il permet d'identifier des signatures uniques à la lignée des algues brunes.

```
Z.m*P*-CTCATGGAGAGTT-CGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCATGCTT-AACACATGCAAGTCCA-
P.l*P*AACTATCGAGAGTT-TGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGTATGCTTT-ACACATGCAAGTGGT-
C.c*P*TAACAACGGAGAGTT-TGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGTATGCTT-AACACATGCAAGTCCA-
Ana*c*-GAAACGGAGAGTT-TGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGTATGCTT-AACACATGCAAGTCCA-
M.p*M*CAAAAAAAGAGTT-TGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTAGCGATATGCTT-AACACATGCAAGTCCA-
C.c*M*ATAATAAAGAGTT-TGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTAGTGGTAGCTT-AACACATGCAAGCTAAA
A.c*M*ACAATCGTTGGGTT-TTATTCTGGCTCCGAGTGAACGCTGGTAACATATTTTAAACACATGCAAGTCCA-
Sph*M*ATGAAGGCTATAAGTCTGCTTTAATACATGCGAGTTGT-
F.s*M*AGTT-TGATCCTGGCTCAGGATGAAGGCTATAAGCCTGCTTGAATACATGCGAGTCCA-
L.d*M*AGTT-TGATCCTGGCTCAGGATGAAGGCTATAAGCCTGCTTGAATACATGCGAGTTGA-
P.l*M*ATAAAAAATGAGTT-TGATCCTGGCTCAGGATGAAGGCTATAAGTCTGCTTGAATACATGCGAGTCCA-
P.H*M*TT-TGATCCTGGCTCAGGATGAAGGCTATAAGTCTGCTTGAATACATGCGAGTCCA-
C.r*M*GAATTAAATGGGTT-TGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTTATGGTATGCTTT-ACACATGCAAGTTTA-
R.a*M*-TAATAGAGAGTT-TGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTAGCGATACGCTT-AACACATGCAAGTTGA-
R.p*a*CAAACTTGAGAGTT-TGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTATCGGTATGCTT-AACACATGCAAGTCCA-
R.e*b*TAGAAGTGAAGAGTT-TGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCATGCTT-ACACATGCAAGTCCA-
A.v*g*--ACTGAAGAGTT-TGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCATGCTT-AACACATGCAAGTCCA-
E.c*g*--AAATTGAGAGTT-TGATCATGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCAGGCTT-AACACATGCAAGTCCA-
-> 1 <- >3 >4 >5 >
```

```
Z.m*P*ACGGGAAGT-----GGT-----GTTTCCAGTGGCGAACGGGTGAGTAAC
P.l*P*ACGA-AAGT-----GTTAA-----AACTTT-AGTGGCGACGGGTGAGTAAC
C.c*P*ACGA-AAGT-----TAAT-----GCTTT-AGTAGCGGACGGGTGAGTAAT
Ana*c*ACGG---TCTC-----TTCG-----GAGA---T-AGTGGCGGACGGGTGAGTAAC
M.p*M*ACGTT--GTT-----TTCG-T-----CCTTACGTGTTAACCTTTTCTCTCT
C.c*M*AT-----TT-TTTAT-----TAGTT---ATAAA--A--TT-AGTAGCGAACGGGTGAGTAAT
A.c*M*ACGAAAAGTA-----AATT-----TACTTTAAGTGGTGACCTGGTGAGTAGT
Sph*M*ATGGT-----TAAG-----ATCCATAGCGTACGGGTGAGTAAT
F.s*M*ATGGT-----TAAC-----ACCATGGCGTACGGGTGAGTAAT
L.d*M*ATGGT-----TAA-----ACCATAGCGTACGGGTGAGTAAT
P.l*M*ATGAT-----TTAG-----ATCATGGCGTACGGGTGAGTAAT
P.H*M*ATGGT-----TTGG-----ACCATGGCGTACGGGTGAGTAAT
C.r*M*ATGAGAAAAAGAAATAATTATTGATCTTTTAAATAATTCTTTTATTATAGCGAACGGGTGAGTAA-
R.a*M*ATGG-GGTATTCA-----TAT-----TGAG-TATTCC--ATAGCGAACGGGTGAGTAAT
R.p*a*ACGG-ATTAACTAGAG-----CTCG-----CTTTAGTTAA-TT-AGTGGCAGACGGGTGAGTAAC
R.e*b*ACGGCAGCA--C--GGGC-----TTCG-----GCCT-GG-TG--GCCAGTGGCGAACGGGTGAGTAAT
A.v*g*ACG-C-----GAAAGGGC-----TTCG-----GCCTGAGTA-----GAGTGGCGGACGGGTGAGTAAC
E.c*g*ACGGTAACAGGAAGAG-----CTTG-----CTTCTTGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAAT
-> >>> > 6 < <<<- <- <- 7 >
```

```

Z.m*P*CGCTAAGAACCTGCCCTTGGG---AGGGGAACAA--CAACTGGAACGGTTGCTAATACCCCGTAG--
P.l*P*ACGTGAGAAATTTACGTTTAGG---AGGGGAATAA--CAGTTGGAATGACTGCTAATGCCGCATA---
C.c*P*ACATAAGAAATCTGCCCTTAGG---AGGGGAATAA--CAATTGGAACGATTGCTAATGCCGCATA---
Ana*c*CGCTGAGAAATCTAGCTTCAGG---TCGGGGACAA--CCACTGGAACGGTGGCTAATACCGGATG---
M.p*M*CTGAGCTGCTCAACTTTTAATCAGTTGAGCC-----TGC GGCC TCCAATCAACCGTGAGA
C.c*M*GCATAAAAAATTAACCTTAAAA---AATTGT-TAAATACATT-TAAA-----
A.c*M*ATAGGAGAAATGAAGTGTGGGT---T-AGGCTAAAT-TCCTAAATT--ATTA-----
Sph*M*AAACGATATCTATACCCAAC--TC-GGAATAA---TTCTA-----
F.s*M*AGGCTAGTATCTAGCCCCGACT---CTGGAATAA---TCCCA-----
L.d*M*AGGCTAATATCTGGCTTCAACC--TCGGGA-TAA---TCCTA-----
P.l*M*AGACTCATATCTGGCCCCAAT--CTTGA-TAA---TCCTA-----
P.H*M*AGGCTAATATCTGGCCCCAAT--CTTGA-TAA---TCCTA-----
C.r*M*AAACTTTTTTTTTTACCAATCAAT---TTAAGA-AA---TTCGTGCAATATGAA--AA-----
R.a*M*ACACAAGAACTTGCCTAACAG---CTCGGGATAAGTATAGTAACACTTTAGTGTAC---GAATTAAAG
R.p*a*ACGTGGGAACTACCCATCAG---TACGGAATAA--CTTTTAGAAATAAAAGCTAATACCGTATA---
R.e*b*ACATCGGAACGTGCCCTGTAG---TGGGGGATAA--CTAGTCGAAAGATTAGCTAATACCGCATA---
A.v*g*GCTATGGGAATCTGCCCTGGCAG---AGGGGGATAA--CCCGGGGAAACTCGGGCTAATACCGCATA---
E.c*g*GTCTGGGAAACTGCCCTGATGG---AGGGGGATAA--CTACTGGAACGGTAGCTAATACCGCATAA---
      8 ->      8      8 ->      -> 9 -> 1  ->>>      9 <<<-      9 <-

Z.m*P*--GCT-----GAGG-----AGCAA-AA-----GGAG-----AAATCC-----GCCCAAGGAG
P.l*P*TCGT-----A-AT-----TATGAxAAC-TAT-GAA-AG-----AAGAAATTC-----GCCATAAGAA
C.c*P*-TGCTTC-----AG-----AGTGA-AA-----CAGA-----GAAATCTG-----CCTTAAGAT
Ana*c*-TGCC-----GAAA-----GGTGA-AA-----GAT--TT-----ATT-----GCCTGAAGAT
M.p*M*ATCGTTGAAACAAAGTGGCGAACGGGC-ACAGTTTGGGACAA-----ATCCGAAxGCTGTTTGAT
C.c*M*-----TTAATTAAAAATTAA-----ATT-----GTTTAAAGAA
A.c*M*-----AAAAATAAAGAT--TTAT-----ATC-----GCCTACAATA
Sph*M*-TCTCTTTG-GGGAGAAATT-AC--AGA-AAAAACCGAATATTTGTTTTAAAGGTTTTTCx--GGTTGGGGGT
F.s*M*-TCCCTCCG-GGGAGAAAGCAACA-GGA--AAATACCGATATA-TA-A--AAAGGCACGCC--GGTCGGGGAT
L.d*M*-TCCCCAG-GGGAGAAAGAAACA-GGA--AAATACCGGATAAATATA-TAAAGGTCCGCC--GGTTGAAGAT
P.l*M*-TCCCTCCG-GGAGAAA-AAA-AGGGA--AATACAGGATAATTAT----AAGGTACGCC--GGTTGGGGAT
P.H*M*-TCCCTCAG-GGGAGAAAGAAA-AGGGA--AATACAGGATAGTTAT--AAAGGTACGCT--GGTTGGGGAT
C.r*M*-TCTTAAATAAAAAAATTTTTTTTAgGAA--AAT-TTGTa-AAA-----GACTATACGTT--GTTGATTGAT
R.a*M*ATAGTTTTTTT--GGATTATCTTAAATA-TAAATACCGGATA--TA-TTGAAGATTAAATC--GCTGTAGAT
R.p*a*TTCTCTAC---G-----GAGGA-AA-----GAT--TT-----ATC-----GCTGATGGAT
R.e*b*CGACCT-----GAG-----GGTGA-AAGC-GGGGGACCG-TA-----AGGCCTC-GC-TCTACAGGAG
A.v*g*CGCCCTAC---G-----GGGGA-A--AGGGGG-C-TTCG-----G-CTCTC--GTTGCCAGAT
E.c*g*CG-TC-GC-----AA-----GA-CCA-AAG-AGGGGGACCTTCA-----GGCCTCTT--GCCATCGGAT
      ->>>      10      <<<-      11 ->>>      11      <<<- 11      8 <<-

P.l*P* x-GACATATCAT
M.p*M* x-TAAACGAAAGCTAAAAAGG
Sph*M* x- ATTAAATATTATTAAATATTCAATAAAAAATT

Z.m*P*GGGCTCGCGTCTGATTA-GCTAGTTGGTGAGG-CAATAGCTTACCAAGGCGATGATCAGTAGCTGGTCC
P.l*P*AGGCTTGGCTCTGATTA-GCTAGTTGGTAAGGGTAAAGGCT-AC-AAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCT
C.c*P*GAGCTTATGCCTGATTA-GCTAGTTGGTAAAT-TAAAGCTTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCT
Ana*c*GAGCTCGCGTCTGATTA-GCTAGTTGGTGTGG-TAAGAGCGCACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCT
M.p*M*GAGCCTACAAAGCATCA-GGTAGTTGGTTAGG-TAAAGGCTGACCAAGCCACGACGCTTAGCGGGTCT
C.c*M*AGGTTTTATGTAAGATTA-AGTTGTTGGTAATT-TAATAGATACCAAGCTTACGATCTTATGTTGGTCT
A.c*M*GAGCTTCTAAAGGATTA-GGTAGTTGTTGAT-TAATTATTCAACAAGCCGACGATGCTTAGCTGGTCT
Sph*M*GAGATCGAATAGTATTA-GGTAGTTGGTAAA---AAAAGCTTA
F.s*M*GATTAGGCCAGTATTA-GGTAGTTGGT-ATGTTAAA-GCTTACCAAGCCTTTGATCCTTAG
L.d*M*GATT-AGTTCAGTATTA-GGTAGTTGGTGAAG-TAAA-GCTCACCAGCCTTTGATCCTTAG-----
P.l*M*GATTAGGTGAGTATTA-GGTAGTTGGTAAAG--TAA--GCTTACCAAGCCTTTGATGCTTAGTTGGTCT
P.H*M*GATTAGGTGAGTATTA-GGTAGTTGGTAAA--TAATAGCTTACCAAGCCTTTGATCC
C.r*M*GAAAAAGAAAGTATTA-GGTTGTTGG-----TTTT-----CCAAGCCGAAGATGCTTAGTTGGTCT
R.a*M*AGGCTTGTGAGGAATATGGTAGTTGAGG-TAATGGCCTACCAAGCCTTTGATCCTTAGCCTGGTCT
R.p*a*GGGCCCCGCTCAGATTA-GGTAGTTGGTGAGG-TAATGGCTCACCAGCCGACGATCTGTAGCTGGTCT
R.e*b*CGGCCATGCTGATTA-GCTAGTTGGTGGG-TAAAGGCCACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCT
A.v*g*GAGCCCATGTCGATTA-GCTAGTTGGCGGG-TAAAGGCCACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCT
E.c*g*GTGCCAGATGGGATTA-GCTAGTAGGTGGG-TAACGGCTCAGCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCT
      8      8<<-  ->>>      ->>> 12      <<<-      <<<-  ->>>

```

Figure 53 Alignement d'une portion de séquences de gènes d'ARNr 16S de plastes, mitochondries et bactéries

L'alignement correspond aux 296 premiers nucléotides du 16S d'*Escherichia coli*. La dernière ligne donne des indications sur la structure secondaire. Les x correspondent à des insertions qui sont indiquées en dessous. P: plaste ; c: cyanobactérie ; M: mitochondrie ; a: α -protéobactérie ; b: β -protéobactérie ; g: γ -protéobactérie. Z.m: *Zea mays* (X86563) ; P.l: *Pylaiella littoralis* souche de Roscoff (P: X14873 ; M: X14874) ; C.c: *Chondrus crispus* (P: Z29521 ; M: Z47547) ; Ana: *Anabaena* sp. (X59559) ; M.p: *Marchantia polymorpha* (M68929) ; A.c: *Acanthamoeba castellanii* (U12386) ; Sph: *Sphacelaria* sp. (non publié) ; F.s: *Fucus serratus* (non publié) ; L.d: *Laminaria digitata* (non publié) ; P.H: *Pylaiella littoralis* souche d'Helgoland (non publié) ; C.r: *Cafeteria roenbergensis* (AF193903) ; R.a: *Reclinomonas americana* (AF007261) ; R.p: *Rickettsia prowazekii* (M21789) ; R.e: *Ralstonia eutropha*, souche ATCC 17697 (M32021) ; A.v: *Allochromatium vinosum*, souche ATCC 17899 (M26629) ; E.c: *Escherichia coli* (M25588).

3.4. Le 23S

Dans le cas du 23S, deux amplifications ont été réalisées. Le premier couple d'amorces de *P. littoralis* de Roscoff utilisées encadre le deuxième intron : GATAACCCTGTTGAAGG en sens et GCTACCTTAGGACCGTC en sens complémentaire. Une autre amorce en sens complémentaire (CACGACGTTCTAAACCCAA), dessinée à cette occasion à la fin du 23S, permet de vérifier si les introns 3 et 4 sont présents.

Le gène de l'ARNr 23S de la souche d'Helgoland de *P. littoralis*, n'a pas le second intron (Figure 54), par contre, il possède au moins un intron dont l'extrémité 3' est la même que celle du 4 de la souche de Roscoff (Figure 55). La séquence du fragment amplifié n'est pas connue entièrement, ce qui ne permet pas d'affirmer que l'intron 3 est totalement absent.

```
P.l GATAACCCTGTTGAAGGAACTCGGCAAAATGACTCTGTAACTTCGGAATAAGGGGT
P.H GATAACCCTGTTGAAGGAACTCGGCAAAATGACTCTGTAACTTCGGAATAAGGGGT
F.s          AACTCGGCAAAATGACTCTGTAACTTTGGAATAAGGAGT
L.d GATAACCCTGTTGAAGGAACTCGGCAAAATGACTCTGTAACTTCGGAATAAGGAGT
Sph  AACCCTGTTGAAGGAACTCGGCAAAATGACCCGTAACCTCGGATAAGGGGT
      boucle  -> ----> 129 <- ----<-
```

Site d'insertion de l'intron dans *P. littoralis* de Roscoff axénique ↓

```
P.l AAAGTTAT-TAGCGTAAGCTTT-TATCTTTGACACAAAATCGGGGGTGGCGACTGTTTATTAATAA*
P.H AAAGTTAT-TAGCGCAAGCTTT-TATCTTTGACACAAAATCGGGGGTGGCGACTGTTTATTAATAA
F.s AAAGGT-TTAAGCGAAAGCTTCTACTCTTTAAGA-----GGGTGGTGAAGATTTATTAATAA
L.d AAAGGCATGTAGCGTAAGCTTT-TGTCTTTGTACAAAATCGGGGGTGGCGACTGTTTATTAATAA
Sph AAAAACGTGTAGTGTA-GCTATGCGTTTTTTGGCACAAAATCGGGGGAGGCGACTGTTTATTAATAA
      -->----- --> 130 <- ----<- --> 133 <- ----
```

```
P.l CA--CAGGTCTCTGCTAACTCGCAAGAGGATGTATAGGGACTGACACCTGCCCGGTGCCGGCAGGTAAA
P.H CA--CAGGTCTCTGCTAACTCGTAAGAGGATGTATAGGGACTGACACCTGCCCGGTGCCGGCAGGTAAA
F.s CCAACAGGTCTCTGCTAACTCGTAAGAGGATGTATAGGGACTGACACCTGCCCGGTGCCGGTAGGTGAA
L.d CA--CAGGTCTCTGCTAACTCGCAAGAGGATGTATAGGGACTGACACCTGCCCGGTGCCGGTAGGTGAA
Sph CA--CAGGTCTCTGCTAACTCGTAAGAGGATGTATTGGGACTGACACCTGCCCGGTGCTGGTAGGGTAA
```

```

<-          ->>-----> 134 <<-----<<-
P.l GCTTGAATGTTTACGCGTTTAAAGTCAAACCCCGGTAAACGGCGGCTGTAACCTATGACGGTCCTAAGGTAGC
P.H GCTTGGATGTTTACGCATTTAAGTCAAACCCCGGTAAACGGCGGCTGTAACCTATGACGGTCCTAAGGTAGC
F.s GCCTGAATGTTTACGCATTGAGGTCAAACCCCGGTAAACGGCGGCTGTAACCTAT
L.d GCTTTGATGTTTACGCATTGAGGTCAAACCCCGGTAAACGGCGGCTGTAACCTATGACGGTCCTAAGGTAGC
Sph GCTTTAATGTTTATGATTTGAGTTAAACCTCAGTAAACGGCGGCTGTAACCTAT
----->> 138 <<-----

```

Figure 54 Alignement d'une portion de séquences de gènes d'ARNr 23S de cinq algues brunes (autour de l'intron 2 de *P. littoralis*)

La région montrée correspond aux nucléotides 1652 à 1934 de la séquence d'*E. coli*. P.l : *Pylaiella littoralis* souche de Roscoff (Z48620) ; P.H : *Pylaiella littoralis* souche d'Helgoland (non publié) ; F.s : *Fucus serratus* (non publié) ; L.d : *Laminaria digitata* (non publié) ; Sph : *Sphacelaria* sp. (non publié).

Site d'insertion de l'intron 4↓ dans *P. littoralis* de Roscoff axénique

```

P.l TTTGGCACCTCGATGTCGACTCATCACATCCTGGAGCTGGAAAAGGT-TCCAAGGGT
P.H (Intron)          CTCATCACATCCTGGAGCTGGAAAAGGT-TCCAAGGGT
L.d TTTGGCACCTCGATGTCGACTCATCACATCCTGGAGCTGGAAAAGGT-TCCAAGGGT
      179              181              182

P.l TCGGCTGTTGCGCCGACGAAAGTGGTACGTGAGTTGGGTTTGAACGTCGTGAGACAGTTTGG
P.H nnGCTTGTTGCGCCGACGAAAGTGGTACGTGAG
L.d nnnnTTGTTGCGCCGACGAAAGTGGTACGTGAGTTGGGTTTGAACGTCGTGAGACAGTTTGG

```

Fin de l'intron 4 de *P. littoralis* de Roscoff axénique :

```

P.l GAGCCGTATGAATGGAGACATTATATATCGTACGGTTTTGGAGTAGCAGGAGGTAAACATGTACTTGACTATAAG
P.H GAGCCGTATGAATGGAGACATTCACGTACGGTTTTGGAGTAGCAGGATATATGGTAACATATATCTTGACTATAAG

```

Figure 55 Alignements d'une portion de séquences de gènes d'ARNr 23S de trois algues brunes (autour de l'intron 4 de *P. littoralis*)

La région montrée correspond aux nucléotides 2501 à 2610 de la séquence d'*E. coli*. P.l : *Pylaiella littoralis* souche de Roscoff (Z48620) ; P.H : *Pylaiella littoralis* souche d'Helgoland (non publié).

Le gène de l'ARNr 23S de *Sphacelaria* n'a, *a priori*, aucun des trois derniers introns présents dans le gène de *P. littoralis* de Roscoff. La séquence obtenue à partir de la fin du gène n'est pas très lisible, mais elle confirme néanmoins l'absence du 4^e intron.

3.5. Conclusion sur les comparaisons entre différentes espèces d'algues brunes

Malgré le petit nombre d'espèces et de gènes utilisés (et surtout la taille des séquences considérées), les résultats obtenus sont des préliminaires intéressants à une étude de plus grande envergure. En effet, la comparaison entre ces génomes mitochondriaux de différentes algues brunes a permis de discriminer ce qui pouvait être un caractère spécifique de chaque algue considérée, d'un caractère spécifique de la lignée même des algues brunes.

Ainsi, nous avons montré que la présence de l'intron 2 de la grande sous-unité de l'ARN ribosomique était spécifique à *P. littoralis* de Roscoff, alors que le gène *nad11* tronqué est présent dans les génomes mitochondriaux d'au moins deux des algues considérées. De même, dans les alignements de séquences protéiques, les séquences de *P. littoralis* apparaissaient souvent comme très mutées par rapport à celles d'autres organismes ; en considérant aussi celles des autres algues brunes, certaines mutations se révèlent des signatures de cette lignée et non pas des aberrations propres à *Pylaiella*.

Conclusion

Conclusion générale

L'objectif de cette thèse était de caractériser les génomes mitochondriaux des algues brunes *Pylaiella littoralis* et *Laminaria digitata*, en complétant les travaux réalisés sur la première et en initiant des comparaisons avec la seconde.

Cet objectif a été atteint en ce qui concerne *P. littoralis* et largement dépassé pour la partie concernant *L. digitata*. De plus, les études étendues à plusieurs espèces d'algues brunes, bien que préliminaires et ponctuelles, laissent présager un groupe solide, présentant un nombre important de signatures, ce qui va dans le sens des travaux réalisés à partir des séquences nucléaires (de Reviers & Rousseau, 1999). Elles permettent également de dire que le génome mitochondrial de *P. littoralis*, bien que différent de ceux d'autres organismes considérés comme inférieurs, n'est pas un cas atypique d'évolution mais un représentant primitif de sa lignée. Etant donné d'une part l'avancement de la caractérisation du génome mitochondrial de *L. digitata* et d'autre part les outils mis en place au cours de cette première phase de travail, il serait intéressant de finir le séquençage, afin de répondre aux questions restées sans réponses. La poursuite des comparaisons réalisées pourrait aider à établir les relations phylogénétiques entre les algues brunes, voire à déterminer leurs plus proches cousins, parmi les hétérocontophytes.

La présence du gène d'une ARN polymérase de type phagique, et des répétitions qui l'entourent, dans le génome mitochondrial de *P. littoralis*, est peut-être la trace de l'événement ayant conduit à la perte et au remplacement de l'ARN polymérase bactérienne. Une autre hypothèse est que cette intégration serait un événement ponctuel, sans doute survenu dans l'ancêtre des algues brunes, mais postérieur au remplacement de l'ARN polymérase chargée de la transcription de l'ADN mitochondrial. L'analyse de génomes mitochondriaux ayant conservé des caractéristiques primitives peut permettre de comprendre comment un bouleversement aussi important que le changement de l'appareil transcriptionnel a eu lieu. Pour cela, il faudrait trouver des génomes mitochondriaux ayant conservé des traces de la cohabitation des gènes des deux types de polymérases. C'est-à-dire des états intermédiaires, entre celui de *R. americana* et *P. littoralis*.

Bibliographie

Bibliographie

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J. & Raff, M. (1995). Conversion de l'énergie : mitochondries et chloroplastes. In *Biologie moléculaire de la cellule* (Flammarion, ed.), Paris.
- Allison, L. A., Simon, L. D. & Maliga, P. (1996). Deletion of *rpoB* reveals a second distinct transcription system in plastids of higher plants. *EMBO J.* **15**, 2802-2809.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403-10.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389-402.
- Andersson, S. G. & Kurland, C. G. (1999). Origins of mitochondria and hydrogenosomes. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**, 535-54.
- Andersson, S. G., Zomorodipour, A., Andersson, J. O., Sicheritz-Ponten, T., Alsmark, U. C., Podowski, R. M., Naslund, A. K., Eriksson, A. S., Winkler, H. H. & Kurland, C. G. (1998). The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature* **396**, 133-140.
- André, C., Levy, A. & Walbot, V. (1992). Small repeated sequences and the structure of plant mitochondrial genomes. *Trends Genet.* **8**, 128-132.
- Appel, J. & Schulz, R. (1996). Sequence analysis of an operon of a NAD(P)-reducing nickel hydrogenase from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 gives additional evidence for direct coupling of the enzyme to NAD(P)H-dehydrogenase (complex I). *Biochim. Biophys. Acta* **1298**, 141-147.
- Baldet, P., Alban, C. & Douce, R. (1997). Biotin synthesis in higher plants: purification and characterization of bioB gene product equivalent from *Arabidopsis thaliana* overexpressed in *Escherichia coli* and its subcellular localization in pea leaf cells. *FEBS Lett.* **419**, 206-210.
- Beagley, C. T., Okimoto, R. & Wolstenholme, D. R. (1998). The mitochondrial genome of the sea anemone *Metridium senile* (Cnidaria): introns, a paucity of tRNA genes, and a near-standard genetic code. *Genetics* **148**, 1091-108.
- Beck, C. F. & Warren, R. A. (1988). Divergent promoters, a common form of gene organization. *Microbiol. Rev.* **52**, 318-326.

- Bereiter-Hahn, J. & Voth, M. (1994). Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria. *Microsc Res Tech* **27**, 198-219.
- Bhattacharya, D., Helmchen, T., Bibeau, C. & Melkonian, M. (1995). Comparisons of nuclear-encoded small-subunit ribosomal RNAs reveal the evolutionary position of the Glaucocystophyta. *MBE* **12**, 415-420.
- Billard, C. (1985). Le complexe nucléoplastidial chez les chromophytes : structure, fonction et intérêt dans une perspective phylogénétique. *Cryptogamie : Algologie* **VI**, 191-211.
- Billot, C., Rousvoal, S., Estoup, A., Epplen, J. T., Saumitou-Laprade, P., Valero, M. & Kloareg, B. (1998). Isolation and characterization of microsatellite markers in the nuclear genome of the brown alga *Laminaria digitata* (Phaeophyceae). *Mol. Ecol.* **7**, 1778-1780.
- Birnboim, H. C. & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513-1523.
- Boore, J. L. (1999). Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Res.* **27**, 1767-1780.
- Boyen, C., Oudot, M.-P. & Loiseaux-de Goër, S. (2001). Origin and evolution of plastids and mitochondria: the phylogenetic diversity of algae. *Cah. Biol. Mar.* **sous presse**.
- Brennicke, A., Marchfelder, A. & Binder, S. (1999). RNA editing. *FEMS Microbiol. Rev.* **23**, 297-316.
- Brown, J. R. & Doolittle, W. F. (1997). Archaea and the prokaryote-to-eukaryote transition. *Microbiol. Mol. Bio.l. Rev.* **61**, 456-502.
- Buck, M., Miller, S., Drummond, M. & Dixon, R. (1986). Upstream activator sequences are present in the promoters of nitrogen fixation genes. *Nature* **320**, 374-378.
- Bui, E. T., Bradley, P. J. & Johnson, P. J. (1996). A common evolutionary origin for mitochondria and hydrogenosomes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **93**, 9651-9656.
- Burger, G., Saint-Louis, D., Gray, M. W. & Lang, B. F. (1999). Complete sequence of the mitochondrial DNA of the red alga *Porphyra purpurea*. Cyanobacterial introns and shared ancestry of red and green algae. *Plant Cell* **11**, 1675-1694.
- Campbell, A. M., Mrazek, J. & Karlin, S. (1999). Genome signature comparisons among prokaryote, plasmid, and mitochondrial DNA. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **96**, 9184-9189.

- Cermakian, N., Ikeda, T. M., Cedergren, R. & Gray, M. W. (1996). Sequences homologous to yeast mitochondrial and bacteriophage T3 and T7 RNA polymerases are widespread throughout the eukaryotic lineage. *Nucleic Acids Res.* **24**, 648-654.
- Chen, B., Kubelik, A. R., Mohr, S. & Breitenberger, C. A. (1996). Cloning and characterization of the *Neurospora crassa* *cyt-5* gene. A nuclear-coded mitochondrial RNA polymerase with a polyglutamine repeat. *J. Biol. Chem.* **271**, 6537-6544.
- Chen, J.-L. & Pace, N. R. (1997). Identification of the universally conserved core of ribonuclease P RNA. *RNA* **3**, 557-560.
- Choi, J. Y., Lee, T. W., Jeon, K. W. & Ahn, T. I. (1997). Evidence for symbiont-induced alteration of a host's gene expression: irreversible loss of SAM synthetase from *Amoeba proteus*. *J. Eukaryot. Microbiol.* **44**, 412-419.
- Corellou, F., Bisgrove, S. R., Kropf, D. L., Meijer, L., Kloareg, B. & Bouget, F. Y. (2000a). A S/M DNA replication checkpoint prevents nuclear and cytoplasmic events of cell division including centrosomal axis alignment and inhibits activation of cyclin-dependent kinase-like proteins in fucoid zygotes. *Development* **127**, 1651-1660.
- Corellou, F., Potin, P., Brownlee, C., Kloareg, B. & Bouget, F. Y. (2000b). Inhibition of the establishment of zygotic polarity by protein tyrosine kinase inhibitors leads to an alteration of embryo pattern in *Fucus*. *Dev Biol* **219**, 165-182.
- Costa, M., Christian, E. L. & Michel, F. (1998). Differential chemical probing of a group II self-splicing intron identifies bases involved in tertiary interactions and supports an alternative secondary structure model of domain V. *RNA* **4**, 1055-1068.
- Costa, M., Fontaine, J.-M., Loiseaux-de Goër, S. & Michel, F. (1997). A group II self-splicing intron from the brown alga *Pylaiella littoralis* is active at unusually low magnesium concentrations and forms populations of molecules with a uniform conformation. *J. Mol. Biol.* **274**, 353-364.
- Costa, M. & Michel, F. (1999). Tight binding of the 5' exon to domain I of a group II self-splicing intron requires completion of the intron active site. *EMBO J.* **18**, 1025-1037.
- Cottrell, D. A., Blakely, E. L., Borthwick, G. M., Johnson, M. A., Taylor, G. A., Brierley, E. J., Ince, P. G. & Turnbull, D. M. (2000). Role of mitochondrial DNA mutations in disease and aging. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **908**, 199-207.

- Crick, F. H. (1966). Codon--anticodon pairing: the wobble hypothesis. *J. Mol. Biol.* **19**, 548-55.
- Cummings, D. J., McNally, K. L., Domenico, J. M. & Matsuura, E. T. (1990). The complete DNA sequence of the mitochondrial genome of *Podospora anserina*. *Curr. Genet.* **17**, 375-402.
- Dalmon, J. & Loiseaux, S. (1981). The deoxyribonucleic acids of two brown algae: *Pylaiella littoralis* (L.) Kjellm. and *Sphacellaria* sp. *Plant Sci Let* **21**, 241-251.
- Dalmon, J., Loiseaux-de Goër, S. & Bazetoux, S. (1983). Heterogeneity of plastid DNA of two species of brown algae. *Plant Sci Let* **29**, 243-253.
- de Reviers, B. & Rousseau, F. (1999). Towards a new classification of the brown algae. In *Progress in Phycological Research* (Round, F. E. & Chapman, D. J., eds.), Vol. 13, pp. 107-201. Biopress Ltd.
- Delaroque, N., Fontaine, J.-M., Kloareg, B. & Loiseaux-de Goër, S. (1996). Putative σ -70-like promoters in a brown algal mitochondrial genome. *CR Acad. Sci. III-Vie* **319**, 763-767.
- Delwiche, C. F. & Palmer, J. D. (1997). The origin of plastids and their spread via secondary symbiosis. In *Origins of Algae and their Plastids* (Bhattacharya, D., ed.), pp. 53-86. Springer, Wien and New York.
- Douglas, S. E., Murphy, C. A., Spencer, D. F. & Gray, M. W. (1991). Cryptomonad algae are evolutionary chimaeras of two phylogenetically distinct unicellular eukaryotes. *Nature* **350**, 148-151.
- Fontaine, J.-M., Goux, D., Kloareg, B. & Loiseaux-de Goër, S. (1997). The reverse-transcriptase-like proteins encoded by group II introns in the mitochondrial genome of the brown alga *Pylaiella littoralis* belong to two different lineages which apparently coevolved with the group II ribosyme lineages. *J. Mol. Evol.* **44**, 33-42.
- Fontaine, J.-M., Rousvoal, S., Delaroque, N. & Loiseaux-de Goër, S. (1995a). Characterization of the *cox3*, *nad7* and *atp6* genes from the mitochondrial genome of the brown alga *Pylaiella littoralis*. *Plant Physiol Biochem* **33**, 605-609.
- Fontaine, J.-M., Rousvoal, S., Leblanc, C., Kloareg, B. & Loiseaux-de Goër, S. (1995b). The mitochondrial LSU rDNA of the brown alga *Pylaiella littoralis* reveals alpha-proteobacterial features and is split by four group IIB introns with an atypical phylogeny. *J. Mol. Biol.* **251**, 378-389.

- Francis, M. A. & Dudock, B. S. (1982). Nucleotide sequence of a spinach chloroplast isoleucine tRNA. *J. Biol. Chem.* **257**, 11195-11198.
- Germot, A., Philippe, H. & Le Guyader, H. (1996). Presence of a mitochondrial-type 70-kDa heat shock protein in *Trichomonas vaginalis* suggests a very early mitochondrial endosymbiosis in eukaryotes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **93**, 14614-14617.
- Germot, A., Philippe, H. & Le Guyader, H. (1997). Evidence for loss of mitochondria in Microsporidia from a mitochondrial-type HSP70 in *Nosema locustae*. *Mol. Biochem. Parasit.* **87**, 159-168.
- Gibbs, S. P. (1962). Nuclear envelope-chloroplast relationships in algae. *Cell Biol* **14**, 433-444.
- Gibbs, S. P. (1978). The chloroplasts of *Euglena* may have evolved from symbiotic green algae. *Can. J. Bot.* **56**, 2883-2889.
- Gibbs, S. P. (1981). The chloroplasts of some algal groups may have evolved from endosymbiotic eukaryotic algae. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **361**, 193-208.
- Gibbs, S. P. (1990). The evolution of algal chloroplasts. In *Experimental phycology I* (Weissner, W., Robinson, D. G. & Stan, R. C., eds.), Vol. I, pp. 145-157. Springer Verlag, Berlin.
- Gicquel-Sanzey, B. & Cossart, P. (1982). Homologies between different procaryotic DNA-binding regulatory proteins and between their sites of action. *EMBO J.* **1**, 591-595.
- Gray, M. W. (1992). The endosymbiont hypothesis revisited. *Int. Rev. Cytol.* **141**, 233-243.
- Gray, M. W., Burger, G. & Lang, B. F. (1999). Mitochondrial evolution. *Science* **283**, 1476-1481.
- Gray, M. W., Lang, B. F., Cedergren, R., Golding, G. B., Lemieux, C., Sankoff, D., Turmel, M., Brossard, N., Delage, E., Littlejohn, T. G., Plante, I., Rioux, P., Saint-Louis, D., Zhu, Y. & Burger, G. (1998). Genome structure and gene content in protist mitochondrial DNAs. *Nucleic Acids Res.* **26**, 865-878.
- Guillou, L., Chrétiennot-Dinet, M.-J., Medlin, L. K., Claustre, H., Loiseaux-de Goër, S. & Vaulot, D. (1999). *Bolidomonas*: a new genus with two species belonging to a new algal class, the *Bolidophyceae* (Heterokonta). *J. Phycol.* **35**, 368-381.
- Gupta, R. S. (1999). Origin of eukaryotic cells: was metabolic symbiosis based on hydrogen the driving force? *Trends Biochem. Sci.* **24**, 423.

- Harley, C. B. & Reynolds, R. P. (1987). Analysis of *E. coli* promoter sequences. *Nucleic Acids Res.* **15**, 2343-2361.
- Hashimoto, T., Sanchez, L. B., Shirakura, T., Muller, M. & Hasegawa, M. (1998). Secondary absence of mitochondria in *Giardia lamblia* and *Trichomonas vaginalis* revealed by valyl-tRNA synthetase phylogeny. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **95**, 6860-6865.
- Hausler, T., Stierhof, Y. D., Blattner, J. & Clayton, C. (1997). Conservation of mitochondrial targeting sequence function in mitochondrial and hydrogenosomal proteins from the early-branching eukaryotes *Crithidia*, *Trypanosoma* and *Trichomonas*. *Eur. J. Cell Biol.* **73**, 240-251.
- Hawley, D. K. & McClure, W. R. (1983). Compilation and analysis of *Escherichia coli* promoter DNA sequences. *Nucleic Acids Res.* **11**, 2237-55.
- Hedtke, B., Borner, T. & Weihe, A. (1997). Mitochondrial and chloroplast phage-type RNA polymerases in *Arabidopsis*. *Science* **277**, 809-811.
- Helmchen, T. A., Bhattacharya, D. & Melkonian, M. (1995). Analyses of ribosomal RNA sequences from glaucocystophyte cyanelles provide new insights into the evolutionary relationships of plastids. *J. Mol. Evol.* **41**, 203-210.
- Hess, W. R. & Borner, T. (1999). Organellar RNA polymerases of higher plants. *Int. Rev. Cytol.* **190**, 1-59.
- Horner, D. S., Hirt, R. P., Kilvington, S., Lloyd, D. & Embley, T. M. (1996). Molecular data suggest an early acquisition of the mitochondrion endosymbiont. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **263**, 1053-1059.
- Ikeda, T. M. & Gray, M. W. (1999). Identification and characterization of T3/T7 bacteriophage-like RNA polymerase sequences in wheat. *Plant Mol. Biol.* **40**, 567-578.
- Jeon, K. W. (1987). Change of cellular "pathogens" into required cell components. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **503**, 359-371.
- Jeon, K. W. & Ahn, T. I. (1978). Temperature sensitivity: a cell character determined by obligate endosymbionts in *Amoebas*. *Science* **302**, 635-637.
- Kashdan, M. A. & Dudock, B. S. (1982). The gene for a spinach chloroplast isoleucine tRNA has a methionine anticodon. *J. Biol. Chem.* **257**, 11191-11194.
- Keiler, K. C., Shapiro, L. & Williams, K. P. (2000). tmRNAs that encode proteolysis-inducing tags are found in all known bacterial genomes: A two-piece tmRNA functions in *Caulobacter*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **97**, 7778-7783.

- Kloareg, B. & Quatrano, R. S. (1988). Structure of the cell walls of marine algae and ecophysiological functions of the matrix polysaccharides. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.* **26**, 259-315.
- Knight, M. (1923). Studies in the Ectocarpaceae. I The Life-History and Cytology of *Pylaiella littoralis*, Kjellm. *Trans. Roy. Soc. Edin.* **LIII**, 343-360.
- Knoll, A. H. (1992). The early evolution of eukaryotes: a geological perspective. *Science* **256**, 622-627.
- Kotani, H., Ishizaki, Y., Hiraoka, N. & Obayashi, A. (1987). Nucleotide sequence and expression of the cloned gene of bacteriophage SP6 RNA polymerase. *Nucleic Acids Res.* **15**, 2653-64.
- Kropf, D. L., Kloareg, B. & Quatrano, R. S. (1988). Cell wall is required for fixation of the embryonic axis in *Fucus* zygotes. *Science* **239**, 187-190.
- Kubo, T., Nishizawa, S., Sugawara, A., Itchoda, N., Estiati, A. & Mikami, T. (2000). The complete nucleotide sequence of the mitochondrial genome of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) reveals a novel gene for tRNA(Cys)(GCA). *Nucleic Acids Res.* **28**, 2571-2576.
- Kuzmin, E. V., Levchenko, I. V. & Zaitseva, G. N. (1988). S2 plasmid from cms-S-maize mitochondria potentially encodes a specific RNA polymerase. *Nucleic Acids Res.* **16**, 4177.
- Lagerkvist, U. (1978). "Two out of three": an alternative method for codon reading. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **75**, 1759-1762.
- Lake, J. A. & Rivera, M. C. (1994). Was the nucleus the first endosymbiont? *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **91**, 2880-2881.
- Lang, B. F., Burger, G., O'Kelly, C. J., Cedergren, R., Golding, G. B., Lemieux, C., Sankoff, D., Turmel, M. & Gray, M. W. (1997). An ancestral mitochondrial DNA resembling a eubacterial genome in miniature. *Nature* **387**, 493-497.
- Lang, B. F., Gray, M. W. & Burger, G. (1999). Mitochondrial genome evolution and the origin of eukaryotes. *Annu. Rev. Genet.* **33**, 351-397.
- Lawrence, J. G. & Ochman, H. (1998). Molecular archaeology of the *Escherichia coli* genome. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **95**, 9413-9417.
- Leblanc, C., Boyen, C., Richard, O., Bonnard, G., Grienemberger, J. M. & Kloareg, B. (1995). Complete sequence of the mitochondrial DNA of the rhodophyte *Chondrus crispus* (Gigartinales). Gene content and genome organization. *J. Mol. Biol.* **250**, 484-495.

- Lecrenier, N. & Foury, F. (2000). New features of mitochondrial DNA replication system in yeast and man. *Gene* **246**, 37-48.
- Lee, J. J. (1995). Living sands. The symbiosis of protists and algae can provide good models for the study of host/symbiont interactions. *BioScience* **45**, 252-261.
- Leipe, D. D., Tong, S. M., Goggin, C. L., Slemenda, S. B., Pieniazek, N. J. & sogin, M. L. (1996). 16S-like rDNA sequences from *Developyella elegans*, *Labyrinthuloides haliotidis*, and *Proteromonas lacertae* confirm that the stramenopiles are a primarily heterotrophic group. *European Journal of Protistology* **32**, 449-458.
- Levings, C. S. & Sederoff, R. R. (1983). Nucleotide sequence of the S-2 mitochondrial DNA from the S cytoplasm of maize. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **80**, 4055-4059.
- Lewin, B. (1994). Control of prokaryotic gene expression. Control at initiation: RNA polymerase-promoter interactions. In *Genes V* Fifth edit. (Lewin, B., ed.), pp. 377-412. Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo.
- Liaud, M. F., Lichtle, C., Apt, K., Martin, W. & Cerff, R. (2000). Compartment-specific isoforms of TPI and GAPDH are imported into diatom mitochondria as a fusion protein: evidence in favor of a mitochondrial origin of the eukaryotic glycolytic pathway. *Mol. Biol. Evol.* **17**, 213-223.
- Loiseaux, S. & Rozier, C. (1978). Culture axénique de *Pylaiella littoralis* (L.) Kjellm. (Phéophycées). *Rev. Algol.* **13**, 333-340.
- Loiseaux-de Goër, S. (1994). Plastid lineages. In *Progress in Phycological Research* (Round, F. E. & Chapman, D. J., eds.), Vol. 11, pp. 137-177. Biopress Ltd.
- Loiseaux-de Goër, S., Markowicz, Y., Dalmon, J. & Audren, H. (1988). Physical maps of the two circular plastid DNA molecules of the brown alga *Pylaiella littoralis* (L.) Kjellm. *Curr. Genet.* **14**, 155-162.
- Loiseaux-de Goër, S., Markowicz, Y. & Somerville, C. C. (1991). Ribosomal RNA genes and pseudogenes of the bi-molecular plastid genome of the brown alga *Pylaiella littoralis*. In *The translational apparatus of photosynthetic organelles* (Mache, R. & al., e., eds.), Vol. H 55, pp. 19-29. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Loomis, W. D. (1974). Overcoming problems of phenolics and quinones in the isolation of plant enzymes and organelles. *Methods Enzymol.* **31**, 528-544.
- Lopez-Garcia, P. & Moreira, D. (1999). On hydrogen transfer and a chimeric origin of eukaryotes. *Trends Biochem. Sci.* **24**, 424.

- Madison, J. T., Everett, G. A. & Kung, H. (1966). Nucleotide sequence of a yeast tyrosine transfer RNA. *Science* **153**, 531-534.
- Mahler. (1981). Origins and evolution of eukaryotic intracellular organelles. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **361**, XX-70.
- Makino, K., Ishii, K., Yasunaga, T., Hattori, M., Yokoyama, K., Yutsudo, C. H., Kubota, Y., Yamaichi, Y., Iida, T., Yamamoto, K., Honda, T., Han, C. G., Ohtsubo, E., Kasamatsu, M., Hayashi, T., Kuhara, S. & Shinagawa, H. (1998). Complete nucleotide sequences of 93-kb and 3.3-kb plasmids of an enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 derived from Sakai outbreak. *DNA Res.* **5**, 1-9.
- Maréchal-Drouard, L., Small, I., Weil, J.-H. & Dietrich, A. (1995). Transfer RNA import into plant mitochondria. *Methods Enzymol.* **260**, 310-327.
- Margulis, L., Chase, D. & To, L. P. (1979). Possible evolutionary significance of spirochaetes. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **204**, 189-198.
- Margulis, L., Dolan, M. F. & Guerrero, R. (2000). The chimeric eukaryote: Origin of the nucleus from the karyomastigont in amitochondriate protists. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 6954-6959.
- Markey, D. & Wilce, R. T. (1975). The ultrastructure of reproduction in the brown alga *Pylaiella littoralis*. I. Mitosis and cytokinesis in the plurilocular gametangia. *Protoplasma* **85**, 219-241.
- Markey, D. R. & Wilce, R. T. (1976a). The ultrastructure of reproduction in the brown alga *Pylaiella littoralis*. II. Zoosporogenesis in the unilocular sporangia. *Protoplasma* **88**, 147-173.
- Markey, D. R. & Wilce, R. T. (1976b). The ultrastructure of reproduction in the brown alga *Pylaiella littoralis*. III. Later stages of gametogenesis in the plurilocular gametangia. *Protoplasma* **88**, 175-186.
- Markowicz, Y., Loiseaux-de Goër, S. & Mache, R. (1988). Presence of a 16S rRNA pseudogene in the bi-molecular plastid genome of the primitive brown alga *Pylaiella littoralis*. Evolutionary implications. *Curr. Genet.* **14**, 599-608.
- Martin, W. & Schnarrenberger, C. (1997). The evolution of the Calvin cycle from prokaryotic to eukaryotic chromosomes: a case study of functional redundancy in ancient pathways through endosymbiosis. *Curr. Genet.* **32**, 1-18.
- Martin, W. F. & Kowallik, K. V. (1999). Annotated English translation of Mereschkowsky's 1905 paper "Über Natur und Ursprung der Chromatophoren im Pflanzenreiche". *Eur. J. Phycol.* **34**, 287-295.

- Masters, B. S., Stohl, L. L. & Clayton, D. A. (1987). Yeast mitochondrial RNA polymerase is homologous to those encoded by bacteriophages T3 and T7. *Cell* **51**, 89-99.
- Moore, P. B. (1995). The structure and function of 5S ribosomal RNA. In *Ribosomal RNA: Structure, Evolution, Processing and Function in Protein Biosynthesis* (Zimmermann, R. A. & Dahlberg, A. E., eds.), pp. 199-236. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Moreira, D., Le Guyader, H. & Philippe, H. (2000). The origin of red algae and the evolution of chloroplasts. *Nature* **405**, 69-72.
- Nass, M. M. K. & Nass, S. (1963a). Intramitochondrial fibers with DNA characteristics I. Fixation and electron staining reactions. *J Cell Biol.* **19**, 593-611.
- Nass, S. & Nass, M. M. K. (1963b). Intramitochondrial fibers with DNA characteristics II. Enzymatic and other hydrolytic treatments. *J Cell Biol.* **19**, 613-354.
- Oeser, B. (1988). S2 plasmid from *Zea mays* encodes a specific RNA polymerase: an alternative alignment. *Nucleic Acids Res.* **16**, 8729.
- Oudot, M.-P., Fontaine, J.-M., Rousvoal, S., Kloareg, B. & Loiseaux-de Goër, S. The first completely sequenced brown algal mitochondrial genome, from the Ectocarpale *Pylaiella littoralis* (L.) Kjellm. *soumis*.
- Oudot, M.-P., Kloareg, B. & Loiseaux-de Goër, S. (1999). The mitochondrial *Pylaiella littoralis nad11* gene contains only the N- terminal FeS-binding domain. *Gene* **235**, 131-137.
- Pak, J. W. & Jeon, K. W. (1997). A symbiont-produced protein and bacterial symbiosis in *Amoeba proteus*. *J. Eukaryot. Microbiol.* **44**, 614-619.
- Pemberton, J. M., Horne, I. M. & McEwan, A. G. (1998). Regulation of photosynthetic gene expression in purple bacteria. *Microbiology* **144**, 267-278.
- Portier, P. (1918). Symbiotes, mitochondries, bactéries. In *Les symbiotes* (Masson & Cie, eds.), pp. 44-98. Librairies de l'Académie de médecine, Boulevard Saint-Germain, Paris, VIe.
- Rébeillé, F., Macherel, D., Mouillon, J. M., Garin, J. & Douce, R. (1997). Folate biosynthesis in higher plants: purification and molecular cloning of a bifunctional 6-hydroxymethyl-7,8-dihydropterin pyrophosphokinase/7,8-dihydropteroate synthase localized in mitochondria. *EMBO J.* **16**, 947-957.
- Reisser, W. (1992). *Algae and symbioses. Plants, animals, fungi, viruses, interactions explored*. W. Reisser edit, Biopress Limited, Bristol.

- Roger, A. J., Svärd, S. G., Tovar, J., Clark, C. G., Smith, M. W., Gillin, F. D. & Sogin, M. L. (1998). A mitochondrial-like chaperonin 60 gene in *Giardia lamblia*: Evidence that diplomonads once harbored an endosymbiont related to the progenitor of mitochondria. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **95**, 229-234.
- Romine, M. F., Stillwell, L. C., Wong, K. K., Thurston, S. J., Sisk, E. C., Sensen, C., Gaasterland, T., Fredrickson, J. K. & Saffer, J. D. (1999). Complete sequence of a 184-kilobase catabolic plasmid from *Sphingomonas aromaticivorans* F199. *J. Bacteriol.* **181**, 1585-1602.
- Rousvoal, S., Oudot, M.-P., Fontaine, J.-M., Kloareg, B. & Loiseaux-de Goër, S. (1998). Witnessing the evolution of transcription in mitochondria: the mitochondrial genome of the primitive brown alga *Pylaiella littoralis* (L.) Kjellm. encodes a T7-like RNA polymerase. *J. Mol. Biol.* **277**, 1047-1057.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning. A laboratory manual*. Second edit (Nolan, C. & Ferguson, M., Eds.). 3 vols, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
- Sapp, J. (1990). Symbiosis in evolution: an origin story. *Endocytobiosis and Cell Res.* **7**, 5-36.
- Saraste, M. (1999). Oxidative phosphorylation at the fin de siècle. *Science* **283**, 1488-1493.
- Schnepf, E. (1992). From prey via endosymbiont to plastid: comparative studies in Dinoflagellates. In *Origins of Plastids* (Lewin, R. A., ed.), pp. 53-76. Chapman & Hall, New York and London.
- Schuster, W. & Brennicke, A. (1994). The plant mitochondrial genome: physical structure, information content, RNA editing, and gene migration to the nucleus. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **45**, 61-78.
- Smith, H. B. (1999). Interorganellar communication and the onus of being eukaryotic. *Plant Cell* **11**, 1605-1608.
- Sousa, R., Chung, Y. J., Rose, J. P. & Wang, B. C. (1993). Crystal structure of bacteriophage T7 RNA polymerase at 3.3 Å resolution. *Nature* **364**, 593-599.
- Sprinzel, M., Horn, C., Brown, M., Ioudovitch, A. & Steinberg, S. (1998). Compilation of tRNA sequences and sequences of tRNA genes. *Nucleic Acids Res.* **26**, 148-153.
- Stiller, J. W. & Hall, B. D. (1997). The origin of red algae: implications for plastid evolution. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **94**, 4520-5.

- Taanman, J. W. (1999). The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochim. Biophys. Acta* **1410**, 103-123.
- Tarassov, I., Entelis, N. & Martin, R. P. (1995). Mitochondrial import of a cytoplasmic lysine-tRNA in yeast is mediated by cooperation of cytoplasmic and mitochondrial lysyl-tRNA synthetases. *EMBO J.* **14**, 3461-3471.
- Taylor, F. J. (1979). Symbiontism revisited: a discussion of the evolutionary impact of intracellular symbioses. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **204**, 267-286.
- Tengs, T., Dahlberg, O. J., Shalchian-Tabrizi, K., Klaveness, D., Rudi, K., Delwiche, C. F. & Jakobsen, K. S. (2000). Phylogenetic analyses indicate that the 19'Hexanoyloxy-fucoxanthin- containing dinoflagellates have tertiary plastids of haptophyte origin. *Mol. Biol. Evol.* **17**, 718-729.
- Tiranti, V., Savoia, A., Forti, F., D'Apolito, M. F., Centra, M., Rocchi, M. & Zeviani, M. (1997). Identification of the gene encoding the human mitochondrial RNA polymerase (h-mtRPOL) by cyberscreening of the Expressed Sequence Tags database. *Human Molecular Genetics* **6**, 615-25.
- Tovar, J., Fischer, A. & Clark, C. G. (1999). The mitosome, a novel organelle related to mitochondria in the amitochondrial parasite *Entamoeba histolytica*. *Mol. Microbiol.* **32**, 1013-1021.
- Unseld, M., Marienfeld, J. R., Brandt, P. & Brennicke, A. (1997). The mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana* contains 57 genes in 366,924 nucleotides. *Nature* **25**, 57-61.
- Van den Hoek, C., Mann, D. G. & Jahns, H. M. (1995a). *Algae. An introduction to phycology* (Van den Hoek, C., Mann, D. G. & Jahns, H. M., Eds.), Press Syndicate of the University of Cambridge, Cambridge.
- Van den Hoek, C., Mann, D. G. & Jahns, H. M. (1995b). Heterokontophyta: Class Phaeophyceae (brown algae). In *Algae. An introduction to phycology* (Hoek, C. v. d., Mann, D. G. & Jahns, H. M., eds.), pp. 165-210. Press Syndicate of the University of Cambridge, Cambridge.
- Vedel, F., Lalanne, E., Sabar, M., Chétrit, P. & De Paepe, R. (1999). The mitochondrial respiratory chain and ATP synthase complexes: composition, structure and mutational studies. *Plant Physiol Biochem* **37**, 629-643.
- Vellai, T., Takacs, K. & Vida, G. (1998). A new aspect to the origin and evolution of eukaryotes. *J. Mol. Evol.* **46**, 499-507.

- Vellai, T. & Vida, G. (1999). The origin of eukaryotes: the difference between prokaryotic and eukaryotic cells. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **266**, 1571-1577.
- Wada, H., Shintani, D. & Ohlrogge, J. (1997). Why do mitochondria synthesize fatty acids? Evidence for involvement in lipoic acid production. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **94**, 1591-1596.
- Weber, F., Dietrich, A., Weil, J. H. & Marechal-Drouard, L. (1990). A potato mitochondrial isoleucine tRNA is coded for by a mitochondrial gene possessing a methionine anticodon. *Nucleic Acids Res.* **18**, 5027-30.
- Weihe, A., Hedtke, B. & Borner, T. (1997). Cloning and characterization of a cDNA encoding a bacteriophage-type RNA polymerase from the higher plant *Chenopodium album*. *Nucleic Acids Res.* **25**, 2319-2325.
- Weiss, H., Friedrich, T., Hofhaus, G. & Preis, D. (1991). The respiratory-chain NADH dehydrogenase (complex I) of mitochondria. *Eur. J. Biochem.* **197**, 563-576.
- West, J. A. (1967). *Pilayella littoralis* F. *rupicola* from Washington: the life history in culture. *J. Mol. Evol.* **3**, 150-153.
- Whatley, J. M., John, P. & Whatley, F. R. (1979). From extracellular to intracellular: the establishment of mitochondria and chloroplasts. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **204**, 165-187.
- Wilkens, S. & Capaldi, R. A. (1998). ATP synthase's second stalk comes into focus. *Nature* **393**, 29.
- Woolery, M. L. & Lewin R. A. (1973). Influence of iodine on growth and development of the brown alga *Ectocarpus siliculosus* in axenic cultures. *Phycologia* **12**, 131-138.

Annexes

Annexe 1 Milieux de culture des algues

Vitamines

	Quantités pour 800 ml	Concentration stock	Concentration d'usage
Biotine	2 mg	2,5 mg.l ⁻¹	1 µg.l ⁻¹
Vit. B12	4 mg	5 mg.l ⁻¹	2 µg.l ⁻¹
Thiamine	200 mg	250 mg.l ⁻¹	100 µg.l ⁻¹

Dans 800 ml d'eau millipore autoclavée.

Filtrer sur 0,22 µm.

Conserver à 4 °C, à l'obscurité.

Par litre d'eau de mer : 0,4 ml.

PII mélange de métaux

	Dans 500 ml d'eau millipore	PM
Na ₂ EDTA	1,4 g	
Bore (H ₃ BO ₃)	2,88 g	62
Sulfate de manganèse (MnSO ₄ .4H ₂ O)	328 mg	
Sulfate de zinc (ZnSO ₄ .7H ₂ O)	44 mg	287,64
Sulfate de cobalt (CoSO ₄ .7H ₂ O)	9,6 mg	281,30

Filtrer sur 0,22 µm.

Autoclaver 20 min.

Ce mélange intervient dans la composition du prochain : il n'est pas ajouté directement à l'eau de mer.

Complément minéral

Dans 500 ml d'eau millipore :	Pour 950 ml	Par litre d'eau de mer enrichie
Na ₂ EDTA	200 mg	3,15 mg
Fe SO ₄ 2(NH ₄).6H ₂ O	200 mg	3,15 mg
NaNO ₃	5 g	78,94 mg
Glycérophosphate de sodium	1 g	15,78 mg
PII mélange de métaux	65 ml	

Compléter à 950 ml avec de l'eau millipore.

Filtrer sur 0,22 µm.

Autoclaver 20 min à 120 °C.

Aliquoter.

Par litre d'eau de mer : 15 ml.

Annexe 2 Milieux de culture de bactéries

Pour les tests de stérilité (Zobell modifié Woolery & Lewin)

	Pour 1 l
Eau millipore	200 ml
Eau de mer	800 ml
Peptone	3 g
Extrait de levure	1 g
Casitone	1 g
Agar	14 g

Autoclaver ; couler en boîtes de Pétri.

Se conserve quelques mois à 4°C, mais bien fermer avec du parafilm, pour empêcher le dessèchement.

Pour les extractions d'ADN plasmidique : Luria Bertani

Bactotryptone	10	g.l ⁻¹
Extrait de levure	5	g.l ⁻¹
NaCl	5	g.l ⁻¹
(Agar)	1,5	g.l ⁻¹

Autoclaver ; couler en boîtes de Pétri.

Se conserve quelques mois à 4°C, mais bien fermer avec du parafilm, pour empêcher le dessèchement.

Annexe 3 Caractéristiques des souches bactériennes utilisées

<u>Souches bactériennes</u>	<u>Caractéristiques</u>	<u>Résistance</u>
HB101	(F ⁻ D(<i>mcrC-mrr</i>) <i>leu supE44 ara14 galk2 lacY1 proA2 rpsL20</i> (Str ^r) <i>xyl-5 mtl-1 recA13</i>)	Str
XL1Blue	(F ⁻ ::Tn10 <i>proA⁺B⁺ lacI^q D (lacZ) M15/recA1 endA1 gyrA96</i> (Nal ^r) <i>thi hsdR17 (r_k⁻m_k⁺) supE44 relA1 lac</i>)	Nal

<u>Plasmide</u>	<u>Caractéristiques</u>	<u>Clones</u>
pBR 325	Tet ^r	Eco
pAT 153	Tet ^r	Bam, Sal, bs
pBluescript SK+	Amp ^r	Sal4', sous-clones

Annexe 4 Extraction d'organites de *Pylaiella littoralis*

Matériels Velcro (côté rugueux)

Brosse à dent

Grande boîte de Pétri en verre

Mortier & pilon

Entonnoir

Blutex 50 μm Blutex 10 μm

Pots à centrifuger pour rotor J-14 (2 x 6) (+ le rotor et la centri qui vont avec !)

Pinceau doux

Corex et rotor swinging

Solutions utilisées

Milieu A : (en préparer 2 l)

TRIS HCl 0,25 M, pH 7,8 30,5 g.l⁻¹Saccharose 0,8 M 270 g.l⁻¹Cystéine 0,5 g.l⁻¹BSA 0,2 % 2 g.l⁻¹PVP 1% * 10 g.l⁻¹

Laisser dissoudre pendant la nuit, en chambre froide (à cause de la BSA).
Filtrer sur 0,45 μm (trop visqueux pour 0,22 μm).

* : absent de la première version du protocole.

** : 3 mM dans la première version du protocole.

Milieu B : (en préparer 1 l)

TRIS HCl 0,25 M, pH 7,8 30,5 g.l⁻¹Saccharose 0,8 M 270 g.l⁻¹EDTA 40 mM * 14,8 g.l⁻¹

Filtrer sur 0,45 μm (trop visqueux pour 0,22 μm).

*: 20 mM dans la première version du protocole

Protocole

(En chambre froide)

- Broyer les algues sur du Velcro avec une brosse à dent, dans du milieu A.
- Filtrer le broyat sur Blutex de 50 et 10 μm . Réserver le filtrat.
- Reprendre le culot resté dans les Blutex et l'écraser au mortier.
- Bien diluer dans du milieu A avant de filtrer à nouveau le broyat sur Blutex de 50 et 10 μm .

(Sur glace)

- Centrifuger les filtrats obtenus dans des pots à centrifuger pour JA-14, **1 400 g** (3000 rpm dans le rotor à angle fixe JA-14, centrifugeuse Beckman J2-21), **2 min max..**
- Si les algues sont sales (recouvertes d'épiphytes, de bactéries et de diatomées), recentrifuger dans d'autres pots dans les mêmes conditions, **1 min ½** Cette centrifugation permet d'éliminer la plupart des noyaux, des fragments cellulaires et des bactéries.
- Centrifuger le surnageant **15 min à 4 000 g** (5 000 rpm). Les organites sont dans le culot. On peut recentrifuger le surnageant pour récupérer les petits plastes (et les mitochondries ?).
- Reprendre le culot dans quelques gouttes de milieu B, très doucement, au pinceau. Ne pas laisser de grumeaux. Transvaser en tubes corex siliconés. Diluer avec du milieu B.
- Centrifuger **15 min à 5 500 g** (6 000 rpm dans rotor swinging JS 13-1 ; Beckman J2-21).
- Reprendre le culot d'organite avec milieu B.
- Aliquotage par 1 ml, dans micro tubes, centrifugation : 1 min à 13 000 g, retrait du surnageant, congélation dans l'azote liquide.

Annexe 5 Mini-extraction D'ADN plasmidique,

Kit " FlexiPrep ", Pharmacia Biotech

Solutions utilisées

Solution I (fournie dans le kit) :

TRIS HCl, pH 7,5 : 100 mM
EDTA : 10 mM
RNase : 400 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$

Solution II (fournie dans le kit) :

NaOH : 1 M
SDS : 5,3 % (P/V)

Solution III (fournie dans le kit) :

Potassium : 3 M
Acétate : 5 M

SephaglasTMFP (Billes de Sephaglas FP dans une solution tamponnée de guanidine-HCl, fournie dans le kit) :

Guanidine : 7 M
TRIS HCl pH 7,5 : 50 mM
CDTA : 10 mM

Tampon de lavage (fourni dans le kit) :

TRIS HCl pH 7,5 : 20 mM
CDTA : 2 mM
NaCl : 200 mM

TE:

TRIS HCl pH 8 : 10 mM
EDTA : 1 mM

Éthanol 100 % : 1,2 ml

Éthanol 70 % : 300 μl

Protocole (Extraction)

- Transférer 2 ml de culture bactérienne dans un microtube, centrifuger 30 s, 10 000 rpm.
- Eliminer le surnageant (pompe à vide).
- Ajouter 200 μl de Solution I au culot, vortexer.
- Ajouter 200 μl de Solution II, mélanger par inversion.
- 5 min à température ambiante.
- Ajouter 200 μl de Solution III, mélanger par inversion.
- 5 min dans la glace, centrifuger 10 min à vitesse maximale, à température ambiante.
- Prélever le surnageant délicatement, le transférer dans un microtube stérile.
- Ajouter 2 volumes d'éthanol 100 % (1200 μl), mélanger par inversion.
- 10 min à -20 °C, centrifuger 10 min à vitesse maximale.
- Eliminer le surnageant délicatement, à la pipette, sécher le culot d'ADN, 5 min.
- (Purification)
- Ajouter 150 μl de Sephaglas, vortexer doucement 1 min, centrifuger 20 s, à 10 000 rpm.
- Eliminer le surnageant délicatement, à la pipette.
- Ajouter 200 μl de tampon de lavage, vortexer doucement 1 min, centrifuger 20 s, à 10 000 rpm.
- Eliminer le surnageant délicatement, à la pipette.
- Ajouter 300 μl d'éthanol 70 %, vortexer délicatement, centrifuger 20 s, à 10 000 rpm.
- Eliminer le surnageant délicatement, à la pipette, laisser sécher les billes, 15 min.
- Remettre les billes en suspension dans 50 μl de TE
- 5 min à température ambiante, centrifuger 10 min à 12 000 rpm.
- Transférer le surnageant dans un microtube stérile, et renouveler les opérations à partir de la remise en suspension des billes par 20 ml de TE.

Annexe 6 Extraction des protéines à partir des culots d'organites de *P. littoralis*

Tampon d'extraction

Dans de l'eau (qsp 200 ml final)

	Concentration finale	pour 200 ml	Concentration stock (PM)
Nonidet P 40	0,5 %	1 ml	
PVPP	0,5 %	10 ml	10 %
MOPS pH 7,2	25 mM	1,047 g	(PM = 209,26)
EGTA	15 mM	6 ml	0,5 M
MgCl ₂	15 mM	1,5 ml	2 M
DTT	2 mM	61,72 mg	(PM = 154,2)
Leupeptine	10 µg.ml ⁻¹	200 µl	10 mg.ml ⁻¹
Aprotinine	10 µg.ml ⁻¹	200 µl	10 mg.ml ⁻¹
SBTI (Soy Bean Trypsine Inhibitor)	10 µg.ml ⁻¹	20 µl	100 mg.ml ⁻¹
Benzamidine	100 µM	200 µl	100 mM

Protocole

- Broyer le culot au mortier, avec azote liquide et sable.
- Mettre la poudre dans 500 µl de tampon d'extraction, dans un microtube, sur glace.
- (En chambre froide) 6 fois : vortexer 30 s, laisser 30 s dans la glace.
- Répartir dans 2 microtubes (2 x 250 µl).
- Soniquer : 2 pulses à 20, dans la glace.
- Centrifuger 10 min à 10 000 g.
- Récupérer le surnageant dans un tube propre.

Annexe 7 Gel SDS-PAGE et transfert sur membrane

Solutions utilisées

Gels (gradient 5-15 %) :

	Gel résolutif		Gel de concentration
	5 %	15 %	4 %
Acrylamide/Bis-acrylamide 30 % T 2,67 %	4,2 ml	12,5 ml	1,3 ml
dH ₂ O	14,2 ml	0,875 ml	7,35 ml
Glycérol 50 %		5 ml	
TRIS 1,5 M, pH 8,8	6,25 ml	6,25 ml	
TRIS 0,5 M, pH 6,8			1,25 ml
SDS 10 %	250 µl	250 µl	100 µl
APS 10 %	100 µl	80 µl	50 µl
Temed	10 µl	8 µl	10 µl

Tampon de migration :

	Pour 3 l de 5 X
SDS	15 g
TRIS	45 g
Glycine	216 g

Tampon de transfert :

	Pour 2 L de 1 X	Concentration
TRIS	11,6 g	47,89 mM
Glycine	5,8 g	38,63 mM
SDS	0,74 g	1,28 mM
Isopropanol	300 ml	15 %

Tampon TBS-T (= TBS- Tween = TRIS Buffer Saline - Tween), ajuster le pH à 7.6 :

	Pour 5 L de 1 X	Concentration
TRIS	12 g	
NaCl	40 g	
Tween 20	5 ml	0,1 %

Protocole

- Système Biorad, plaques de 20 cm x 20 cm, 1,5 mm d'épaisseur. Gel en gradient 5-15 % coulé avec un vase à gradient sur agitateur, 20 ml de 5 % et 20 ml de 15 %. 1 ml d'eau sur la surface. Couler le gel de concentration.
- Préparation des échantillons à déposer et des marqueurs de poids moléculaire : ajuster à 1 X avec du Laemmli 4X (Sambrook & Maniatis, 1989).
- Dénaturation des échantillons 5' à 100 °C, bain marie. Centrifugation rapide à 10 000 g.
- Dépôts des échantillons. Migration dans tampon SDS TRIS Glycine, à intensité constante (17 mA), voltage limité à 100 V.
- Transfert sur membrane Hybond ECL (Amersham), en semi-sec.
- Équilibrer la membrane et du papier Whatman 10' dans le tampon de transfert.
- Imprégner rapidement le gel dans le tampon de transfert.
- Montage : 4 Whatman dessous, 4 dessus, le gel et la membrane, cathode dessus.
- 1 mA par cm² pendant 1 h.
- Coloration de la membrane au rouge ponceau, et des gels au bleu de Coomassie pour vérifier le transfert et repérer les marqueurs de poids moléculaire.
- Membranes décolorées dans du TBS-T, puis séchées à l'air, sur du Whatman, conservées entre deux papiers Whatman, par la suite.

Annexe 8 Conditions d'immunodétection testées

Généralités

Lavages : si rien n'est précisé, les lavages sont réalisés à température ambiante, dans 1 ml / cm² de TBS-T, sur tablette agitante horizontale.

1^{er} anticorps : 1 h à température ambiante, dans 1 ml / cm² de TBS-T, sur tablette agitante horizontale.

2^e anticorps : 1 h à température ambiante, dans 0,6 ml / cm² de TBS-T, sur tablette agitante horizontale.

Protocole

- Blocage : lait écrémé en poudre à 5 % dans du TBS-T (voir Annexe précédente), sur la nuit à 4 °C, sur tablette agitante horizontale, dans 1 ml / cm².
- Lavages 1 : 2 brefs, 1 de 15', 2 de 5'.
- Anticorps primaire dilués au 1 / 500^e.
- Lavages 2 : 2 brefs, 1 de 15', 2 de 5'.
- Anticorps secondaire : anti-lapin conjugué à de la HRP (HorseRadish Peroxidase) (BioRad), dilué au 1 / 1 000^e dans du TBS-T.
- Lavages 3 : 1 de 15', 4 de 5'.
- Révélation selon les indications du fabricant.

	Anticorps primaire	Anticorps secondaire
1 ^{er} essais ECI	1 / 500	1 / 4 000
2 ^{ème} essais ECI	1 / 2 000	1 / 7 000
3 ^{ème} essais Phosphatase alcaline	1 / 10 000 1 / 7 000 1 / 5 000 1 / 2 000	1 / 3 000
4 ^{ème} essais Phosphatase alcaline	1 / 10 000 1 / 7 000 1 / 5 000 1 / 2 000	1 / 4 000
5 ^{ème} essais Phosphatase alcaline	1 / 10 000	1 / 4 000

Dans tous les cas, et même avec les sérums préimmuns, de nombreuses protéines étaient révélées (pas de bruit de fond dû particulièrement à la membrane, à un mauvais blocage par exemple).

Annexe 9

Article 1

Witnessing the evolution of transcription in mitochondria: the mitochondrial genome of the primitive brown alga *Pylaiella littoralis* (L.) Kjellm. encodes a T7-like RNA polymerase. Rousvoal, S., Oudot, M.-P., Fontaine, J.-M., Kloareg, B. & Loiseaux-de Goër, S. (1998). J Mol Biol, 277, 1047-1057

Annexe 10

Article 2

The mitochondrial *Pylaiella littoralis nad11* gene contains only the N-terminal FeS-binding domain. Oudot, M.-P., Kloareg, B. & Loiseaux-de Goër, S. (1999). *Gene*, 235, 131-137

Annexe 11

Article 3

The first completely sequenced brown algal mitochondrial genome, from the Ectocarpale *Pylaiella littoralis* (L.) Kjellm. Oudot, M.-P., Fontaine, J.-M., Rousvoal, S., Kloareg, B. & Loiseaux-de Goër, S. (soumis)