



# LES GÈNES DE TYPE FIBRILLINE D'ARABIDOPSIS THALIANA, FONCTION ET RÉGULATION

Yec'Han Laizet

## ► To cite this version:

Yec'Han Laizet. LES GÈNES DE TYPE FIBRILLINE D'ARABIDOPSIS THALIANA, FONCTION ET RÉGULATION. Biologie végétale. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2005. Français. NNT : . tel-00010436

**HAL Id: tel-00010436**

**<https://theses.hal.science/tel-00010436>**

Submitted on 6 Oct 2005

**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.

**Université Joseph Fourier – Grenoble 1**

**Chimie et Sciences du Vivant**

**Thèse**

pour obtenir le grade de :

**Docteur de l'Université Joseph Fourier**

**Discipline : Biologie**

Présentée et soutenue publiquement par :

**Yec'han LAIZET**

Le 14 juin 2005

**LES GÈNES DE TYPE FIBRILLINE *D'ARABIDOPSIS*  
*THALIANA*, FONCTION ET RÉGULATION**

Sous la direction de Marcel Kuntz

**COMPOSITION DU JURY :**

|               |                                              |                    |
|---------------|----------------------------------------------|--------------------|
| Michel Herzog | Professeur, Grenoble                         | Président          |
| Pierre Carol  | Professeur, Université Pierre et Marie Curie | Rapporteur         |
| Pascal Rey    | Ingénieur CEA, Cadarache                     | Rapporteur         |
| Marcel Kuntz  | Directeur de recherche CNRS, Grenoble        | Directeur de thèse |

Laboratoire Plastés et Différenciation Cellulaire – UMR UJF/CNRS 5575

Thèse financée par l'Union Européenne. Contrat n°QLK3-CT-2000-00809

## REMERCIEMENTS

Je remercie Silva Mache et Michel Herzog qui m'ont successivement accueilli dans leur laboratoire. Je remercie également Marcel Kuntz de m'avoir accepté au sein de son équipe et de m'avoir donné la possibilité de prendre mon temps pour écrire cette thèse. Toute ma reconnaissance va également à Dominique Pontier à qui je dois beaucoup et qui a su se montrer patiente.

Je voudrais aussi exprimer ma reconnaissance à toutes les personnes du laboratoire qui ont su m'aider tout au long de cette thèse. Particulièrement au sein de notre équipe, Eliane Chapentier pour son aide, Anne-Marie Labouré pour ses compétences et sa capacité à supporter les travers masculins..., Jean-Pierre Alcaraz pour sa bonne humeur et les discussions informatiques du CERMO. Mention particulière pour Joël Gaffé qui, outre ses tentatives d'épuisement à mon égard à la course à pied, s'est montré particulièrement humain et compréhensif surtout pendant les moments difficiles.

J'exprime toute ma gratitude à ceux qui m'ont aidé à rédiger cette thèse : Joël Gaffé, Marcel Kuntz, Anne-Marie Labouré, Dominique Pontier, que ce soit pour les relectures, les corrections ou les suggestions.

Merci à tous les étudiants pour leur sympathie, tout d'abord au groupe composé d'Andy, de Benoît et d'Eve-Marie qui m'ont m'accueilli chaleureusement à mon arrivée à Grenoble, merci à Jean-Jacques Favory d'avoir partagé toutes ces conversations informatiques et pour l'extension d'amorce. Merci aux « laser gamers » de m'avoir laissé gagner, entre autres Florian, Frédéric, Patricia, Philippe et Gaëlle, et à tous les motards avec qui j'ai eu le privilège de faire une sortie sur mon modeste trail... Je regretterai tous les pâtisseries du CERMO qui ont su me pardonner une certaine gourmandise...

Je voudrais remercier mes parents qui m'ont toujours soutenu dans mes efforts au cours de mes études, qui m'ont laissé le choix et donné les moyens de réaliser tout ce cursus. Je n'oublie pas ces petits riens qui font tout, que mon frère et ma sœur m'ont apportés. Que dire de Jessica, sinon que je m'incline devant tout ce qu'elle a dû supporter de ma part.

Merci à toutes les personnes qui m'ont permis de ne pas me sentir seul à Grenoble, que ce soit en roller, ou au rock'n roll.

Mention très spéciale pour l'Ange aux chaussettes...

## SOMMAIRE

|                                                                                     |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>ABRÉVIATIONS .....</b>                                                           | <b>8</b>  |
| <b>SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>                                                | <b>12</b> |
| <b>1 Le plaste .....</b>                                                            | <b>12</b> |
| 1.1 Origine.....                                                                    | 12        |
| 1.2 Caractéristiques .....                                                          | 13        |
| 1.3 Types de plastes et fonctions.....                                              | 14        |
| <b>2 Particules lipidiques et plastoglobules.....</b>                               | <b>16</b> |
| 2.1 Caractéristiques des plastoglobules.....                                        | 17        |
| 2.2 Fonctions des plastoglobules.....                                               | 17        |
| 2.2.1 Rôle de réservoirs lipidiques .....                                           | 17        |
| 2.2.2 Rôle dans la dégradation et le renouvellement des thylacoïdes .....           | 17        |
| 2.2.3 Rôle dans la séquestration des caroténoïdes .....                             | 18        |
| <b>3 Les caroténoïdes .....</b>                                                     | <b>18</b> |
| 3.1 Biosynthèse .....                                                               | 18        |
| 3.2 Fonctions des caroténoïdes.....                                                 | 19        |
| 3.3 Régulations dans le chloroplaste .....                                          | 20        |
| 3.4 Régulations dans le chromoplaste .....                                          | 21        |
| 3.5 Les caroténoïdes et l'homme.....                                                | 23        |
| <b>4 Les protéines de type fibrilline.....</b>                                      | <b>23</b> |
| 4.1 La fibrilline de poivron .....                                                  | 24        |
| 4.1.1 Caractérisation.....                                                          | 24        |
| 4.1.2 Régulation de la fibrilline de poivron .....                                  | 24        |
| 4.2 Les protéines de type fibrilline.....                                           | 26        |
| 4.2.1 La protéine CHRC de <i>Cucumis sativus</i> et sa régulation .....             | 26        |
| 4.2.2 La protéine CDSP34 de <i>Solanum tuberosum</i> et sa régulation .....         | 27        |
| 4.2.3 Les protéines de type fibrilline des <i>Brassica</i> et leur régulation ..... | 28        |
| 4.2.4 La protéine PG-1 de <i>Pisum sativum</i> .....                                | 28        |
| 4.2.5 La protéine CitPAP de <i>Citrus unshiu</i> et sa régulation .....             | 28        |

|                                       |                                                                                        |           |
|---------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.3                                   | Fonction des protéines de type fibrilline .....                                        | 29        |
| 4.4                                   | Les autres protéines .....                                                             | 30        |
| <b>5</b>                              | <b>En résumé .....</b>                                                                 | <b>30</b> |
| <b>6</b>                              | <b>Objectifs du travail de thèse.....</b>                                              | <b>32</b> |
| <b>RÉSULTATS ET DISCUSSIONS .....</b> |                                                                                        | <b>33</b> |
| <b>CHAPITRE 1 .....</b>               |                                                                                        | <b>34</b> |
| <b>1</b>                              | <b>La famille de gènes <i>fibrilline</i> d'<i>Arabidopsis thaliana</i>.....</b>        | <b>35</b> |
| 1.1                                   | Caractéristiques des protéines de type fibrilline d' <i>Arabidopsis thaliana</i> ..... | 35        |
| 1.2                                   | Les gènes <i>fibrillines</i> chez d'autres organismes .....                            | 39        |
| 1.2.1                                 | Chez les plantes .....                                                                 | 39        |
| 1.2.2                                 | Chez les algues .....                                                                  | 40        |
| 1.2.3                                 | Chez les cyanobactéries .....                                                          | 40        |
| 1.3                                   | La sous-famille FIB1,2 des plantes .....                                               | 43        |
| 1.4                                   | La sous-famille FIB3a,3b d' <i>Arabidopsis thaliana</i> .....                          | 45        |
| 1.5                                   | Conclusions sur les gènes <i>fib</i> .....                                             | 47        |
| <b>CHAPITRE 2 .....</b>               |                                                                                        | <b>49</b> |
| <b>2</b>                              | <b>Expression des gènes <i>fibrilline</i> et de leur protéine. ....</b>                | <b>50</b> |
| 2.1                                   | Profil d'expression des gènes <i>fibrilline</i> chez <i>Arabidopsis thaliana</i> ..... | 50        |
| 2.2                                   | Analyse de l'accumulation des protéines fibrillines .....                              | 54        |
| 2.2.1                                 | Protéines recombinantes et test des anticorps .....                                    | 54        |
| 2.2.2                                 | Accumulation des protéines FIB1b et FIB3a,b chez <i>Arabidopsis thaliana</i> .         | 55        |
| 2.3                                   | Conclusions sur l'expression des gènes <i>FIB</i> et de leurs protéines .....          | 56        |
| <b>CHAPITRE 3 .....</b>               |                                                                                        | <b>60</b> |
| <b>3</b>                              | <b>Tentative d'approche de la fonction de la fibrilline.....</b>                       | <b>61</b> |
| 3.1                                   | Production de plantes ARNi pour les gènes <i>FIB1a</i> , <i>1b</i> , <i>2</i> .....    | 61        |
| 3.1.1                                 | La technique d'« ARN interférence» .....                                               | 61        |
| 3.1.2                                 | Production et analyse de plantes ARNi <i>FIB1-2</i> .....                              | 62        |
| 3.1.3                                 | Production et analyse de plantes ARNi <i>FIB3a-b</i> .....                             | 66        |
| 3.2                                   | Conclusions sur la fonction des fibrillines .....                                      | 66        |

|                                                                                                  |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>CHAPITRE 4.....</b>                                                                           | <b>68</b> |
| <b>4 Recherche de régulateurs du promoteur de la fibrilline par une approche génétique .....</b> | <b>69</b> |
| 4.1 Principe de l'approche.....                                                                  | 69        |
| 4.2 Étude des lignées transgéniques .....                                                        | 70        |
| 4.3 Criblage .....                                                                               | 75        |
| 4.4 Étude des mutants.....                                                                       | 77        |
| 4.5 Conclusions sur l'étude des mutants .....                                                    | 79        |
| <b>CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES.....</b>                                                  | <b>84</b> |
| <b>MATÉRIEL ET MÉTHODES.....</b>                                                                 | <b>88</b> |
| <b>1 Systèmes bactériens.....</b>                                                                | <b>88</b> |
| 1.1 Souches et vecteurs utilisés .....                                                           | 88        |
| 1.2 Clonages .....                                                                               | 88        |
| 1.3 Cultures bactériennes .....                                                                  | 89        |
| 1.4 Cellules d' <i>E. coli</i> compétentes .....                                                 | 89        |
| 1.5 Transformation d' <i>E. coli</i> .....                                                       | 90        |
| 1.6 Extraction d'ADN plasmidique d' <i>E. coli</i> .....                                         | 90        |
| 1.7 Cellules d' <i>Agrobacterium</i> compétentes .....                                           | 90        |
| 1.8 Transformation d' <i>Agrobacterium</i> .....                                                 | 91        |
| 1.9 Vérification de la construction introduite dans <i>Agrobacterium</i> .....                   | 91        |
| 1.10 Extraction d'ADN d' <i>Agrobacterium</i> .....                                              | 91        |
| 1.11 Expression des protéines recombinantes .....                                                | 92        |
| <b>2 Matériel végétal et conditions de culture .....</b>                                         | <b>92</b> |
| 2.1 Les plantes.....                                                                             | 92        |
| 2.2 Cultures en terre .....                                                                      | 92        |
| 2.3 Cultures <i>in vitro</i> .....                                                               | 93        |
| 2.4 Traitements et stress appliqués aux plantes.....                                             | 93        |
| <b>3 Transgénèse .....</b>                                                                       | <b>94</b> |
| 3.1 Transformation d' <i>Arabidopsis thaliana</i> .....                                          | 94        |
| 3.2 Promoteurs et gènes rapporteurs .....                                                        | 95        |

|          |                                                                                          |            |
|----------|------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 3.3      | Constructions utilisées pour la transformation des plants d' <i>Arabidopsis thaliana</i> | 95         |
| 3.4      | Fusions avec la YFP                                                                      | 95         |
| 3.5      | Construction ARN interférence (ARNi)                                                     | 95         |
| <b>4</b> | <b>Mutagenèse</b>                                                                        | <b>96</b>  |
| <b>5</b> | <b>Analyse des acides nucléiques</b>                                                     | <b>97</b>  |
| 5.1      | Extraction d'ADN génomique                                                               | 97         |
| 5.2      | Southern blot                                                                            | 97         |
| 5.3      | Extraction des ARN totaux d' <i>Arabidopsis thaliana</i>                                 | 98         |
| 5.4      | Northern blot                                                                            | 99         |
| 5.4.1    | Gel et transfert                                                                         | 99         |
| 5.4.2    | Marquage radioactif de la sonde par amorçage aléatoire                                   | 99         |
| 5.4.3    | Purification de la sonde                                                                 | 99         |
| 5.4.4    | Hybridation et révélation                                                                | 99         |
| 5.5      | Transcription inverse                                                                    | 100        |
| 5.6      | PCR (réaction en chaîne de la polymérase)                                                | 100        |
| 5.7      | Détermination de l'extrémité 5' d'un transcrit par extension d'amorce                    | 101        |
| 5.7.1    | Marquage de l'oligonucléotide amorce                                                     | 101        |
| 5.7.2    | Séquençage manuel                                                                        | 101        |
| 5.7.3    | Extension d'amorce                                                                       | 102        |
| 5.7.4    | Gel d'électrophorèse de séquences manuel et d'extension d'amorces                        | 102        |
| <b>6</b> | <b>Analyse des protéines</b>                                                             | <b>103</b> |
| 6.1      | Extraction des protéines                                                                 | 103        |
| 6.1.1    | Extraction à partir de feuilles d' <i>Arabidopsis thaliana</i>                           | 103        |
| 6.1.2    | Extraction à partir de chloroplaste d' <i>Arabidopsis thaliana</i>                       | 103        |
| 6.2      | Gel et électrophorèse                                                                    | 103        |
| 6.3      | Transfert sur membrane                                                                   | 104        |
| 6.4      | Traitement de la membrane                                                                | 104        |
| 6.5      | Détection ECL                                                                            | 105        |
| 6.6      | Dosage des protéines                                                                     | 105        |

|           |                                                                                |            |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>7</b>  | <b>Anticorps.....</b>                                                          | <b>105</b> |
| 7.1       | Purification des anticorps .....                                               | 106        |
| 7.1.1     | Préparation de la colonne .....                                                | 106        |
| 7.1.2     | Préparation du sérum.....                                                      | 106        |
| 7.1.3     | Purification.....                                                              | 106        |
| <b>8</b>  | <b>Dosage quantitatif de l'activité luciférase .....</b>                       | <b>107</b> |
| <b>9</b>  | <b>Dosage quantitatif de l'activité <math>\beta</math>-glucuronidase .....</b> | <b>107</b> |
| <b>10</b> | <b>Coloration GUS histochimique .....</b>                                      | <b>108</b> |
| <b>11</b> | <b>Luminescence luciférase <i>in vivo</i> .....</b>                            | <b>108</b> |
| <b>12</b> | <b>Analyse des pigments par HPLC .....</b>                                     | <b>109</b> |
| <b>13</b> | <b>Analyse informatique.....</b>                                               | <b>109</b> |
| <b>14</b> | <b>Oligonucléotides .....</b>                                                  | <b>110</b> |
|           | <b>CARTES DES VECTEURS .....</b>                                               | <b>111</b> |
|           | <b>LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX .....</b>                                 | <b>115</b> |
|           | <b>NOMS COMMUNS DES PLANTES CITÉES.....</b>                                    | <b>119</b> |
|           | <b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>                                        | <b>120</b> |
|           | <b>PUBLICATIONS ASSOCIÉES AU TRAVAIL DE THÈSE .....</b>                        | <b>132</b> |

## **ABRÉVIATIONS**

|                |                                                                        |
|----------------|------------------------------------------------------------------------|
| <b>ADN</b>     | Acide désoxyribonucléique                                              |
| <b>ADNc</b>    | ADN complémentaire                                                     |
| <b>ADN-T</b>   | ADN de transfert                                                       |
| <b>Ag</b>      | Antigène                                                               |
| <b>APT</b>     | Adénosine phosphotransférase                                           |
| <b>ARN</b>     | Acide ribonucléique                                                    |
| <b>ARNi</b>    | ARN interférence                                                       |
| <b>ARNm</b>    | ARN messenger                                                          |
| <b>ARNsi</b>   | Petit ARN interférant (small interfering RNA)                          |
| <b>ATA</b>     | Acide aurine tricarboxylique                                           |
| <b>ATP</b>     | Adénosine triphosphate                                                 |
| <b>B</b>       | Boutons floraux                                                        |
| <b>Br. Et.</b> | Bromure d'éthidium                                                     |
| <b>BSA</b>     | Sérum albumine bovine                                                  |
| <b>CCS</b>     | Capsanthine capsorubine synthase                                       |
| <b>CGP</b>     | Protéine associée aux globules de carotène (Carotene globular protein) |
| <b>CNRS</b>    | Centre National de la Recherche Scientifique                           |
| <b>cp</b>      | Chloroplaste                                                           |
| <b>CRTR-B</b>  | Hydroxylase de cycle $\beta$                                           |
| <b>CRTR-E</b>  | Hydroxylase de cycle $\varepsilon$                                     |
| <b>CTAB</b>    | Hexadecyl trimethyl-ammonium bromide                                   |
| <b>Ctrl</b>    | Contrôle                                                               |
| <b>cv</b>      | Cultivar                                                               |
| <b>cy</b>      | Cyanobactérie                                                          |
| <b>DEPC</b>    | Diéthyle Pyrocarbonate                                                 |
| <b>DMF</b>     | Diméthylformamide                                                      |
| <b>DMAPP</b>   | Diméthylallyl diphosphate                                              |
| <b>DMSO</b>    | Diméthylsulfoxyde                                                      |
| <b>dNTP</b>    | Désoxynucléotide triphosphate                                          |
| <b>DO</b>      | Densité optique                                                        |
| <b>DTT</b>     | Dithiothreitol                                                         |
| <b>EDTA</b>    | Acide éthylène diamine tétra acétique                                  |
| <b>eGFP</b>    | enhanced Green fluorescent protein                                     |
| <b>EMS</b>     | Ethyl methyl sulfoxide                                                 |
| <b>EST</b>     | Séquence exprimée (expressed sequence tag)                             |
| <b>FIB</b>     | Gène de la fibrilline                                                  |
| <b>FIB</b>     | Protéine fibrilline                                                    |
| <b>Fj</b>      | Feuilles de couleur jaune                                              |
| <b>Fl</b>      | Fleurs                                                                 |

|                        |                                                                                 |
|------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| <b>FM</b>              | Feuilles matures                                                                |
| <b>FS</b>              | Feuilles sénescences                                                            |
| <b>Fv</b>              | Feuilles de couleur verte                                                       |
| <b>GFP</b>             | Green fluorescent protein                                                       |
| <b>GGPP</b>            | Géranylgéranyl diphosphate                                                      |
| <b>GGPPS</b>           | Géranyl géranyl diphosphate synthase                                            |
| <b>GUS</b>             | $\beta$ -Glucuronidase                                                          |
| <b>HIS-Tag</b>         | Étiquette de 6 histidines                                                       |
| <b>HPLC</b>            | High pressure liquid chromatography                                             |
| <b>ICCD</b>            | Dispositif de coulage de charge intensifié (intensified charged coupled device) |
| <b>IPP</b>             | Isopentenyl diphosphate                                                         |
| <b>IPTG</b>            | Isopropyl $\beta$ -D thiogalactoside                                            |
| <b>kana</b>            | Kanamycine                                                                      |
| <b>kan<sup>R</sup></b> | Plante résistante à la kanamycine                                               |
| <b>LCY-B</b>           | Lycopène $\beta$ -cyclase                                                       |
| <b>LCY-E</b>           | Lycopène $\epsilon$ -cyclase                                                    |
| <b>LUC</b>             | Luciférase                                                                      |
| <b>M1</b>              | Mutant de première génération                                                   |
| <b>M2</b>              | Mutant de seconde génération                                                    |
| <b>MES</b>             | Acide 2-(N-Morpholino) éthane sulfonique                                        |
| <b>Miniprep</b>        | Mini-préparation d'ADN                                                          |
| <b>MOPS</b>            | Acide 3-(N-morpholino) propane sulfonique                                       |
| <b>MS</b>              | Murashige Skoog (milieu)                                                        |
| <b>MF</b>              | Matière fraîche                                                                 |
| <b>MU</b>              | 4-Méthylumbelliférone                                                           |
| <b>MUG</b>             | 4-Méthylumbelliferyl $\beta$ -D glucuronide                                     |
| <b>MW</b>              | Masse moléculaire (molecular weight)                                            |
| <b>NASC</b>            | Nottingham Arabidopsis Stock Centre                                             |
| <b>NOS</b>             | Nopaline synthase                                                               |
| <b><i>NPTII</i></b>    | Gène de la résistance à la kanamycine                                           |
| <b>NXS</b>             | Néoxanthine synthase                                                            |
| <b>PAP</b>             | Protéine associée au plaste (Plastid associated protein)                        |
| <b>PCR</b>             | Réaction de polymérisation en chaîne                                            |
| <b>PDS</b>             | Phytoène désaturase                                                             |
| <b><i>pFIB</i></b>     | Promoteur du gène fibrilline de poivron                                         |
| <b>PG1</b>             | Protéine homologue à la fibrilline, Plastoglobulin 1                            |
| <b>pI</b>              | Point isoélectrique                                                             |
| <b>PLP</b>             | Protéine associée aux lipides de plaste (Plastid lipid associated protein)      |
| <b>PMSF</b>            | Fluorure de phényle méthyle sulfate                                             |
| <b>PSY</b>             | Phytoène synthase                                                               |
| <b>PTOX</b>            | Terminale oxydase plastidiale                                                   |

## Abréviations

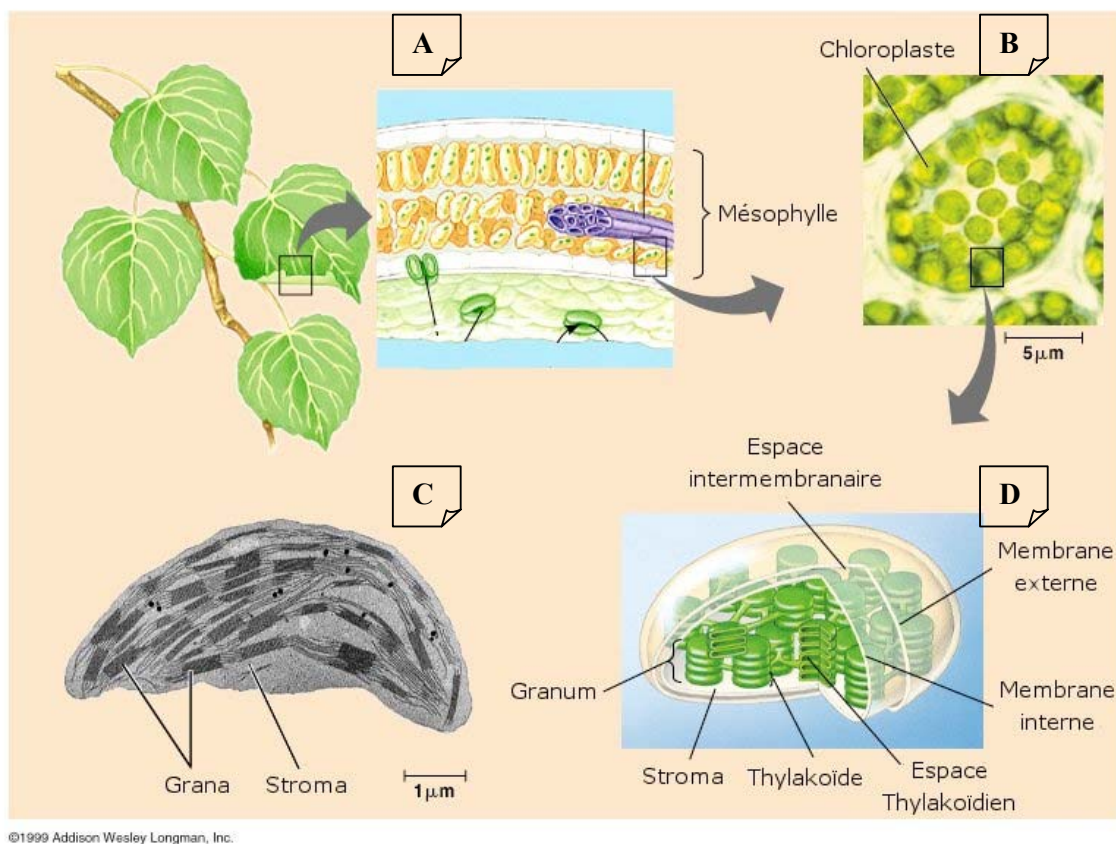
|                        |                                                             |
|------------------------|-------------------------------------------------------------|
| <b>PVP</b>             | Polyvinylpyrrolidone                                        |
| <b>Q<sub>ox</sub></b>  | Quinone oxydée                                              |
| <b>Q<sub>red</sub></b> | Quinone réduite                                             |
| <b>R</b>               | Racines                                                     |
| <b>RNase</b>           | Ribonucléase                                                |
| <b>ROS</b>             | Reactive oxygen species ou Espèces activées de l'oxygène    |
| <b>rpm</b>             | Tours par minutes (rounds per minute)                       |
| <b>RT</b>              | Transcription inverse                                       |
| <b>RT-PCR</b>          | Transcription inverse suivie d'une PCR                      |
| <b>Rubisco</b>         | Ribulose-1-5-biphosphate carboxylase oxygénase              |
| <b>SDS</b>             | Sodium dodécyl sulfate                                      |
| <b>SDS-PAGE</b>        | Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS |
| <b>SI</b>              | Siliques                                                    |
| <b>T</b>               | Tiges                                                       |
| <b>T1</b>              | Transformant de première génération                         |
| <b>T2</b>              | Transformant de seconde génération                          |
| <b>TAG</b>             | Triacyl glycérol                                            |
| <b>TBE</b>             | Tampon tris borate EDTA                                     |
| <b>TE</b>              | Tampon tris EDTA                                            |
| <b>TEMED</b>           | N,N,N,N-tétraméthyl-éthylènediamine                         |
| <b>thyl</b>            | Thylacoïde                                                  |
| <b>Tm</b>              | Température de fusion des acides nucléiques                 |
| <b>TP</b>              | Séquence d'adressage (peptide de transit)                   |
| <b>Tris</b>            | Tris (hydroxyméthyl) aminométhane                           |
| <b>Tween 20</b>        | Polyoxyéthylène-sorbitan monolaurate 20                     |
| <b>ua</b>              | Unités arbitraires                                          |
| <b>UMR</b>             | Unité Mixte de Recherche                                    |
| <b>UTR</b>             | Région non traduite (untranslated region)                   |
| <b>UV</b>              | Ultraviolet                                                 |
| <b>v/v</b>             | volume/volume                                               |
| <b>VDE</b>             | Violaxanthine dé-époxydase                                  |
| <b>w/v</b>             | masse/volume                                                |
| <b>wt</b>              | Sauvage (wild type)                                         |
| <b>X-gluc</b>          | Acide 5-bromo 4-chloro 3-indoxyl β-D glucuronique           |
| <b>YFP</b>             | Yellow fluorescent protein                                  |
| <b>ZDS</b>             | ζ-carotène désaturase                                       |
| <b>ZEP</b>             | Zéaxanthine époxydase                                       |

Introduction :

**SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE**

## SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Si je peux écrire ces lignes aujourd'hui, c'est certainement en grande partie grâce aux végétaux qui depuis des millénaires approvisionnent l'atmosphère de la terre en oxygène par le mécanisme de la photosynthèse. Les végétaux sont également à la base de la chaîne alimentaire car ils ont la capacité de capter et d'utiliser l'énergie lumineuse grâce à un organe spécifique du règne végétal : le chloroplaste (Figure 1). Celui-ci est une forme particulière du plaste, où a lieu la photosynthèse qui confère aux plantes leur autotrophie.



**Figure 1 : Le chloroplaste.**

A : Coupe transversale de feuille. B : Observation au microscope de chloroplastes d'une cellule. C : Micrographie d'un chloroplaste. D : Schéma d'un chloroplaste.

Image issue de [www.biology.iupui.edu/biocourses/N100/images/ch9chloroplast.jpg](http://www.biology.iupui.edu/biocourses/N100/images/ch9chloroplast.jpg)

## 1 LE PLASTE

### 1.1 ORIGINE

Une des grandes étapes de l'évolution a été l'acquisition par la cellule eucaryote des organites que sont les mitochondries et les plastes. Des études phylogénétiques, structurales et

biochimiques ont indiqué que les plastes des algues et des plantes proviendraient de l'endosymbiose dans une cellule hôte eucaryote mitochondriale, d'une cyanobactérie ancestrale comportant des capacités photosynthétiques (pour revue : McFadden 2001, Dyaal *et al.* 2004). Au fur et à mesure de l'évolution de cette symbiose, la bactérie ancestrale est devenue une composante essentielle pour la cellule hôte, en se muant en un compartiment important pour la bioénergétique et la biosynthèse : le plaste. Des plastes secondaires ont également évolué à partir de l'endosymbiose d'un eucaryote photosynthétique, par un eucaryote non photosynthétique. Les plastes résultants de cette endosymbiose auraient subi une réduction de leur génome et dans certains cas, une perte des fonctions photosynthétiques comme par exemple pour les apicoplastes (Palmer 2003).

## 1.2 CARACTÉRISTIQUES

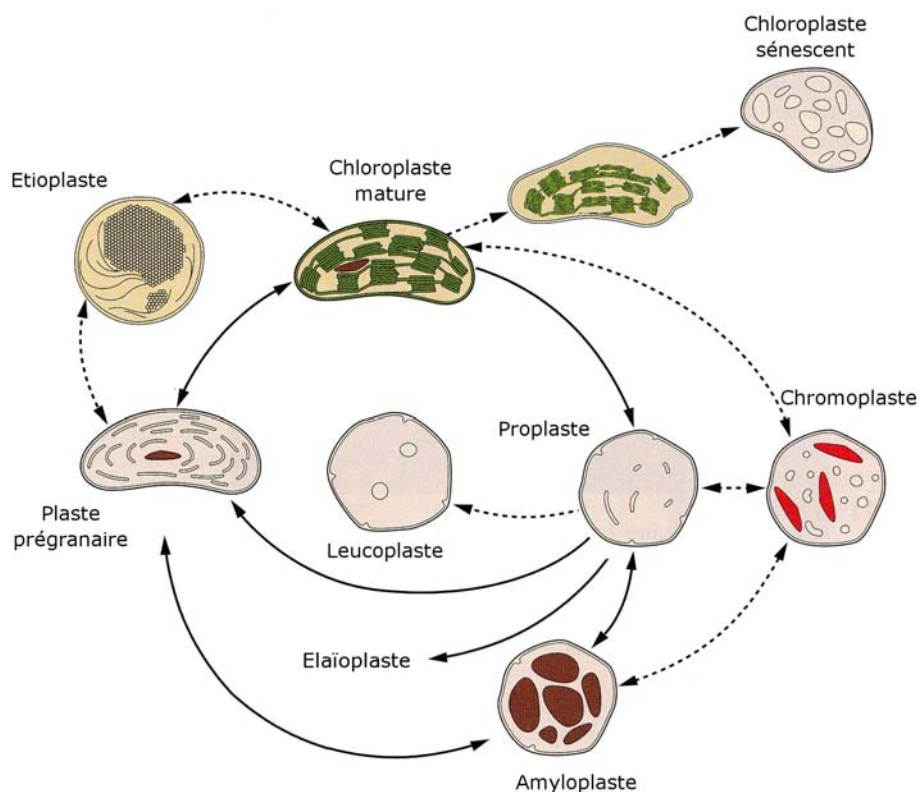
Le plaste est un organite délimité par une enveloppe formée par une double membrane lipidique qui enserre le stroma (exemple du chloroplaste Figure 1). Il peut posséder un système membranaire interne suivant son état de différenciation (Introduction § 1.3). Les plastes sont capables de se diviser au sein de la cellule, ce qui assure leur présence dans les cellules filles. Cette division plastidiale s'établit par un mécanisme similaire à celui observé chez les procaryotes (pour revue : Osteryoung et McAndrew 2001). Organite semi-autonome, le plaste possède un génome propre, ainsi que la machinerie nécessaire à sa transcription et à sa traduction (Stern *et al.* 1997, Mache et Lerbs-Mache 2001). Le génome plastidial est constitué d'une molécule d'ADN circulaire de 120 à 160kpb selon les espèces, codant une centaine de protéines (Sugiura 1992) et présent en copies dont le nombre au sein du plaste varie de 10 à 100 selon l'état de différenciation de ce dernier. Ces chromosomes plastidiaux sont organisés en structures appelées nucléoïdes. La taille du génome plastidial a évolué au cours de la symbiose, en effet, des pertes et des transferts de gènes se sont opérés entre la bactérie photosynthétique et le noyau de la cellule hôte (Martin et Herrmann 1998). En effet, la plupart des protéines plastidiales sont codées par des gènes nucléaires. Ce transfert de gènes du plaste vers le noyau a conduit à la mise en place d'un système d'import des protéines plastidiales codées par le noyau, vers le plaste où celles-ci doivent assurer leur fonction (Schatz et Dobberstein 1996, Heins *et al.* 1998). Ces protéines possèdent alors en position N-terminale une petite séquence peptidique appelée « peptide de transit ou séquence d'adressage » qui permet leur ciblage et leur import vers l'un des compartiments du plaste (Bruce 2000). Un deuxième système d'import spécifique de certaines protéines, qui présente des similarités avec les complexes de translocation du système classique, a pu être mis en

évidence dans le chloroplaste (Reinbothe *et al.* 1997, Reinbothe *et al.* 2004a, Reinbothe *et al.* 2004b).

### 1.3 TYPES DE PLASTES ET FONCTIONS

Le plaste le plus connu est certainement le chloroplaste. Il fournit grâce à la photosynthèse des molécules carbonées assimilables, mais la fonction du plaste ne s'arrête pas là. Plusieurs voies métaboliques de la plante sont assurées par le plaste, comme la synthèse des acides gras, la synthèse de l'amidon, le métabolisme des acides aminés ou la production d'hormones (pour revue : Neuhaus et Emes 2000).

Les plastes assurent également d'autres fonctions en relation avec leur état de différenciation. Tous ces plastes dérivent du proplaste (0,2 à 1µm), que l'on retrouve dans les cellules méristématiques à raison d'une vingtaine par cellule. Le proplaste ne contient pas réellement de membranes internes mais dispose quelquefois d'invaginations de la membrane interne de l'enveloppe (Thomson et Whatley 1980). Le proplaste peut se différencier en tous les autres types de plaste et une fois différencié, il existe des possibilités d'interconversion entre les différents plastes (Figure 2).



**Figure 2 : Interconvertibilité des plastes.**

Images tirées de *Biochemistry & Molecular Biology of Plant 2000*, Buchanan, Grusissem, Jones.

Lors du développement des différents organes de la plante, les plastes se différencient spécifiquement selon le type de cellule dans lequel ils résident. Ils vont acquérir les attributs et les fonctions de l'un des types de plaste suivants, selon leur différenciation.

Le chloroplaste que l'on retrouve principalement dans les organes verts des plantes est d'une forme ovale de 5 à 10µm de long. Il comprend des membranes internes : thylacoïdes, consistant en grana et lamelles stromatiques, qui contiennent l'appareil photosynthétique (Figure 1). Celles-ci ont une composition différente des autres membranes de la cellule : elle comportent principalement (70 à 80%) des monogalactosyls diacylglycérol (MGDG) et digalactosyls diacylglycérol (DGDG), (pour revue : Vothknecht et Westhoff, 2001). Le chloroplaste peut posséder des structures de stockage : les grains d'amidon et de petits plastoglobules (Introduction § 2). Il est principalement responsable de la capture et de la conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique sous forme de molécules carbonées (sucres) utilisables par la plante. Cette dernière est réalisée grâce aux différents complexes de la chaîne de transport des électrons présents dans les membranes thylacoïdiennes : principalement les photosystèmes I et II (PSI principalement dans les lamelles, PSII principalement dans les grana) associés à leurs antennes collectrices (LHC I et II) et le cytochrome  $b_6f$  dont l'action conjointe forme un gradient de pH permettant la production de l'ATP nécessaire à la synthèse des sucres grâce à l'ATP synthase. Les chlorophylles (a,b) et des pigments caroténoïdiens (Introduction § 3) participant à la collecte de la lumière et à la photoprotection sont également associés à ces complexes membranaires : principalement du  $\beta$ -carotène avec les photosystèmes, de la lutéine, de la violaxanthine et de la néoxanthine avec le LHC, de la phéophytine avec le PSII (pour revue : Dekker et Boekema, 2005).

En cas d'absence ou de faible lumière, il n'y a pas formation de chloroplastes mais d'étioplastes qui comportent des structures internes, appelés corps prolamellaires, composées de précurseurs de la chlorophylle et de lipides membranaires. L'étioplaste se convertira rapidement en chloroplaste dès l'exposition à la lumière.

D'autres types de plastes sont décrits comme intermédiaires de différenciation : citons les plastes améboïdes dont l'expansion de l'enveloppe lors de la différenciation en chloroplaste donne une forme améboïde temporaire à l'organite.

A l'opposé du chloroplaste qui est le siège de la photosynthèse, on trouve chez les plantes des plastes dits non photosynthétiques (Thomson et Whatley 1980). Cette catégorie de plastes comprend :

L'amyloplaste que l'on trouve surtout dans les racines et les tubercules, et qui est spécialisé dans la synthèse et le stockage des grains d'amidon. Il est aussi impliqué dans la réponse gravitropique au niveau des cellules de la coiffe dans les racines (Morita et Tasaka 2004).

L'élaïoplaste présent dans les cellules du tapis des anthères accumule entre autres des particules lipidiques qui seront relarguées sur les grains de pollen lors de la lyse des cellules du tapis (pour revue : Piffanelli *et al.* 1998).

Le leucoplaste est un plaste non coloré qui contient quelques membranes internes et que l'on retrouve dans les pétales des fleurs incolores (Pyke et Page 1998).

Le chromoplaste lui, est spécialisé dans l'accumulation de molécules colorées : les caroténoïdes, qui donnent leur couleur aux pétales et aux fruits. Le chromoplaste est principalement issu de la différenciation d'un chloroplaste. Cette différenciation est caractérisée par une désorganisation de l'appareil photosynthétique et par la disparition des thylacoïdes et des grana (Camara *et al.* 1995). Elle s'accompagne aussi d'une forte accumulation de pigments : les caroténoïdes. On distingue différents types de chromoplastes suivant si les structures internes qui se forment sont membranaires, cristallines, globulaires ou fibrillaires (Camara *et al.* 1995). Ces structures sont impliquées dans le stockage des caroténoïdes synthétisés lors de la différenciation.

## **2 PARTICULES LIPIDIQUES ET PLASTOGLOBULES**

Chez les végétaux, notamment chez les plantes oléagineuses, on trouve des particules lipidiques appelées globules dans le cytoplasme de cellules des graines ou des fruits. Ces particules sont composées de triacylglycérol (TAG) et de phospholipides entourés par une couche de protéines : les oléosines. Ces dernières sont de petits polypeptides d'environ 20kDa comportant deux régions hydrophobes qui forment une ancre pouvant s'insérer dans une structure lipidique (Tzen et Huang 1992, Murphy 1993). Cette protéine est indispensable au maintien de la structure des particules lipidiques dans le milieu aqueux du cytosol. En effet un traitement à la trypsine conduit à l'agrégation et à la coalescence des particules (Tzen et Huang 1992). Un autre type de protéines appelées les caléosines, a aussi été caractérisée dans ces globules lipidiques (pour revue Frandsen *et al.* 2001). On suppose que ces dernières ont un rôle dans la formation et la fusion de particules lipidiques par le biais d'un signal dépendant du calcium.

Les plastes contiennent aussi des particules lipidiques : les plastoglobules.

## **2.1 CARACTÉRISTIQUES DES PLASTOGLOBULES**

Les plastoglobules sont des structures osmiophiles sphériques composées de différents lipides et de caroténoïdes. Ils ont été largement décrits, mais jusqu'à présent leur composition protéique reste relativement méconnue (Steinmüller et Tevini 1985, Smith *et al.* 2000). Cependant, la présence de protéines spécifiques dans les plastoglobules a été mise en évidence par Emter *et al.* 1990 et confortée par Pozueta-Romero *et al.* 1997, Hernandez-Pinzon *et al.* 1999 et Kessler *et al.* 1999. Les plastoglobules sont des composants normaux des chromoplastes et des élaïoplastes, on peut également les retrouver dans les chloroplastes de plantes soumises à des stress environnementaux ou dans les chloroplastes de tissus sénescents (Ghosh *et al.* 1994, Smith *et al.* 2000).

## **2.2 FONCTIONS DES PLASTOGLOBULES**

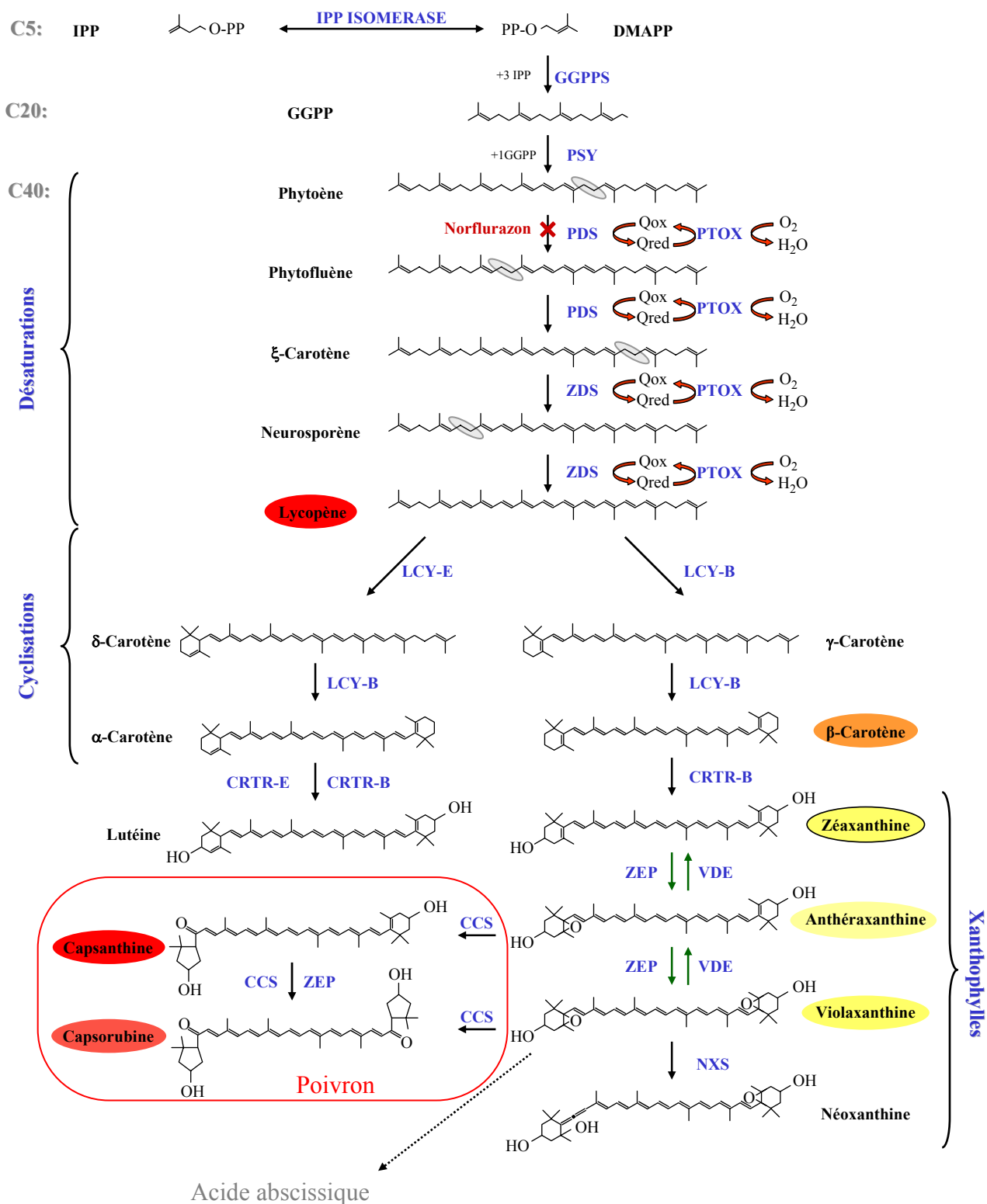
### **2.2.1 Rôle de réservoirs lipidiques**

Les particules lipidiques que l'on retrouve dans les élaïoplastes des cellules du tapis des anthères (Murphy et Ross 1998, Hernandez-Pinzon *et al.* 1999) ou dans les graines (Huang 1996, Murphy et Vance 1999) sont impliquées dans le stockage des lipides. Elles sont composées de différents lipides neutres, d'esters et contiennent aussi des protéines spécifiques.

D'autre part, la similarité de la composition lipidique des plastoglobules trouvés dans les chloroplastes avec celle des thylacoïdes, suggère que les plastoglobules jouent un rôle de réservoir lipidique pour la formation de ces thylacoïdes (Kessler *et al.* 1999).

### **2.2.2 Rôle dans la dégradation et le renouvellement des thylacoïdes**

La présence de catabolites des thylacoïdes dans les plastoglobules (Ghosh *et al.* 1994, Smith *et al.* 1997) suggère que les plastoglobules jouent un rôle dans le démantèlement ou le renouvellement des thylacoïdes. Le nombre de plastoglobules augmente d'ailleurs lors de la désorganisation des membranes thylacoïdiennes (Camara *et al.* 1995). Ils permettraient de séquestrer des protéines destinées à être dégradées. Ces particules se formeraient au niveau des thylacoïdes par bourgeonnement facilité par la lumière. Les déchets métaboliques susceptibles de désorganiser les membranes thylacoïdiennes seraient ainsi éliminés (Ghosh *et al.* 1994, Smith *et al.* 1997). Cette hypothèse est confortée par les travaux de Smith *et al.* (2000) qui montrent la présence de cytochrome f, une protéine photosynthétique des



**Figure 3 : Voie de biosynthèse des caroténoïdes.** IPP : isopentenyl diphosphate, DMADP : diméthylallyl diphosphate, GGPP : géranylgeranyl diphosphate, GGPPS : géranylgeranyl diphosphate synthase, PSY : phytoène synthase, PDS : phytoène désaturase, ZDS :  $\xi$ -carotène désaturase, PTOX : oxydase terminale plastidiale, LCY-B : lycopène  $\beta$ -cyclase, LCY-E : lycopène  $\epsilon$ -cyclase, CCS : capsanthine capsorubine cyclase, ZEP : zéaxanthine époxidase, VDE : zéaxanthine dé-époxidase, NXS : néoxanthine synthase. Les flèches vertes présentent les activités enzymatiques mises en œuvre lors du cycle des xanthophylles.

membranes thylacoïdiennes, dans les plastoglobules et les particules lipidiques. Ces auteurs montrent également que les plastoglobules et les particules lipidiques contiennent les mêmes acides gras que ceux des thylacoïdes.

### 2.2.3 Rôle dans la séquestration des caroténoïdes

Lors du mûrissement du fruit de poivron, on assiste à une accumulation des plastoglobules dans les chloroplastes qui perdent leurs thylacoïdes et se différencient en chromoplastes. En parallèle, des caroténoïdes s'accumulent sous forme de fibrilles provenant de l'allongement de plastoglobules (Deruere *et al.* 1994b).

## 3 LES CAROTÉNOÏDES

Les caroténoïdes, molécules à caractère hydrophobe, sont des isoprénoïdes à 40 atomes de carbone. Ils peuvent présenter jusqu'à 15 doubles liaisons conjuguées qui leur confèrent des propriétés d'absorption de la lumière (400-500nm) et par conséquent, leur donnent une coloration. Ils sont présents chez les plantes, les algues et les cyanobactéries, et chez certains champignons et bactéries (Fraser *et al.* 1999). Chez les végétaux, ils sont synthétisés dans le plaste et tous les gènes de la biosynthèse des caroténoïdes étant nucléaires, les protéines correspondantes doivent donc être importées.

### 3.1 BIOSYNTHÈSE

La biosynthèse des caroténoïdes est issue de la condensation de plusieurs molécules d'un précurseur à 5 atomes de carbone : l'isopentenyl diphosphate (IPP), précurseur des différents isoprénoïdes présents chez les plantes (Cunningham et Gantt 1998). L'IPP peut être synthétisé dans le cytoplasme à partir de la voie du mévalonate, mais pour la synthèse des caroténoïdes, il provient principalement de la voie non mévalonate du plaste (Lichtenthaler 1999). Trois molécules d'IPP et une molécule de son isomère : le diméthylallyl diphosphate (DMAPP obtenu par l'action de l'IPP isomérase) forment une molécule à 20 atomes de carbone : le géranylgeranyl diphosphate (GGPP) grâce à l'action de la GGPP synthase (GGPPS), (Figure 3). Puis, la condensation de deux GGPP par la phytoène synthase (PSY) produit le premier caroténoïde : le phytoène. Toutes ces enzymes sont solubles et localisées dans le stroma (pour revue : Cunningham 2002).

Le phytoène subit ensuite une série de désaturations et de cyclisations par des enzymes liées aux membranes pour donner d'autres types de caroténoïdes (pour revue : Hirschberg 2001).

Tout d'abord, une double désaturation est effectuée par l'enzyme phytoène désaturase (PDS) pour donner dans l'ordre le phytofluène, puis le  $\zeta$ -carotène. Cette désaturation nécessite un intermédiaire redox : la quinone qui est réoxydée grâce à l'intervention d'un co-facteur : PTOX (Carol *et al.* 1999, Josse *et al.* 2000) qui transfère les électrons à l'oxygène pour former de l'eau. Deux autres désaturations sous l'action de la  $\zeta$ -carotène désaturase (ZDS) forment le neurosporène et finalement le lycopène que l'on retrouve principalement dans le fruit rouge de la tomate. Le lycopène, à son tour, peut subir deux types de cyclisations en bout de chaîne. Soit deux cyclisations sont effectuées par la lycopène  $\beta$ -cyclase (LCY-B) pour former le  $\beta$ -carotène, soit à la fois la lycopène  $\beta$ -cyclase et la lycopène  $\epsilon$ -cyclase (LCY-E) participent toutes deux à la formation de l' $\alpha$ -carotène qui est le précurseur de la lutéine. Cette dernière est obtenue après hydroxylation par CRTR-B et CRTR-E des deux cycles de l' $\alpha$ -carotène. Ensuite, le  $\beta$ -carotène peut être lui aussi hydroxylé au niveau des cycles pour donner la zéaxanthine. Ces caroténoïdes hydroxylés portent le nom de xanthophylles. La zéaxanthine peut subir une époxydation de la part de l'enzyme zéaxanthine époxydase (ZEP) et son produit l'anthéroxanthine subit une deuxième époxydation pour produire au final la violaxanthine. Ces réactions peuvent être inversées par l'action de la violaxanthine dé-époxydase (VDE) dans le cas du cycle des xanthophylles (paragraphe suivant). La néoxanthine quant à elle, est formée à partir de violaxanthine par la néoxanthine synthase (NXS). Dans le fruit de poivron, on trouve deux autres caroténoïdes : la capsanthine et la capsorubine synthétisés respectivement à partir de l'anthéroxanthine et de la violaxanthine sous l'action de l'enzyme capsanthine capsorubine synthase (CCS). La capsorubine peut également être obtenue à partir de la capsanthine grâce à l'action de l'enzyme ZEP suivie de celle de CCS.

### **3.2 FONCTIONS DES CAROTÉNOÏDES**

Le premier rôle des caroténoïdes est lié à leur présence au sein de l'appareil photosynthétique dans les chloroplastes. En effet, les xanthophylles sont des pigments accessoires des antennes collectrices qui sont capables de transférer l'énergie lumineuse à la chlorophylle (Britton 1995).

Un autre rôle très important rempli par les caroténoïdes est la photoprotection. En cas d'excès de lumière, les xanthophylles ont la capacité de « quencher » les états triplets d'excitation de la chlorophylle (non utilisables pour la photosynthèse) qui mènent à la formation des espèces réactives de l'oxygène (ROS). Ces dernières ont un effet néfaste sur les protéines et les lipides environnants et affectent l'efficacité de la photosynthèse. Cette

dissipation de l'excès d'excitation de la chlorophylle de manière non radiative est connue sous le nom de « quenching non photochimique » (Niyogi 2000). Les caroténoïdes permettent ainsi de prévenir les dégradations de l'appareil photosynthétique par les ROS.

Le cycle des xanthophylles (Figure 3) est un mécanisme qui contribue à renforcer la photoprotection exercée par les caroténoïdes (Demmig-Adams et Adams III 1996). En condition d'excès de lumière, l'enzyme VDE est activée par la baisse du pH du lumen et conduit à une augmentation de la synthèse de zéaxanthine impliquée dans la dissipation de l'excès d'énergie sous forme de chaleur. En condition de faible lumière, l'enzyme ZEP est activée pour inverser le processus et donner de la violaxanthine à partir de la zéaxanthine.

Le rôle des caroténoïdes dans la protection des centres réactionnels de la photosynthèse est d'ailleurs crucial pour la plante pour maintenir l'intégrité de la structure de ceux-ci. Une perturbation de la biosynthèse des caroténoïdes par des herbicides (Simkin *et al.* 2000) ou à la suite d'une mutation (Josse *et al.* 2000) peut être létale pour les organismes photosynthétiques dans des conditions d'exposition à la lumière.

Les caroténoïdes influent aussi sur la fluidité des membranes et permettent ainsi de maintenir l'intégrité de celles-ci dans des conditions où elles sont déstabilisées (Havaux 1998).

Les caroténoïdes fournissent aussi une coloration aux fleurs et aux fruits des plantes qui attirent alors les pollinisateurs et les disséminateurs de graines afin d'assurer leur propagation. Les caroténoïdes sont des métabolites secondaires. Le pigment majeur responsable de la couleur rouge des fruits de tomate est le lycopène, chez le poivron, ce sont la capsanthine et la capsorubine.

Les caroténoïdes sont aussi des précurseurs de la biosynthèse de l'hormone ABA : l'acide abscissique (Rock et Zeevaart 1991, Chernys et Zeevaart 2000), (Figure 3). Des produits de clivage de caroténoïdes peuvent également avoir des effets hormonaux (Snowden *et al.* 2005).

### **3.3 RÉGULATIONS DANS LE CHLOROPLASTE**

Puisque les caroténoïdes jouent un rôle important dans la photoprotection, la régulation de leur biosynthèse doit être probablement liée à celle de la machinerie photosynthétique. Cette régulation est encore mal connue. En effet, il a été montré que des gènes de la voie de biosynthèse des caroténoïdes sont soumis à une régulation de la part de la lumière. L'ARNm de *psy* s'accumule à la lumière chez les plantules de la moutarde, alors que pour *ggps* ce n'est pas le cas (Von Lintig *et al.* 1997). On observe pourtant une modification quantitative des caroténoïdes lors de changements des conditions d'illumination (Demmig-Adams *et al.* 1996).

Dans les feuilles de poivron, les transcrits des gènes *psy*, *pds* et *zds* s'accumulent aussi en présence de lumière par rapport à la phase d'obscurité (Simkin *et al.* 2003b). Chez la tomate, on retrouve une expression lumière dépendante dans les feuilles, ce qui conduit à une accumulation de pigments au début de la phase d'obscurité après extinction de la lumière, probablement liée au fait que les caroténoïdes présents sont dégradés moins rapidement à l'obscurité (Simkin *et al.* 2003a).

L'utilisation de conditions produisant un stress (herbicide inhibant PDS) agit de la même manière sur les gènes de la biosynthèse des caroténoïdes (Simkin *et al.* 2003a). Ceci conforte le rôle protecteur des caroténoïdes. Ainsi, une surexpression de la  $\beta$ -carotène hydroxylase produit des plants d'*Arabidopsis thaliana* plus résistants au stress (Davison *et al.* 2002).

Hirschberg (2001) rapporte qu'en condition de forte lumière, on observe une accumulation des transcrits de *lcy-e* et *lcy-b* chez *Arabidopsis thaliana* et chez la tomate. Ceci suggère une régulation des enzymes par les flux de la voie de biosynthèse des caroténoïdes. Un rétrocontrôle par un produit de la voie biosynthèse des caroténoïdes avait d'ailleurs été suggéré pour l'enzyme PDS (Giuliano *et al.* 1993, Corona *et al.* 1996). L'utilisation d'inhibiteurs de la biosynthèse des caroténoïdes qui mène à une accumulation de la quantité de caroténoïdes totaux (Bramley *et al.* 1993) conforte cette idée. Cependant, chez *Arabidopsis thaliana*, il a été montré que le gène *pds* n'était pas régulé par le contenu en caroténoïdes (Wetzel et Rodermel 1998).

Les gènes de la biosynthèse des caroténoïdes sont sensibles à certains herbicides et aux inhibiteurs de la chaîne respiratoire. Le norflurazon, un inhibiteur de PDS (Figure 3), induit une accumulation de phytoène dans les feuilles de poivron et de tomate (Simkin *et al.* 2003a).

Les caroténoïdes sont donc essentiels au bon fonctionnement de la photosynthèse et montrent une régulation complexe puisqu'un mutant *lcy-e* chez *Arabidopsis thaliana* peut se développer sans problème apparent, alors qu'il ne peut plus synthétiser de lutéine, caroténoïde normalement présent dans les antennes collectrices (Pogson *et al.* 1996) ; preuve d'une certaine souplesse dans la composition des caroténoïdes chez les plantes.

### **3.4 RÉGULATIONS DANS LE CHROMOPLASTE**

La biosynthèse des caroténoïdes est régulée de manière différente dans les chloroplastes et dans les chromoplastes (Thelander *et al.* 1986). Elle a été étudiée, notamment lors de la différenciation des chloroplastes en chromoplastes dans les fruits de poivron et de tomate,

caractérisée par l'apparition d'une couleur rouge. Le fruit de tomate est d'ailleurs devenu le modèle pour l'étude de cette différenciation.

Dans le fruit vert, qui contient des chloroplastes, la composition en caroténoïdes est similaire à celle des feuilles. Mais lors de son mûrissement, le fruit commence à changer de couleur à cause de l'accumulation de caroténoïdes et de la perte des chlorophylles. En effet, les gènes *psy*, *pds* et *zds* impliqués dans la biosynthèse des caroténoïdes sont induits au cours du mûrissement des fruits de poivron et de tomate (Pecker *et al.* 1992, Giuliano *et al.* 1993, Fraser *et al.* 1994, Bramley 1997, Ronen *et al.* 1999, Josse *et al.* 2000). Dans le même temps, les deux cyclases LCY-E et LCY-B disparaissent (Pecker *et al.* 1996, Ronen *et al.* 1999), entraînant l'accumulation de leur substrat le lycopène, pigment majeur des fruits de tomate.

Il a été établi que la régulation de *psy* et *pds* est transcriptionnelle (Corona *et al.* 1996). Il en est de même pour *lcy-e* et *lcy-b*. En effet, les fruits de tomate du mutant *Delta* qui accumulent du  $\delta$ -carotène au lieu du lycopène, présentent une accumulation des transcrits de la cyclase *lcy-e* (Ronen *et al.* 1999) lors de la maturation du fruit par rapport à la plante sauvage. La même situation est observable chez le mutant *Beta* qui accumule du  $\beta$ -carotène et qui présente une surexpression du gène de la cyclase *lcy-b* (Ronen *et al.* 2000). On retrouve le même type de régulation transcriptionnelle chez le poivron, par exemple avec l'enzyme CCS (Kuntz *et al.* 1998), ou encore d'autres gènes comme *ggps*, *pds*, *ptox* (Kuntz *et al.* 1992, Romer *et al.* 1993, Josse *et al.* 2000), et également chez d'autres fruits comme le melon (Aggelis *et al.* 1997) et *Citrus unshiu* (Ikoma *et al.* 2001).

Dans des conditions de stress oxydant, on observe également dans les fruits, une induction des gènes de la voie de biosynthèse des caroténoïdes (Hugueney *et al.* 1996, Bouvier *et al.* 1998).

L'activité des gènes de la voie de biosynthèse des caroténoïdes est également régulée transcriptionnellement chez les fleurs de tomate (Pecker *et al.* 1996, Giuliano *et al.* 1993, Ronen *et al.* 1999, Ronen *et al.* 2000). Cependant un mécanisme post-traductionnel pourrait être mis en jeu puisque chez *N. pseudonarcissus*, on trouve une forme inactive soluble et une forme active liée aux membranes pour chacune des deux enzymes PSY et PDS (Al-Babili *et al.* 1996, Schledz *et al.* 1996).

D'autre part, les fruits de tomate des mutants *old-gold* et *old-gold crimson*, contiennent une plus grande quantité de lycopène par rapport au sauvage (Ronen *et al.* 2000). Ceci est probablement une conséquence de la diminution de la quantité de  $\beta$ -carotène due à la

mutation du gène de la  $\beta$ -cyclase, ce qui produit une augmentation de l'activité des enzymes plus en amont dans la voie de biosynthèse.

### **3.5 LES CAROTÉNOÏDES ET L'HOMME**

Les caroténoïdes sont des éléments essentiels de l'alimentation humaine. Ils contribuent à diminuer les risques de maladies et certains sont essentiels, comme le  $\beta$ -carotène qui est un précurseur de la vitamine A (Johnson 2002).

Associé à cela, leur utilisation comme colorant dans l'alimentation donne un intérêt économique certain à leur étude. Plusieurs tentatives de manipulation du contenu en caroténoïdes des plantes ont d'ailleurs été entreprises (Sandmann 2001) en utilisant différentes approches :

- Une modification de la voie de biosynthèse des caroténoïdes pour obtenir des caroténoïdes différents dans le fruit de tomate (Romer *et al.* 2000).
- Une augmentation de la quantité préexistante de caroténoïdes dans les fleurs de *Brassica napus* (Shewmaker *et al.* 1999).
- L'intégration d'une voie complète de biosynthèse des caroténoïdes dans le riz (Ye *et al.* 2000). Dans ce cas, l'expression d'enzymes permettant la synthèse de caroténoïdes cyclique dans l'endosperme de riz donne des grains de couleur jaune accumulant notamment du  $\beta$ -carotène.
- Une augmentation de la quantité de protéine associée au stockage des caroténoïdes dans le fruit de tomate (Simkin 2002).

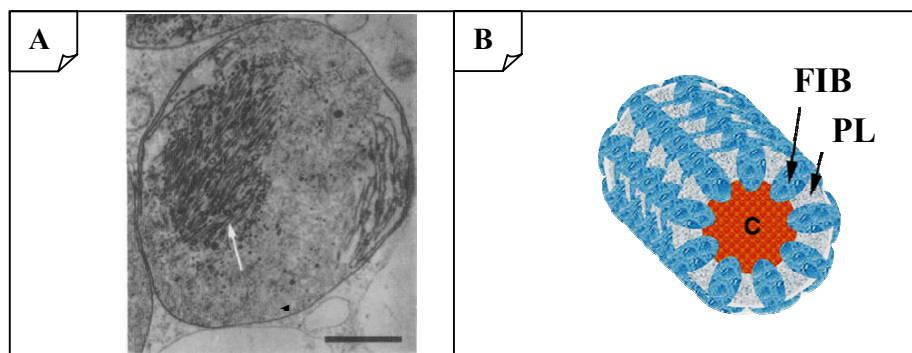
## **4 LES PROTÉINES DE TYPE FIBRILLINE**

L'une des modifications métaboliques les plus notables lors de la différenciation des chloroplastes en chromoplastes est sans doute la forte accumulation de caroténoïdes, pigments donnant leur couleur aux pétales et aux fruits. Une protéine nommée fibrilline a été découverte dans les chromoplastes du fruit de poivron, associée à cette accumulation de pigments. Des études ultérieures dans d'autres plantes ont mis en évidence d'autres protéines semblables appelées « PAP » pour Protéines Associées aux Plastides, ou « PLP » pour Protéines associées aux Lipides de Plastides (pour revue : Simkin *et al.* 2004).

## 4.1 LA FIBRILLINE DE POIVRON

### 4.1.1 Caractérisation

L'étude du mûrissement du fruit de poivron a débouché sur la mise en évidence de structures fibrillaires (Figure 4) impliquées dans le stockage de ces caroténoïdes. Ces fibrilles se forment dans les chromoplastes à partir de plastoglobules et sont composées de caroténoïdes, de lipides et d'une protéine majoritaire de 32kDa : la fibrilline (Deruere *et al.* 1994b).



**Figure 4 :** Micrographie d'un chromoplaste de poivron et schéma de la structure d'une fibrille.

A : Micrographie d'un chromoplaste de poivron différencié contenant des fibrilles indiquées par la flèche (d'après Deruere *et al.* 1994b). B : Schéma de la structure d'une fibrille (d'après Vishnevetski *et al.*, 1999).

FIB : protéine fibrilline, PL : phospholipides, C : caroténoïdes.

La fibrilline, protéine plastidiale, est codée par un gène nucléaire. Le clonage de la séquence génomique du gène a mis en évidence la présence de deux introns de 805 et 94pb (Deruere *et al.* 1994a). Deux types de transcrits ont été détectés dans les fruits de poivron, un premier de 2,2kpb correspondant à un ARNm dont seul l'intron 2 a été épissé et un second correspondant à un ARNm complètement épissé.

La région promotrice du gène *FIB* a également clonée (Deruere *et al.* 1994a). L'étude de sa séquence montre la présence d'éléments *cis* impliqués dans la réponse à divers signaux environnementaux et développementaux (Manac'h 2000).

### 4.1.2 Régulation de la fibrilline de poivron

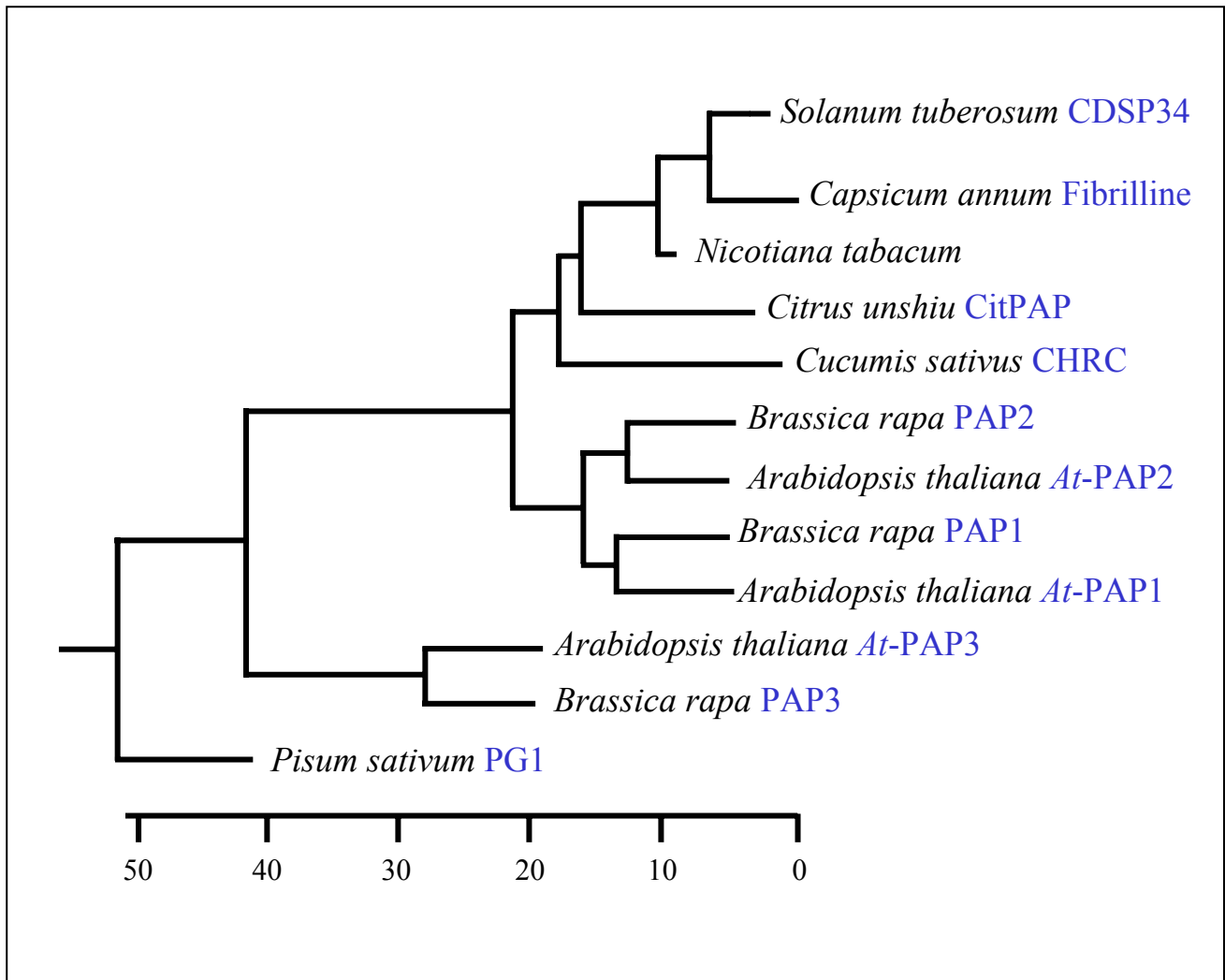
L'accumulation de la fibrilline débute lors de la maturation du fruit lorsque les chloroplastes vont se différencier en chromoplastes (Deruere *et al.* 1994b). Cette induction est donc soumise à une régulation développementale concomitante à une synthèse des ceto-

caroténoïdes (capsanthine, capsorubine). D'autres facteurs l'influencent positivement comme l'acide abscissique ou un précurseur de l'éthylène (etephon), alors que l'acide gibbérillique et l'acide indol acétique ont tendance à la retarder (Deruere *et al.* 1994b).

L'étude du gène de la fibrilline a montré la présence de deux types d'ARNm issus d'un épissage partiel du premier des deux introns. L'épissage du premier intron est soumis à l'influence de la lumière (Rey *et al.* 2000). En effet, dans des conditions de faible intensité lumineuse, des plants de tabac surproduisant la protéine FIB de poivron présentent une diminution de l'abondance de la protéine FIB pouvant être liée à un épissage alternatif d'un intron dépendant de la lumière. Cependant, la présence d'un transposon dans le premier intron pourrait aussi expliquer le défaut d'épissage constaté de l'ARNm de la fibrilline de poivron (Pozueta-Romero *et al.* 1998).

La fibrilline a été de nouveau caractérisée dans les feuilles, les fleurs, et le fruit mûr de poivron (Pozueta-Romero *et al.* 1997) et une analyse par Southern blot suggère qu'il n'existe qu'un gène fibrilline chez le poivron. Les auteurs ont aussi détecté un homologue dans le fruit de tomate grâce à leur anticorps dirigé contre la protéine FIB de poivron. Des études de l'activité du promoteur de la fibrilline de poivron dans le fruit de tomate ont montré que son induction commence au stade vert mature, juste avant l'apparition de la coloration dans le fruit, ceci en même temps que l'induction du promoteur du gène *ccs* responsable de la synthèse des ceto-caroténoïdes qui s'accumulent lors du mûrissement du fruit de poivron (Kuntz *et al.* 1998). On retrouve chez ce modèle de la tomate une induction du promoteur de la fibrilline de poivron par l'éthylène, alors que d'autres régulateurs comme l'acide abscissique, l'auxine ou les polyamines ne semblent pas avoir d'effet (Kuntz *et al.* 1998). D'autre part, une faible induction du promoteur a pu être mise en évidence lors de la maturation de la fraise (Agius *et al.* 2005).

L'expression de la fibrilline dans le fruit de poivron dépend de facteurs développementaux (lors du mûrissement), mais aussi de facteurs environnementaux. Une modification de l'équilibre redox lors d'un déficit hydrique ou une blessure induit le promoteur de la fibrilline de poivron dans le fruit de tomate (Kuntz *et al.* 1998). Une telle induction a été également montrée dans les feuilles de poivron, et de tabac exprimant un gène rapporteur sous le contrôle du promoteur de la fibrilline de poivron (Chen *et al.* 1998). On retrouve tout de même dans les feuilles de ces plantes, une petite quantité de protéine fibrilline dans des conditions non stressantes. L'induction du promoteur de la fibrilline de poivron dans les feuilles de tomates, suite à des conditions de stress diverses, dépend de la présence de la



**Figure 5 :** Arbre phylogénique des protéines de la famille de la fibrilline (d'après Kim et al., 2001). L'échelle représente le nombre de changements d'acides aminés.

lumière (Manac'h et Kuntz 1999). Elle peut être également produite par l'utilisation d'herbicides produisant des ROS, elle est donc, en conclusion, dépendante d'un traitement de type photo-oxydant.

## 4.2 LES PROTÉINES DE TYPE FIBRILLINE

Des protéines de type fibrilline ont été mises en évidence et caractérisées biochimiquement chez d'autres espèces que le poivron, ou bien identifiées *in silico*.

Tout d'abord, au cours de différentes études portant sur une réponse au stress ou sur la maturation de fruits ou de fleurs colorés, des orthologues de la protéine fibrilline ont été identifiés : CHRC chez *Cucumis sativus* (Smirra *et al.* 1993), CDSP34 chez *Solanum tuberosum* (Pruvot *et al.* 1996a), TomPAP chez *Lycopersicon esculentum* (Pozueta-Romero *et al.* 1997), CitPAP chez *Citrus unshiu* (Moriguchi *et al.* 1998), BCP32 chez *Brassica campestris* (Ting *et al.* 1998), PG1 chez *Pisum sativum* (Kessler *et al.* 1999) et PAP1, 2, 3 chez *Brassica rapa* (Kim *et al.* 2001).

Les séquences de polypeptides présentant des homologies avec les protéines de type fibrilline ont été également identifiées dans les banques de données chez différents plantes : *Nicotiana tabacum* et *Hordeum vulgare* (orge) (Pozueta-Romero *et al.* 1997), *Zea maïs* et *Brassica rapa* (Gillet *et al.* 1998), *Arabidopsis thaliana* (Ting *et al.* 1998, Kim *et al.* 2001), et chez la cyanobactérie *Synechocystis* (Gillet *et al.* 1998, Kim *et al.* 2001).

Une analyse phylogénique (Figure 5) des polypeptides matures montre que les protéines de *Solanum tuberosum*, *Capsicum annuum*, *Cucumis sativus*, *Citrus unshiu* et de *Nicotiana tabacum* sont proches les unes des autres (Kim *et al.* 2001). Un autre groupe est formé par les protéines PAP 1 et 2 d'*Arabidopsis thaliana* et *Brassica rapa*. Plus éloignées on retrouve les séquences PAP 3 d'*Arabidopsis thaliana* et *Brassica rapa*, puis celle de PG1 de *Pisum sativum*.

### 4.2.1 La protéine CHRC de *Cucumis sativus* et sa régulation

L'étude de la différenciation des chloroplastes en chromoplastes dans les fleurs de *Cucumis sativus* a mis en évidence l'apparition d'une protéine de 35kDa lors de ce phénomène (Smirra *et al.* 1993). Cette protéine fait partie des complexes caroténoïdes-protéines présents dans les chromoplastes. Elle s'accumule tout au long du développement de la fleur, en parallèle avec l'accumulation des caroténoïdes, mais pas dans les feuilles ni dans les fruits. Vishnevetsky *et al.* (1996) ont ensuite montré que la protéine CHRC possédait un peptide de transit permettant

son ciblage vers les membranes thylacoïdiennes. L'accumulation des transcrits dans des cultures de cellules de boutons floraux est aussi soumise à une régulation positive par l'acide gibbérillique. L'acide abscissique, connu pour avoir un effet antagoniste sur le développement floral, tout comme l'utilisation d'un inhibiteur de la biosynthèse de l'acide gibbéréllique, réprime fortement cette accumulation (Vishnevetsky *et al.* 1997). Des délétions du promoteur ont montré l'implication d'un fragment de 290pb dans la régulation de l'expression du gène *Chrc* par l'acide gibbéréllique (Vishnevetsky *et al.* 1999).

#### 4.2.2 La protéine CDSP34 de *Solanum tuberosum* et sa régulation

Chez la pomme de terre, une protéine de type fibrilline nommée CDSP34 a été mise en évidence dans les plantes soumises à une déshydratation (Pruvot *et al.* 1996a). Une autre équipe a isolé les transcrits du gène codant cette même protéine, renommée C40.4, à partir de plantes en voie de tubérisation (Monte *et al.* 1999). D'après une analyse par Southern blot, le gène codant CDSP34/C40.4 n'existerait qu'en une seule copie dans le génome de *Solanum tuberosum*.

L'accumulation de CDSP34 a été caractérisée dans les thylacoïdes de plantes soumises à un déficit hydrique réversible (Pruvot *et al.* 1996a). Le stress induit l'accumulation du transcrit et de la protéine et cette dernière persiste deux semaines après la réhydratation des plantes. Cette induction peut être également obtenue par une forte illumination (Gillet *et al.* 1998). Les auteurs ont aussi suggéré que l'ABA est impliqué dans la régulation post-transcriptionnelle de ce gène car l'accumulation des transcrits ne s'accompagne pas d'une accumulation de la protéine chez un mutant déficient en ABA, contrairement au sauvage. CDSP34 (caractérisée à nouveau sous le nom de C40.4) est également associée à la tubérisation chez *Solanum tuberosum* et son expression est dépendante de la lumière (Monte *et al.* 1999). Les auteurs ont proposé que la protéine soit associée au photosystème II. Une lignée antisens de C40.4 présente par ailleurs une diminution du rendement de tubérisation et une baisse du quenching non photochimique de la fluorescence de la chlorophylle a. Ceci suggère un rôle de modulation de l'activité photosynthétique par cette protéine. L'observation au microscope électronique de l'ultra-structure des plastes de feuilles de *Solanum tuberosum* soumises à un déficit hydrique montre une augmentation de la taille et du nombre de plastoglobules (Eymery et Rey 1999). Cependant, la protéine CDSP34 semble ici plutôt liée aux lamelles stromatiques qu'aux plastoglobules. L'accumulation des transcrits du gène *CDSP34* et de sa protéine seraient une réponse à différentes conditions conduisant à un stress oxydant ou à un stress biotique (Langenkamper *et al.* 2001).

#### 4.2.3 Les protéines de type fibrilline des *Brassica* et leur régulation

Chez les *Brassica*, lors de la microsporogénèse, les cellules du tapis contiennent deux organites riches en lipides : les tapetosomes composés d'oléosines (Introduction § 2) et de TAG, et les élaïoplastes composés d'ester neutres et d'un polypeptide. Le gène codant ce dernier a été cloné chez *Brassica campestris* et la protéine BCP32 codée montre une homologie avec la protéine fibrilline de poivron (Ting *et al.* 1998). Deux protéines de 34 et 36kDa ont été par la suite mises en évidence dans les élaïoplastes de *Brassica napus* grâce à un anticorps dirigé contre la fibrilline de poivron (Hernandez-Pinzon *et al.* 1999). Enfin chez *Brassica rapa*, trois homologues nommés PAP 1, 2, 3 ont été caractérisés (Kim *et al.* 2001). Les auteurs ont montré que ces trois gènes codaient pour des protéines de type fibrilline et ont pu trouver dans les séquences génomiques d'*Arabidopsis thaliana* un homologue pour chacun de leur gène. Les polypeptides PAP1 et PAP2 présentent une similarité de séquence bien plus importante entre eux que par rapport à PAP3 (Figure 5). Les transcrits de PAP1 sont plus abondants dans les anthères que dans les feuilles, les graines et les sépales. L'accumulation des transcrits de PAP 2 est spécifique des pétales alors que celle de PAP3 est distribuée dans tous les organes cités. Les polypeptides PAP sont localisés dans les plastes et on retrouve les protéines PAP1 et PAP2 en grande quantité respectivement, dans les anthères et les pétales. Une étude par northern blot dans différentes conditions de stress montre que la déshydratation ou l'ozone diminuent l'accumulation des transcrits des gènes *PAP* alors qu'une blessure ou une augmentation de l'intensité lumineuse accentuent cette accumulation.

#### 4.2.4 La protéine PG-1 de *Pisum sativum*

Une protéine nommée PG1 (plastoglobuline) a pu être isolée à partir de plastoglobules de *Pisum sativum* (Kessler *et al.* 1999). Cette protéine possède en position N-terminale un peptide de transit qui permet son ciblage vers les chloroplastes où elle s'accumule à la surface des plastoglobules. L'analyse de la séquence de ce polypeptide a montré qu'il présente une forte similarité de séquence (>50%) par rapport à la fibrilline de poivron.

#### 4.2.5 La protéine CitPAP de *Citrus unshiu* et sa régulation

La protéine CitPAP similaire à la fibrilline a été mise en évidence chez *Citrus unshiu* (Moriguchi *et al.* 1998). Un Southern blot effectué sur de l'ADN génomique avec une sonde correspondant à l'ADNc du gène codant cette protéine a permis de mettre en évidence l'existence potentielle de 3 autres gènes similaires dans le génome de cette plante. L'analyse

de l'expression du gène de CitPAP montre qu'il est constitutivement exprimé, que ce soit dans les feuilles, les fleurs ou les fruits. On notera que dans le cas de la peau du fruit, le gène est soumis à une régulation développementale. En effet, le transcrit du gène s'accumule lors mûrissement du fruit qui s'accompagne également d'une accumulation de caroténoïdes dans cet organe.

#### **4.3 FONCTION DES PROTÉINES DE TYPE FIBRILLINE**

La fonction des protéines de type fibrilline n'est pas encore bien connue. Cependant, l'ensemble des données structurales et physiologiques obtenues sur les protéines de type FIB des différentes espèces permet de dégager quelques hypothèses.

Les protéines de type fibrilline se retrouvent au niveau de structures lipidiques, que ce soit en association avec les membranes des thylacoïdes, à la surface des plastoglobules ou au niveau des fibrilles ou d'autres structures de stockage des caroténoïdes. Il est donc vraisemblable que ces protéines jouent un rôle structural dans le maintien de particules lipidiques ou de membranes.

Ces protéines pourraient permettre ainsi de faire une interface entre la phase hydrophobe (stockage de lipides et/ou de caroténoïdes) et le milieu aqueux. Ceci est confirmé par les expériences de traitement à la trypsine de plastoglobules qui entraîne la coalescence des particules (Tzen et Huang 1992). D'autre part, la surproduction de la fibrilline de poivron chez le tabac conduit à la formation d'un plus grand nombre de plastoglobules dans les chloroplastes des feuilles et les leucoplastes des fleurs de tabac (Rey *et al.* 2000). De même, les plastes de feuilles de *Solanum tuberosum* soumises à un déficit hydrique accumulent une protéine FIB (CDSP34) et montrent une augmentation de la taille et du nombre de plastoglobules (Eymery et Rey 1999). C'est aussi le cas dans les chromoplastes de fruits de tomate sur-exprimant la fibrilline de poivron (Simkin 2002).

Ces protéines seraient aussi impliquées dans le maintien de la stabilité des membranes lors de la formation, du renouvellement ou du démantèlement des thylacoïdes en conditions de stress puisque la protéine CDSP34 semble ici plutôt liée aux lamelles stromatiques et non pas aux plastoglobules (Eymery et Rey 1999). Ce rôle est conforté par les travaux de Rey *et al.* (2000) qui ont montré qu'en condition de déshydratation et de forte lumière, la fibrilline s'associe aux thylacoïdes.

Cependant, si l'interaction des oléosines avec les lipides, protéines également impliquées dans la structure de particules lipidiques, met en jeu un segment protéique hydrophobe en

épingle à cheveu pouvant s'insérer dans un environnement lipidique, les protéines de type fibrilline ne disposent pas d'un tel segment hydrophobe dans leur séquence. La nature de l'interaction des fibrillines avec les lipides, les caroténoïdes ou les membranes n'est pas encore bien cernée. Le modèle de structure des fibrilles chez le poivron (Deruere *et al.* 1994b, Vishnevetsky *et al.* 1999) n'a d'ailleurs pas pu être encore vérifié.

#### **4.4 LES AUTRES PROTÉINES**

Chez l'algue *D. bardawil* la protéine CGP (Carotene Globule Protein), d'environ 38kDa, s'accumule en parallèle à une forte accumulation de  $\beta$ -carotène dans les globules de l'espace interthylacoïdien (Katz *et al.* 1995). L'association de CGP aux globules de carotène suggère que cette protéine maintient la structure des corps lipidiques du plaste, en empêchant leur coalescence.

D'autres protéines mineures ont pu être caractérisées comme associées aux plastoglobules, aux chromoplastes ou aux caroténoïdes. C'est par exemple le cas de CHRD (Libal-Weksler *et al.* 1997).

Cependant, ces polypeptides ne sont pas des homologues de la fibrilline de poivron, ou n'ont pas été encore caractérisés comme tels.

### **5 EN RÉSUMÉ**

Les protéines de type fibrilline sont largement répandues dans les organismes photosynthétiques, depuis les cyanobactéries jusqu'aux plantes supérieures. Les premières études indiquent que ce type de protéine n'est codé que par un seul gène, cependant des expériences de Southern blot menées plus tard tendent à prouver la présence de plusieurs gènes codant des polypeptides de type fibrilline, ce qui a été démontré par la suite avec la mise en évidence des 3 gènes PAP chez *Brassica rapa* et dans le génome séquencé d'*Arabidopsis thaliana*.

La plupart des gènes codant des protéines de type fibrilline sont soumis à une régulation développementale et environnementale. Des conditions de stress hydrique, de forte lumière, de stress mécanique ou encore de traitements menant à de la photo-oxydation induisent les gènes fibrilline chez les différentes plantes. On retrouve également une accumulation des transcrits de ces gènes dans des conditions conduisant à la synthèse et à l'accumulation de caroténoïdes. Enfin, il semble que les hormones jouent également un rôle modulateur de l'expression des fibrillines. Cette régulation s'opère généralement par un contrôle

transcriptionnel, mais dans certaines conditions, un contrôle traductionnel est possible. Une régulation au niveau de l'épissage des transcrits ainsi qu'un rétrocontrôle par un produit final de la voie de biosynthèse des caroténoïdes ne sont pas écartés.

L'aspect fonctionnel des polypeptides fibrillines semble lié à leur présence au niveau de structures lipidiques ou membranaires. On les retrouve associés à des plastoglobules, des caroténoïdes ou des membranes thylacoïdiennes, même si à l'heure actuelle, la nature des interactions réelles de ces polypeptides n'est pas encore bien cernée. Un partage de phase entre le cytoplasme et l'association à des membranes a également été constaté et peut jouer un rôle de régulation de l'activité pour ce type de protéines. Dans tous les cas, cette protéine est présente en conditions de stress ou en conditions d'accumulation de composés hydrophobes. Ceci sous-tend le rôle structural de stabilisation de membranes ou de structures lipidiques qu'on lui attribue.

## **6 OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THÈSE**

L'objectif de ce travail de thèse est de décrire de manière la plus complète possible, la présence et le rôle physiologique des fibrillines chez les plantes. En effet, les dernières études traitant des fibrillines montrent qu'il existe plusieurs gènes de ce type dans le génome des plantes. La question du nombre de ces gènes chez un organisme se pose alors. Nous avons cherché à répondre à cette question en examinant les paralogues des protéines de type fibrilline chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana* dont le génome entier est connu. Nous avons ensuite comparé la présence de ces gènes chez différentes plantes et nous avons cherché à déterminer l'évolution de ce gène présent chez les cyanobactéries et les algues.

Nous avons également étudié l'expression de la fibrilline chez *Arabidopsis thaliana* afin de vérifier l'influence des facteurs développementaux et environnementaux sur l'expression de ces gènes, notamment dans les conditions de stress qui ont montré une induction de ce gène chez différentes plantes.

Le rôle des fibrillines dans la stabilisation des membranes ou des structures lipidiques n'est pas encore bien compris, tout comme son implication dans la physiologie globale de la plante. Afin de mieux appréhender le rôle de cette protéine, nous avons entrepris l'étude de plantes affectées dans l'expression de celle-ci.

Enfin pour décortiquer la régulation de ces gènes et mettre en évidence des régulateurs impliqués dans la modulation de l'expression du gène de la fibrilline, nous avons mis en place une approche de mutagenèse. Une lignée comportant une construction « rapporteur » mise sous le contrôle du promoteur de la fibrilline a été introduite chez *Arabidopsis thaliana*. Des plantes mutantes de cette lignée, affectées dans la régulation du promoteur fibrilline, ont été isolées.

# **RÉSULTATS ET DISCUSSIONS**

## Chapitre 1

# **La famille de gènes *fibrilline* d'*Arabidopsis thaliana***

## **RESULTATS ET DISCUSSIONS**

### **1 LA FAMILLE DE GÈNES FIBRILLINE D'ARABIDOPSIS THALIANA**

L'un des modèles les plus utilisés en biologie végétale est *Arabidopsis thaliana*. En effet, le génome de cette crucifère est entièrement séquencé et les annotations sont nombreuses. La facilité de culture, les multiples techniques applicables à ce modèle ont orienté notre choix vers cette plante pour étudier la fibrilline. La présence de protéines similaires à la fibrilline de poivron chez différentes plantes (Introduction § 4.2) laissait supposer que cette protéine était également présente chez *Arabidopsis thaliana*. Une protéine avait d'ailleurs pu être détectée dans des feuilles d'*Arabidopsis thaliana* en conditions de déficit hydrique grâce à un anticorps dirigé contre l'homologue CDSP34 de la fibrilline de *Solanum tuberosum* (Langenkamper *et al.* 2001). D'autre part, un homologue pour chacune des trois protéines de type fibrilline de *Brassica rapa* a été trouvé dans la séquence génomique d'*Arabidopsis thaliana* (Kim *et al.* 2001). Certes, ce modèle ne possède pas de fruits colorés accumulant des caroténoïdes comme la tomate, ni même de pétales colorés car ils sont blancs chez cette plante, mais il possède divers avantages indispensables pour l'étude que nous avons menée, notamment pour l'approche utilisant la mutagenèse. D'autre part, la fibrilline n'est pas uniquement associée à l'accumulation de caroténoïdes, mais elle est aussi liée à une réponse de la plante face à des conditions environnementales défavorables, qui pourront facilement être étudiées chez le modèle *Arabidopsis thaliana*. Nous avons donc recherché les fibrillines d'*Arabidopsis thaliana* et nous nous sommes alors retrouvés confrontés à une famille de gènes dont nous allons détailler les caractéristiques.

#### **1.1 CARACTÉRISTIQUES DES PROTÉINES DE TYPE FIBRILLINE D'ARABIDOPSIS THALIANA**

Nous avons recherché les homologues de la fibrilline de poivron dans le génome d'*Arabidopsis thaliana* et les banques d'EST (Blast sur [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Pour cela, la séquence du polypeptide FIB de poivron a été utilisée comme requête pour un « tBlastn » (séquence protéique comparée aux séquences des banques traduites). Nous avons ensuite refait cette analyse avec chacune des séquences d'*Arabidopsis thaliana* que nous avons isolées grâce à la séquence du poivron. Les séquences montrant une E-value inférieure à  $1e^{-05}$

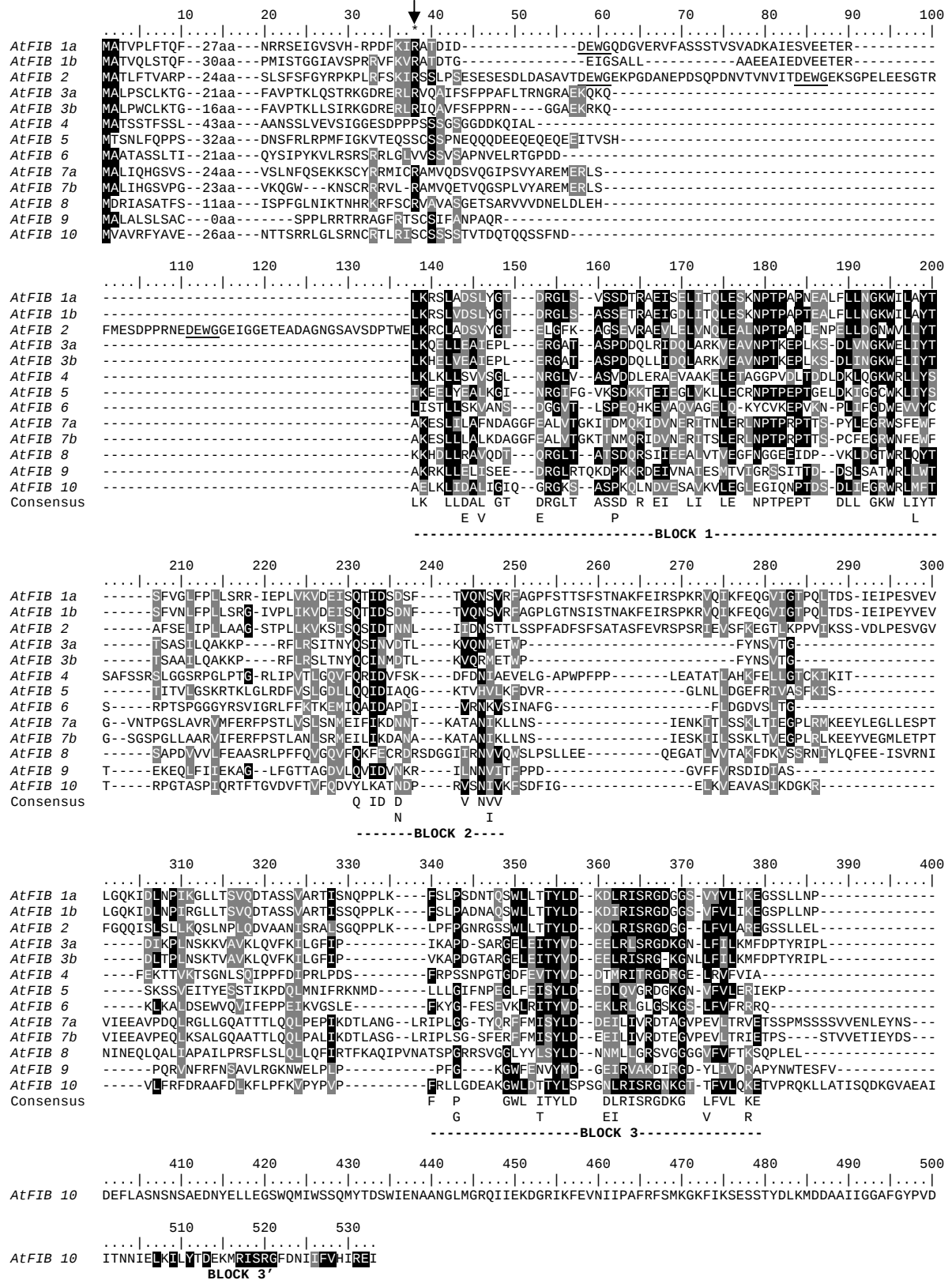
ont été retenues comme significativement assez proche de la séquence de FIB de poivron (plus les séquences comparées sont proches, plus la E-value est faible). La présence d'une annotation indiquant la présence d'un profil pfam PF04755 (Marchler-Bauer *et al.* 2005) correspondant à un motif conservé dans les différentes protéines de type fibrilline caractérisées nous a également permis d'isoler ces séquences. Des gènes issus de duplications des séquences que nous avons isolées ont pu être mis en évidence grâce à un outils de recherche de loci dupliqués chez *Arabidopsis thaliana* (<http://wolfe.gen.tcd.ie/athal/dup>). Nous avons déterminé par ces méthodes que le génome d'*Arabidopsis thaliana* comporte 13 gènes codant des protéines présentant une homologie avec la séquence de la protéine de la fibrilline de poivron (Tableau 1). Au moins une EST a été trouvée dans les bases de données pour chacun des loci. Nous avons nommé ces 13 gènes *AtFIB 1* à *10*. Trois paires de gènes sont différenciées par une lettre : *AtFIB1a, b* ; *AtFIB3a, b* ; *AtFIB7a, b*, car les deux gènes de chacune des paires présentent des séquences très similaires (>75% identité, >80% similarité). Les gènes *AtFIB1a, 1b* et *2* correspondent respectivement aux gènes *AtPAP1, 2* et *3* qui ont été précédemment trouvés dans les bases de données par Kim et ses collaborateurs (2001).

| Nom   | Locus     | EST       | Protéome  | Taille du TP | MW prédite (précurseur) | MW prédite (mature) | MW déterminée (mature) | pI déterminé ou (prédit) |
|-------|-----------|-----------|-----------|--------------|-------------------------|---------------------|------------------------|--------------------------|
| FIB1a | At4g04020 | NM_116640 | cp + thyl | 55           | 34.9                    | 28.8                | 23.9-30.6              | 4.6-4.9                  |
| FIB1b | At4g22240 | NM_118350 | cp + thyl | 59           | 36.7                    | 27.2                | 23.9-28.5              | 4.7-4.9                  |
| FIB2  | At2g35490 | NM_129101 | cp + thyl | 53           | 40.5                    | 36.6                | 34.9-42.0              | 4.1-4.3                  |
| FIB3a | At3g26070 | NM_113511 | cp + thyl | 50           | 27.2                    | 21.8                |                        | (9.36)                   |
| FIB3b | At3g26080 | NM_113512 | thyl      | 45           | 29.7                    | 24.8                |                        | (9.06)                   |
| FIB4  | At3g23400 | NM_113243 | cp + thyl | 72           | 30.5                    | 22.9                | 25.4-27.3              | 4.89-5.4                 |
| FIB5  | At5g09820 | NM_121019 |           | 61           | 30.5                    | 23.9                |                        | (4.96)                   |
| FIB6  | At5g19940 | NM_122001 | cp        | 50           | 26.5                    | 20.9                |                        | (7.87)                   |
| FIB7a | At3g58010 | NM_115663 | thyl      | 53           | 34.1                    | 28.4                | 28.2                   | 4.9                      |
| FIB7b | At2g42130 | NM_201938 | thyl      | 48           | 32.9                    | 27.7                | 28.2                   | 4.9                      |
| FIB8  | At2g46910 | NM_130259 |           | 40           | 31.6                    | 27.1                |                        | (5.23)                   |
| FIB9  | At4g00030 | NM_116220 |           | 25           | 24.1                    | 21.4                |                        | (7.25)                   |
| FIB10 | At1g51110 | NM_103989 | cp + thyl | 55           | 45.8                    | 39.6                |                        | (5.42)                   |

**Tableau 1 : Principales caractéristiques des protéines de type fibrillines d'*Arabidopsis thaliana*.**

Les noms des peptides de séquences très similaires diffèrent par une lettre (1a, 1b...). L'EST 121019 a été traduite d'après une version précédente de la séquence disponible dans les bases de données, car elle tient compte de l'épissage d'un intron supplémentaire qui donne un peptide ayant une meilleure similarité avec les autres fibrillines (joindre 8932 et 9020 dans At56g09820). La taille des peptides d'adressage (TP) est prédite par le programme ChloroP. Les masses moléculaires, les pI et les localisations par analyse protéomiques proviennent de Kleffmann *et al.* (2004) et Friso *et al.* (2004). Les valeurs prédites de pI pour les protéines matures sont indiquées entre parenthèses lorsque la valeur déterminée n'est pas disponible. Cp et thyl indiquent que la protéine a été détectée respectivement dans les protéomes de chloroplaste et/ou de thylacoïde.

Un point commun frappant entre toutes les séquences identifiées est qu'elles comportent en N-terminal une séquence d'adressage (ou peptide de transit : TP) qui, par analyse



**Figure 6 : Alignement des séquences polypeptidiques des fibrillines d'*Arabidopsis thaliana*.**

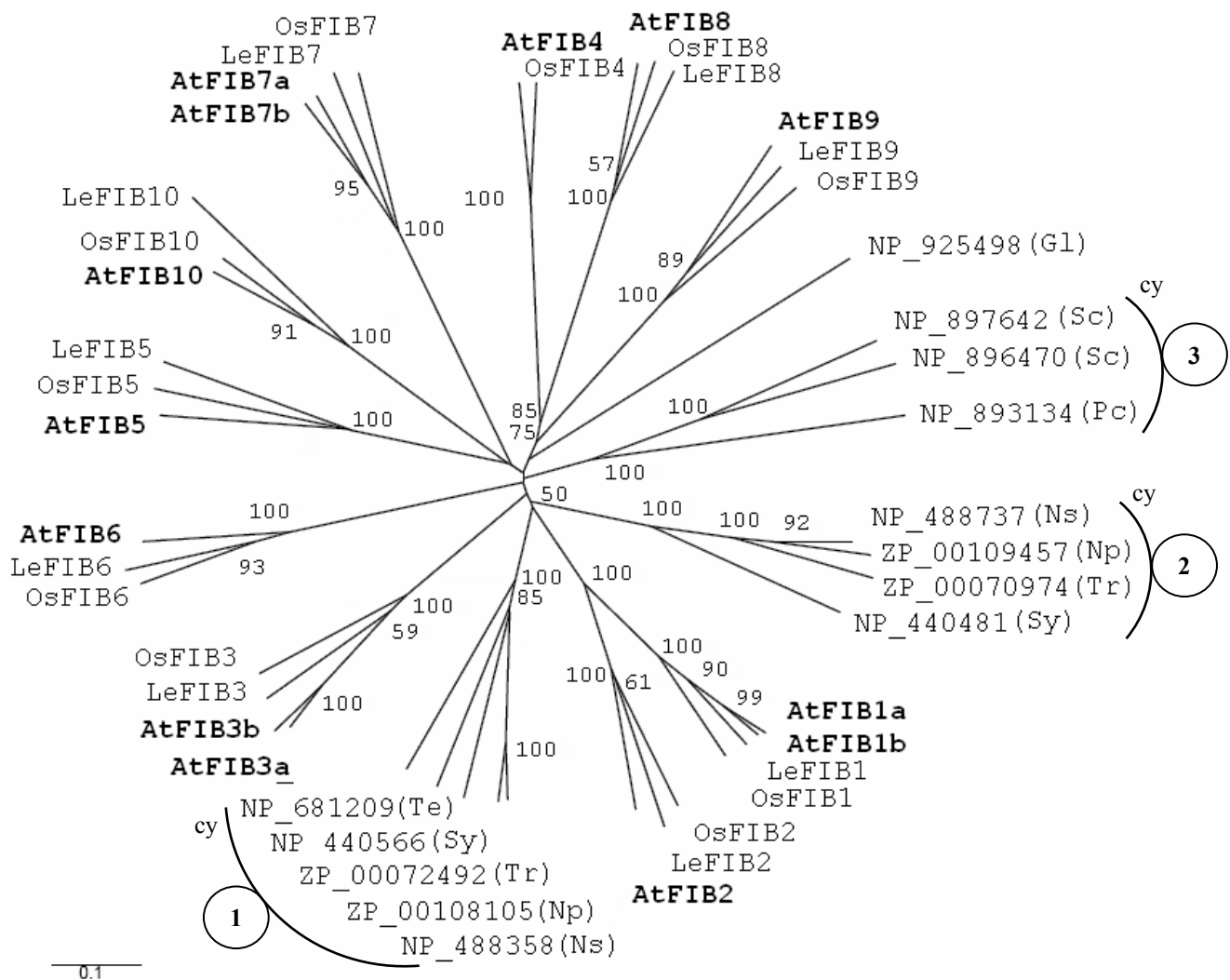
Les sites de clivage des peptides d'adressage putatifs ont été alignés (\*). Les acides aminés identiques sont colorés en noir et les similaires en gris. Les 3 blocs constituant la signature des protéines de type fibrilline sont indiqués dans la ligne consensus. Un motif court répété est souligné dans *AtFIB1a* et *AtFIB2*.

informatique avec les programmes ChloroP, TargetP, et Predotar, est prédite comme peptide d'adressage de la protéine vers le chloroplaste. La localisation subcellulaire a pu être confirmée pour 7 de ces protéines puisqu'on les retrouve dans le protéome de chloroplaste (Kleffmann *et al.* 2004), (Tableau 1). Plus précisément, 9 sur les 13 sont détectées dans le protéome de thylacoïde (Friso *et al.* 2004), mais aucune de ces protéines n'est présente dans le protéome de l'enveloppe (Ferro *et al.* 2003). Il faut ajouter qu'aucun des polypeptides fibrilline n'a été détecté dans le protéome mitochondrial (Heazlewood *et al.* 2004). La prédiction informatique de la localisation de FIB9 est plus ambiguë du fait qu'elle comporte un peptide de transit prédit de petite taille : 25 acides aminés, alors que les peptides de transit des autres fibrillines ont une taille avoisinant les 50 acides aminés. Cette taille n'est cependant pas rédhibitoire puisqu'il a été montré qu'un peptide de transit aussi court est tout à fait fonctionnel pour un ciblage vers le chloroplaste chez les plantes (Orea *et al.* 2001). Cette protéine est néanmoins absente des bases de données protéomiques de chloroplaste, d'enveloppe ou de thylacoïdes, de même que les protéines FIB5 et FIB8.

Le Tableau 1 regroupe également les caractéristiques physico-chimiques des 13 fibrillines d'*Arabidopsis thaliana*. Les fibrillines sont des petites protéines dont la masse moléculaire des polypeptides matures varie de 21 kDa pour FIB6 à 40 kDa pour FIB10. Les valeurs prédites ou déterminées des points isoélectriques (pI) des différentes fibrillines d'*Arabidopsis thaliana* montrent aussi une certaine diversité. On peut regrouper les protéines en trois classes selon leur pI : acide (FIB 1a, 1b, 2, 4, 5, 7, 8, 10), neutre (FIB 6, 9), ou basique (FIB 3a, 3b). Ces protéines diffèrent les unes des autres, ce qui reflète peut être la spécificité de fonction de chacune d'entre elle.

Malgré les disparités de caractéristiques des fibrillines, l'alignement des séquences polypeptidiques (Figure 6) montre qu'elles appartiennent toutes à une même famille de protéines qui comportent dans leur partie mature, trois blocs d'homologie définissant une signature spécifique de la famille fibrilline. Cependant, chez certains membres de la famille, la signature peut être partiellement altérée comme par exemple chez FIB7a, FIB7b et chez FIB10 où la signature du bloc 2 est incomplète.

La protéine FIB10 possède en plus une particularité : elle comporte en C-terminal, par rapport aux autres fibrillines, une extension dont la séquence est similaire au bloc 3 défini dans la figure 6, que l'on a nommée bloc 3'. Cette extension présente une forte caractéristique acide et son absence augmenterait le pI de FIB10 de 5,42 à 9,3 et par conséquent, ferait passer FIB10 de la classe des fibrillines « acides » à celle des fibrillines « basiques ». Les sites de



**Figure 7 : Arbre phylogénétique consensus des protéines FIB d'*Arabidopsis thaliana* (At), de riz (Os), de tomate (Le) et de différentes cyanobactéries (cy).**

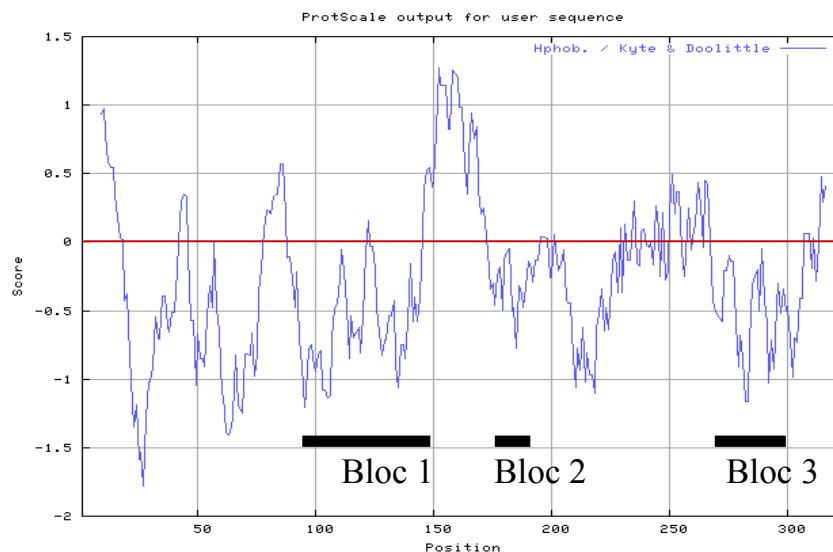
Arbre réalisé avec le logiciel ClustalX 1.83 (méthode Neighbour Joining de Saitou et Nei's. Les valeurs de bootstrap supérieures à 50% sont indiquées. L'arbre a été réalisé à partir de la partie commune de l'alignement des protéines FIB (178 acides aminés) obtenue en supprimant les gaps importants et les blocs très divergents. La barre représente une substitution de 0.1 acide aminé par site. ①, ②, ③ représentent trois sous-familles de protéines fibrillines chez les cyanobactéries.

Les N° d'accèsion et l'espèce pour les gènes de cyanobactéries sont les suivants : Gl : *Gloeobacter violaceus* (Nakamura *et al.* 2003), Ns : *Nostoc* sp. PCC 7120 (Kaneko *et al.* 2001), Np : *Nostoc punctiforme*, Pc : *Prochlorococcus marinus subsp. pastoralis* CCMP1986 (Rocap *et al.* 2003), Sy : *Synechocystis* PCC 6803 (Kaneko *et al.* 1996), Sc : *Synechococcus* sp. WH8102 (Palenik *et al.* 2003), Te : *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 (Nakamura *et al.* 2002) et Tr : *Trichodesmium erythraeum* (<http://genome.ornl.gov/microbial/tery/>).

Les N° d'accèsion des protéines FIB de tomate sont issues de la base de données d'ADNc TIGR (<http://www.tigr.org/>) : LeFIB1: TC116052, LeFIB2: TC124967+AW09494, LeFIB3: TC11292, LeFIB5: BI929643, LeFIB6 : TC118055, LeFIB7: TC119061, LeFIB8 : TC126867, LeFIB9: TC130337, LeFIB10: AW617522. Note : LeFIB4 (BG626357) n'a pas été inclus dans l'arbre car sa séquence est très incomplète.

clivage des peptides de transit de chacune des fibrillines ont été alignés et sont signalés par un astérisque (Figure 6). Dans le cas de FIB 1a et 1b, le site de clivage a pu être confirmé par alignement avec la séquence de la fibrilline de poivron dont la séquence est très proche, et dont on connaît exactement le site de clivage. Ce dernier est en général directement suivi par une série d'acides aminés chargés négativement, ce que l'on peut observer ici sauf pour les fibrillines 3a, 3b et 9 où le site de clivage est donc moins consensuel.

Nous avons ensuite comparé les séquences des fibrillines que l'on peut retrouver au sein des génomes des plantes et des cyanobactéries entièrement séquencés et celles de banque d'EST de tomate, séquences que nous avons obtenues par la même méthode qui nous a permis d'isoler les 13 gènes *FIB* d'*Arabidopsis thaliana* (début du § 1.1). La figure 7 présente un arbre phylogénétique comportant les fibrillines d'*Arabidopsis thaliana*, de tomate, de riz et de cyanobactéries. Les fibrillines d'*Arabidopsis thaliana* 1a,b,2 ; 3a,b ; 7a,b forment respectivement, trois sous-familles, tandis que les autres fibrillines sont tout aussi éloignées de ces trois sous-familles que les unes des autres. Ceci même pour FIB6 et FIB9 qui montraient des masses moléculaires et des pI similaires et qui ne sont pourtant pas regroupées dans cet arbre.



**Figure 8 : Profil d'hydrophobicité de la protéine AtFIB1a (Kyte & Doolittle).**

Une fenêtre de 17 acides aminés a été utilisée pour le calcul. Les blocs conservés décrits dans la figure 5 sont indiqués (■).

| Arabidopsis | Riz (O.sativa cv. japonica) |         | Synechocystis PCC6803 |         | Nostoc PCC7120 |         | Nostoc Punctiforme |         | Trichodesmium erythraeum |         | T.elongatus  |         |
|-------------|-----------------------------|---------|-----------------------|---------|----------------|---------|--------------------|---------|--------------------------|---------|--------------|---------|
| Nom         | N° Accession                | E-value | N° Accession          | E-value | N° Accession   | E-value | N° Accession       | E-value | N° Accession             | E-value | N° Accession | E-value |
| FIB1        | AAO72593                    | 2 e-84  | NP_440566             | 6 e-21  | NP_488358      | 2 e-22  | ZP_00108105        | 4 e-90  | ZP_00072492              | 4 e-21  | NP_681209    | 6 e-19  |
| FIB2        | AAL67595                    | 5 e-76  |                       |         |                |         |                    |         |                          |         |              |         |
| FIB3        | AAS07245                    | 1 e-55  |                       |         |                |         |                    |         |                          |         |              |         |
| FIB4        | AK106159 (mRNA)             | 9 e-67  |                       |         |                |         |                    |         |                          |         |              |         |
| FIB5        | CAE04639                    | 8 e-58  |                       |         |                |         |                    |         |                          |         |              |         |
| FIB6        | CAE02133                    | 4 e-57  |                       |         |                |         |                    |         |                          |         |              |         |
| FIB7        | AAO72625                    | 2 e-79  |                       |         |                |         |                    |         |                          |         |              |         |
| FIB8        | AE017111 (gDNA)             | 1 e-86  |                       |         |                |         |                    |         |                          |         |              |         |
| FIB9        | CAE01685                    | 4 e-56  |                       |         |                |         |                    |         |                          |         |              |         |
| FIB10       | BAC06949                    | 9 e-98  |                       |         |                |         |                    |         |                          |         |              |         |

**Tableau 2 : Orthologues des gènes *fibrillines* d'*Arabidopsis thaliana* chez le riz et chez différentes cyanobactéries.**

Les N° d'accension des ARNm ou de l'ADNg sont donnés lorsque celui des protéines n'est pas disponible. Pour FIB8, il faut joindre les segments 1449–1809, 1915–2057, 2396–2493, 3362–3444, 3954–4042, 4356–4413, 4486–4595. Les E-values sont obtenues par blast en utilisant le polypeptide mature correspondant d'*Arabidopsis thaliana*. Les références des génomes de cyanobactéries sont données dans la figure 7. Pour le riz : <http://rgp.dna.affrc.go.jp/IRGSP/>.

La disparité des caractéristiques des fibrillines se retrouve également lorsque l'on étudie des le profil d'hydrophobicité des protéines. Par exemple, FIB 1a, 1b et 2 ont une région hydrophobe entre les blocs d'homologie 1 et 2, qui pourrait définir le site d'ancrage de la protéine à la membrane (Figure 8). Cependant, les autres fibrillines montrent des profils différents, avec une région plutôt hydrophobe entre les bloc 2 et 3 ou chevauchant le bloc 3 (FIB 3a, 3b, 6 et 10), ou de multiples régions hydrophobes (FIB 4, 5, 7a, 7b, 9 et 10). Ceci conforte le fait que l'on ne retrouve pas, dans les séquences des fibrillines, de motif conservé qui formerait une hélice transmembranaire capable de s'insérer dans un environnement hydrophobe comme une bicouche lipidique (Tzen et Huang 1992, Murphy 1993).

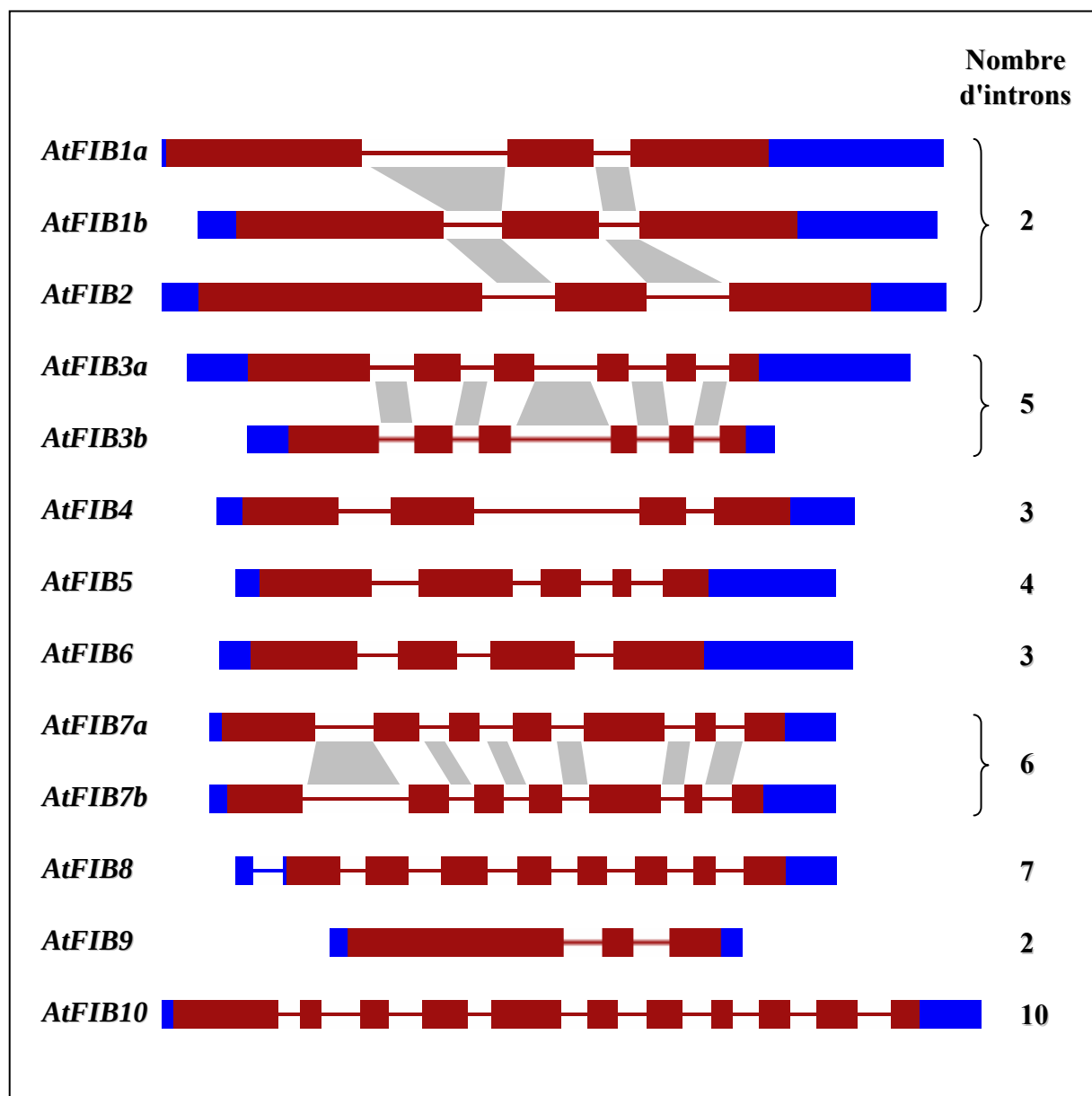
## **1.2 LES GÈNES FIBRILLINES CHEZ D'AUTRES ORGANISMES**

Nous avons décrit dans le paragraphe précédent la présence de 13 gènes *FIB* chez *Arabidopsis thaliana*, parmi lesquels on peut distinguer trois sous-familles selon leurs caractéristiques. Nous savons que chez les plantes, de un à trois gènes *FIB* ont pu être caractérisés dans un même organisme (Introduction § 4.2). Nous avons donc recherché l'existence d'autres gènes de type fibrilline chez les plantes et d'autres organismes photosynthétiques, en nous basant sur les 13 séquences isolées chez *Arabidopsis thaliana*.

### **1.2.1 Chez les plantes**

L'accès récent au génome complet du riz (Goff *et al.* 2002, Yu *et al.* 2002) nous a permis de comparer la présence des différents gènes *FIB* chez cette monocotylédone par rapport à *Arabidopsis thaliana* qui est une dicotylédone (Tableau 2, Figure 7). Ceci nous permet d'apprécier la conservation de cette famille de gènes au sein du règne végétal. Dans le génome du riz, on ne retrouve finalement que 10 gènes fibrilline correspondant chacun à un orthologue d'*Arabidopsis thaliana*. Ceci suggère que les 10 gènes *FIB* que l'on retrouve chez le riz sont apparus avant la séparation mono-dicotylédone.

Les trois gènes supplémentaires d'*Arabidopsis thaliana* (absents chez le riz) proviendraient tous trois de duplications récentes dans le génome : sur le chromosome 4, ce qui a donné les paralogues FIB1a et FIB1b, sur le chromosome 3 donnant naissance aux paralogues FIB3a et FIB3b, enfin entre les chromosomes 2 et 3 pour donner les paralogues FIB7a et FIB7b. D'ailleurs, les deux duplications 1a-1b, 7a-7b sont positionnées dans des zones de duplications de portions de chromosomes au sein du génome d'*Arabidopsis thaliana* (<http://wolfe.gen.tcd.ie/athal/dup>). La même conclusion peut être tirée de l'analyse de la



**Figure 9 :** Schéma de la structure exons/introns des gènes fibrillines d'*Arabidopsis thaliana*.

■ : Régions non transcrites 5'UTR et 3' UTR ; ■ : exons ; — : introns.

structure exons/introns des différents gènes fibrillines chez *Arabidopsis thaliana* (Figure 9). En effet, *FIB 1a*, *1b* et *2* comportent chacun deux introns à des positions identiques (comme pour le gène de la fibrilline de poivron dont ils sont les orthologues les plus proches). De même, *FIB 7a* et *7b* possèdent six introns placés de façon identiques et *FIB 3a* et *3b* ont également un même schéma exons/introns. Le cas de *FIB 3a* et *3b* sera plus amplement décrit dans le paragraphe 1.4. Par contre, les autres gènes *FIB* présentent des structures exons/introns différentes dont le nombre d'introns varie de 2 pour *FIB9*, à 10 pour *FIB10*. Les gènes fibrillines du riz présentent une structure exon/intron identique à celle de leurs homologues chez *Arabidopsis thaliana*, ce qui montre la bonne conservation de ces gènes au cours de l'évolution.

Chez la tomate, qui est une autre dicotylédone, nous avons pu identifier dans les banques d'EST jusqu'à présent, uniquement 10 orthologues de fibrillines correspondant aux 10 gènes *FIB* que l'on retrouve chez le riz. Cependant, nous n'écarterons pas qu'il puisse exister dans le génome de cette plante d'autres gènes *FIB*.

### 1.2.2 Chez les algues

Le génome séquencé de l'algue rouge *Cyanidioschyzon merolae* (Matsuzaki *et al.* 2004) contient quatre gènes *FIB*, dont les plus proches parents chez les plantes sont *FIB1a*, *FIB3a*, *FIB5* et *FIB9* qui montrent dans l'ordre des similarités de 42%, 62%, 51% et 38% avec leur homologue respectif (<http://merolae.biol.s.u-tokyo.ac.jp>; loci CMS090C, CMP332C, CMK306C et CMT081C). Nous avons également pu mettre en évidence à ce jour la présence de 8 orthologues de la fibrilline dans le génome entièrement séquencé de l'algue *Chlamydomonas* (Blast sur [www.chlamy.org](http://www.chlamy.org)). Ceci montre que la multiplication des gènes *FIB* a commencé très tôt au cours de l'évolution du règne végétal, c'est-à-dire avant la séparation avec les algues.

### 1.2.3 Chez les cyanobactéries

Puisque la quasi-totalité des protéines *FIB* est localisée dans le plaste, il est intéressant d'étudier l'origine possible des gènes *FIB* chez les cyanobactéries, ces dernières étant à l'origine des plastes selon la théorie endosymbiotique. Des gènes similaires à la fibrilline ont été trouvés dans les génomes de cyanobactéries séquencés, mais pas dans d'autres groupes de bactéries. Ainsi, des gènes montrant l'homologie la plus importante avec *FIB1a* et *FIB1b* (Tableau 2) sont retrouvés chez les  $\beta$ -cyanobactéries caractérisées par une rubisco (ribulose-1-

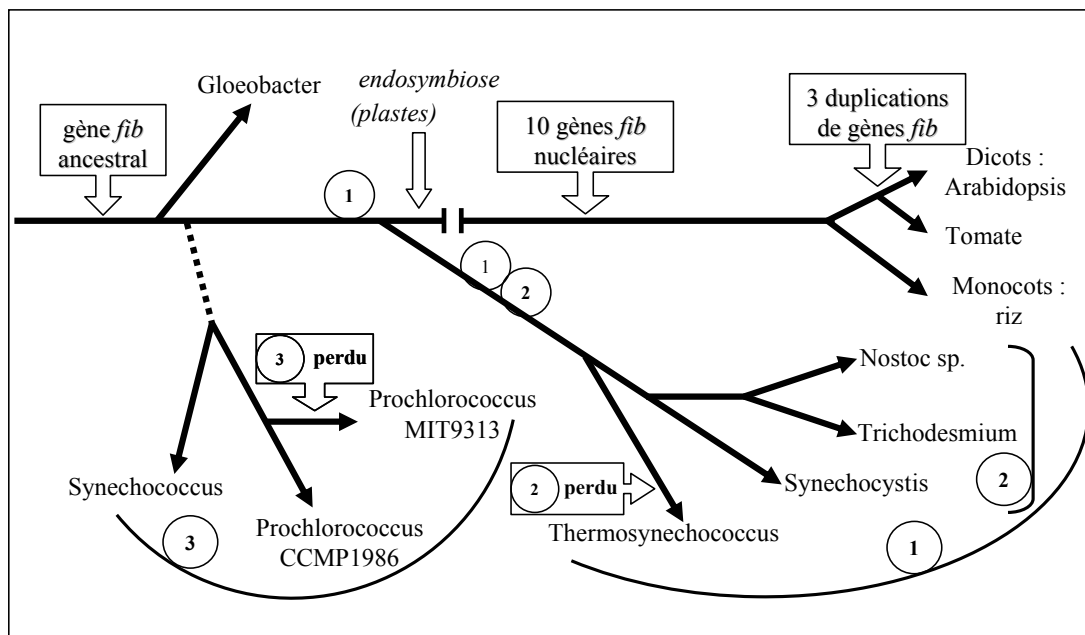
5-biphosphate carboxylase oxygénase) de type 1B : *Nostoc* PCC7120 et *Nostoc punctiforme*, *Trichodesmium erythraeum* (cyanobactérie marine), *Synechocystis* PCC6803 et *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 (cyanobactérie thermophile). Ces gènes forment la sous-famille 1 (Figure 7). Une seconde sous-famille apparentée aux fibrillines est aussi présente chez ces cyanobactéries, excepté chez *T. elongatus*. Cependant les membres de cette sous-famille 2 n'ont pas d'orthologue précis chez *Arabidopsis thaliana*, en effet les scores de similarité sont relativement faibles et du même ordre de grandeur vis-à-vis de l'ensemble des fibrillines d'*Arabidopsis thaliana*. C'est également le cas chez une troisième sous-famille que l'on retrouve chez les  $\alpha$ -cyanobactéries marine (Rubisco de type 1A) : *Synechococcus* sp. WH8102 (deux gènes) et prochlorophyte *Prochlorococcus marinus* subsp. *Pastoralis* CCMP1986 (aussi appelé MED4), (Figure 7).

Par contre, aucun gène apparenté à la fibrilline n'a pu être détecté dans les génomes complètement séquencés de deux autres prochlorophytes *P. marinus* str. MIT 9313 (Rocap *et al.* 2003) et *P. marinus* subsp. *marinus* str. CCMP1375 (aussi appelé souche SS120 ; (Dufresne *et al.* 2003)). Il est intéressant de noter que ces deux dernières prochlorophytes sont des souches adaptées à des conditions de lumière faible alors que la souche CCMP1986, qui comporte un gène de la sous-famille 3, est adaptée à des conditions de lumière forte. Chez *Synechococcus* sp. WH8102, le trait physiologique « le plus remarquable » est sa motilité (chimiotactisme), caractéristique importante pour l'apport en nutriments mais qui implique aussi que l'organisme est susceptible d'être soumis à des luminosités variables.

Parmi les cyanobactéries qui possèdent un gène apparenté à la fibrilline, *Gloeobacter violaceus* se distingue des autres car elle ne comporte pas de thylacoïdes, mais des complexes PSI et PSII localisés au niveau de la membrane plasmique. Elle est aussi très sensible à la lumière. De façon intéressante, ce gène est relativement éloigné des autres sous-familles de gènes *FIB* de cyanobactérie, ce qui n'est pas très surprenant puisqu'au cours de l'évolution, *G. violaceus* a divergé très tôt des autres cyanobactéries (avant l'endosymbiose qui a mené à la formation des plastes (Nelissen *et al.* 1995)). L'ensemble de ces résultats suggère donc qu'au moins un polypeptide de type fibrilline est présent chez la plupart des cyanobactéries lorsque cette espèce ou souche est soumise occasionnellement à un stress lumineux.

Une relation phylogénétique entre la sous-famille 1 des cyanobactéries et les FIB1,2 de plantes peut être proposée à la vue de la figure 7, ceci en accord avec les scores d'homologie du tableau 2. Cependant, une relation entre la sous-famille 1 des cyanobactéries et les FIB3 de plantes ne peut pas être exclue. Sur la base des arbres d'évolution des cyanobactéries (Rocap

*et al.* 2003, Nelissen *et al.* 1995, Badger et Price 2003) et des points discutés précédemment, nous proposons un schéma d'évolution des gènes *FIB* présenté en Figure 10. Il suppose qu'un gène ancestral de la fibrilline a donné naissance (avant l'endosymbiose qui a mené à la formation des plastes) à l'ancêtre de la sous-famille 1 des cyanobactéries, dont les descendants directs sont probablement les gènes des plantes *FIB1,2* (ou *FIB3*). Les autres gènes de type fibrilline que l'on retrouve chez les plantes ont dû dériver de cette sous-famille *FIB1,2* (ou *FIB3*) à un stade précoce de l'évolution des plantes. Il semble moins vraisemblable que les 10 gènes *FIB* communs aux plantes supérieures descendent chacun directement d'un gène de cyanobactérie puisque que l'on ne retrouve pas une telle multiplicité de gènes chez les bactéries. La sous-famille cyanobactérienne 2 peut dériver de la sous-famille 1. Le fait que cet événement soit arrivé avant ou après l'endosymbiose ne peut pas être déterminé avec certitude. La perte de cette sous-famille chez *T. elongatus* semble être un événement plus récent. Nous proposons alors une origine ancienne de la sous-famille 3 et une perte de ces gènes chez les  $\alpha$ -cyanobactéries marines adaptées aux conditions de faible lumière.



**Figure 10 :** Apparition du gène *FIB* et de ses sous-familles au cours de l'évolution du plaste et des cyanobactéries.

Le schéma prend en compte les données de la figure 7 (Nelissen *et al.* (1995), Badger et Price 2003), mais les distances évolutives ne sont pas respectées. Se référer à la Figure 7 pour les noms complets des souches des cyanobactéries, les N° d'accèsion, et la définition des sous-familles cyanobactériennes ①, ②, ③ des gènes fibrilline. L'apparition ou la perte de gènes est encadrée. Le branchement de la sous-famille ③ est spéculatif.

### 1.3 LA SOUS-FAMILLE FIB1,2 DES PLANTES

Tous les polypeptides de type fibrilline caractérisés jusqu'à maintenant chez les plantes, que ce soit en condition de stress ou au sein d'un organe, d'un tissu ou d'une structure subcellulaire en particulier, appartiennent tous à la sous-famille FIB1,2 d'*Arabidopsis thaliana*. Cependant, déterminer si ces peptides se rapprochent de FIB1a, FIB1b, ou plutôt de FIB2 nécessite encore quelques éclaircissements. L'homologue de la fibrilline, retrouvé dans les plastoglobules de feuilles de pois *Pisum sativum* (PG-1; accession no. AF043905; (Kessler *et al.* 1999) est, lui, plus proche de FIB2 (Tableau 3). Chez les *Brassicaceae*, famille à laquelle *Arabidopsis thaliana* appartient, la classification est tout à fait claire, un orthologue de la fibrilline, présent dans les élaïoplastes des cellules du tapis chez *Brassica rapa* (BCP32; AF084554; (Ting *et al.* 1998) est plus proche de FIB1a. Cependant, un orthologue de chaque membre de la sous-famille FIB1,2 est présent chez cette espèce, respectivement PAP1 (T01472) pour AtFIB1a, PAP2 (T04905) pour AtFIB1b, PAP3 (AAC3672) pour AtFIB2; (Kim *et al.* 2001). Il semble beaucoup plus difficile de désigner laquelle des protéines FIB1a ou FIB1b est la plus proche d'une protéine de type fibrilline d'autres espèces relativement éloignées. On retrouve des similarité de séquence à FIB1a ou FIB1b importants et de même ordre de grandeur (Tableau 3) pour des polypeptides de la fibrilline de poivron *C. annuum* (X71952; (Deruere *et al.* 1994b, Chen *et al.* 1998), de CDSP34 de pomme de terre *Solanum tuberosum* (T07825; (Pruvot *et al.* 1996a) et de CHRC du concombre *Cucumis sativus* (X95593; (Smirra *et al.* 1993). L'homologue CitPAP que l'on retrouve dans différents organes chez *Citrus unshiu* (AB011797; (Moriguchi *et al.* 1998) est, quant à lui, plus proche de FIB1b que de FIB1a.

| Similarité (%) | AtFIB1a     | AtFIB1b     | AtFIB2      |
|----------------|-------------|-------------|-------------|
| FIB poivron    | <b>72,0</b> | 70,3        | 46,3        |
| CDSP34         | <b>74,5</b> | 73,4        | 47,9        |
| CitPAP         | 71,6        | <b>73,9</b> | 46,0        |
| CHRC           | <b>71,6</b> | 71,4        | 45,0        |
| PAP1           | <b>84,0</b> | 77,6        | 46,1        |
| PAP2           | 80,8        | <b>86,6</b> | 45,8        |
| PAP3           | 49,6        | 47,7        | <b>84,4</b> |
| PG1            | 51,5        | 49,7        | <b>65,5</b> |

**Tableau 3 :** Taux de similarité entre les protéines FIB de plantes et les protéines de la sous-famille 1-2 d'*Arabidopsis thaliana*.

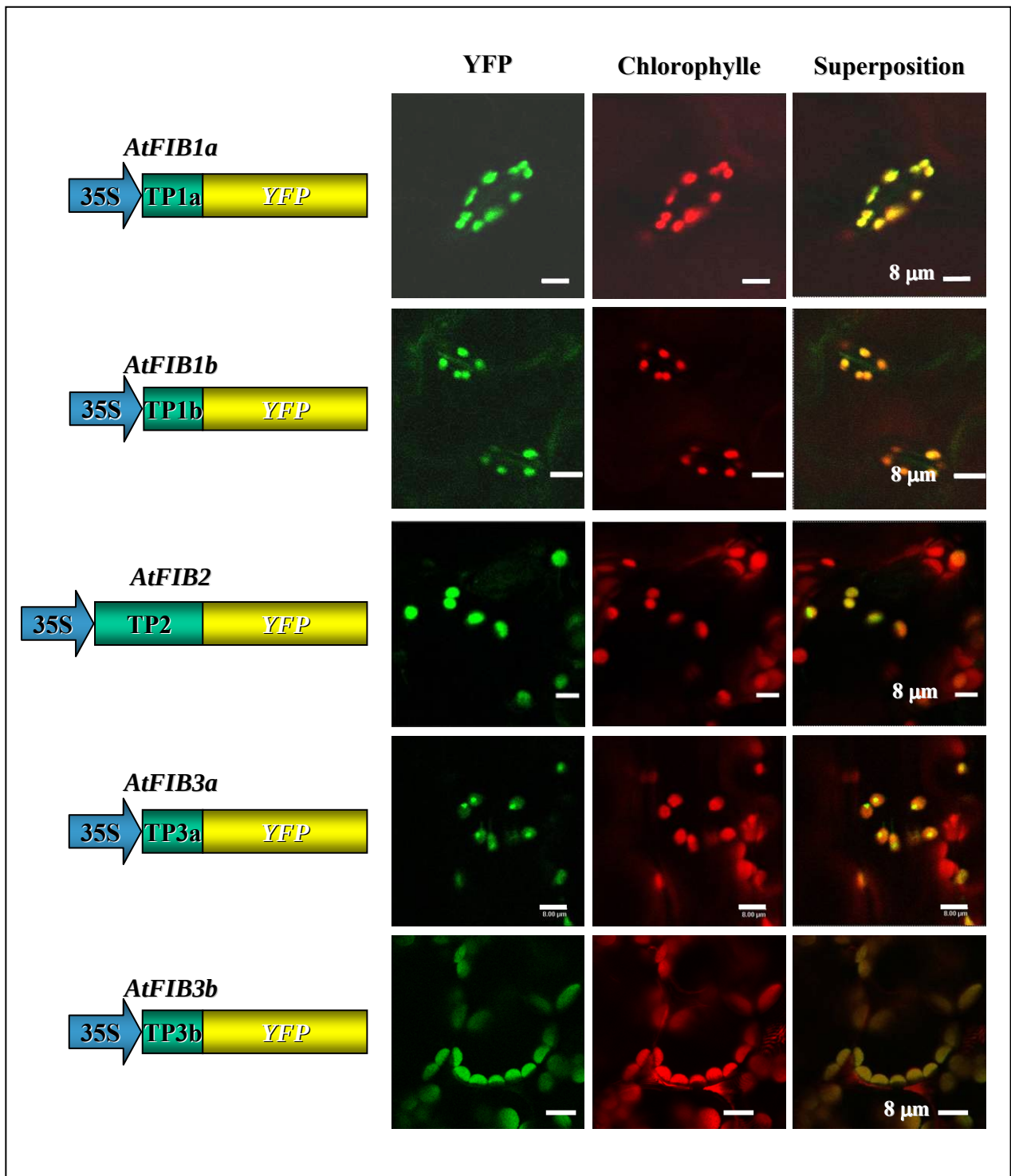
Cependant, plutôt que de comparer les séquences complètes, on peut s'intéresser à la partie N-terminale des polypeptides matures dans laquelle on retrouve un motif court DEWG permettant une discrimination. En effet, ce motif est présent en une seule copie (ou deux chez *Brassica rapa*) chez FIB1a d'*Arabidopsis thaliana* (Figure 6), de même que dans tous les autres orthologues FIB1a,b des plantes mentionnés précédemment, y compris le riz (Figure 11). Par contre, ce motif est absent de FIB1b d'*Arabidopsis thaliana*, de *Brassica rapa* ou même des fibrillines de cyanobactéries. Chez les FIB2, membre de la sous-famille 1-2, on retrouve plusieurs répétitions de ce motif (Figure 11) : 4 chez le riz, 3 chez *Arabidopsis thaliana*, 2 chez *B. rapa* (un 3<sup>ème</sup> motif incomplet est présent) et *P. sativum*. La conservation de ce motif suggère un rôle spécifique chez les plantes, rôle qui serait rempli par FIB1a et FIB2, mais pas par FIB1b.

|           | 60                                                                              | 70                                                             | 80                                                                 | 90   | 100                                                   | 110                                | 120  |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|------|-------------------------------------------------------|------------------------------------|------|
|           | .... .... .... .... .... .... .... .... .... .... .... .... .... .... .... .... |                                                                |                                                                    |      |                                                       |                                    |      |
| Ca FIB    | NPKPKFTAQATNYDKE                                                                | DEWG                                                           | PELEQINPGGVAVVEEPPKEPSEMEKLKKQLTDSFYGTNRGLSASSETRAEIVELITQL        |      |                                                       |                                    |      |
| St CDSP34 | KEFTNPKPKFTAQATNYDKE                                                            | DEWG                                                           | PEVEQIRPGGVAVVEEPPKEPSEIELLKKQLADSLYGTNRGLSASSETRAEIVEL            |      |                                                       |                                    |      |
| Cs CHRC   | VRPAFKVRAVLND                                                                   | DEWG                                                           | EDKDEKYGDDSSVAVAEKEEKPSEIYKLLKALVDSFYGTDRGLRVSRDTRAEIVELITQ        |      |                                                       |                                    |      |
| Le FIB1   | KEFTYKPKPKFTAQATNYDKE                                                           | DEWG                                                           | PEVEKISPGGVAVVDEEPPKEPSEIELLKKQLADSLYGTNRGLSASSETRAEIVEL           |      |                                                       |                                    |      |
| Cu CitPAP | QGFTRARPLVLTRAADD                                                               | DEWG                                                           | PEKEKEGGGALAVAEESPKVEIDNLKKALVDSFYGTDRGLNATSETRAEIVELITQ           |      |                                                       |                                    |      |
| Os FIB1   | LTARAVAGDAE                                                                     | DEWG                                                           | KEPAADQGGAAGAAVAEAPADVPVTSEVAELKAKLKEALYGTGERGLRASSETRAEVELITQLEAR |      |                                                       |                                    |      |
| Br PAP1   | VRASDVND                                                                        | DEWG                                                           | PDSKGRGGVD                                                         | DEWG | PEIGLNSSVAEKVAEEAIESAEETERLKRVLGSLYGTDRGLSASSETRAEISE |                                    |      |
| At FIB1a  | DFKIRATDID                                                                      | DEWG                                                           | QDGVVERVFASSSTVSADKAIESVEETERLKRSLADSLYGTDRGLSVSSDTRAEISELITQLESKN |      |                                                       |                                    |      |
| Br PAP2   | VSRSDFRVRVIDAEDEL                                                               | PETSEGGGSALLMAEEAIESVEETEVLKRSLVDSLYGTDRGLSASSETRAEIGDLITQLESK |                                                                    |      |                                                       |                                    |      |
| At FIB1b  | SPRRVFKVRATDTGEIGSALLAAEEAIEDVEETERLKRSLVDSLYGTDRGLSASSETRAEIGDLITQLESKNPTAPTEA |                                                                |                                                                    |      |                                                       |                                    |      |
| Ps PG1    | TGDAEKPSNIS                                                                     | DEWG                                                           | EGSEPETKPFYFKLPDSDPPKDE                                            | DEWG | KGAAAGAGSYNDAGNGTPTFAAEASPEAAEDGVDE                   |                                    |      |
| Os FIB2   | SGVP                                                                            | DEWG                                                           | DRSPSAPEPPSQDPPI                                                   | DD   | DEWG                                                  | RDDPSASGNSRPVLVT                   | DEWG |
| Le FIB2   | EPEKPTSITPDNDKADDMVEFV                                                          | DEWG                                                           | EKSEPEPGVTKLADSDPPEYD                                              | DEWG | NGSPGVDVSGEEDKLLELKRCLVDTV                            |                                    |      |
| Br PAP3   | IRSSLPSESDSEPEGGSIT                                                             | DEWG                                                           | EQPAEPESPPDNAPS                                                    | SAV  | DEWG                                                  | EKSESVPEESVTRFAESDPPTNEDEWEEREADDG |      |
| At FIB2   | KIRSSLPSESESDLDASAVT                                                            | DEWG                                                           | EKPGDANEPDSQPDNVTVNVIT                                             | DEWG | EKSGPELEESGTRFMESDPPRNEDEWG                           |                                    |      |

**Figure 11 : Présence d'une répétition du motif protéique DEWG dans des protéines fibrillines de différentes plantes.**

Un segment (acides aminés 51 à 130) des précurseurs des protéines de type FIB 1-2 chez différentes plantes est présenté et le motif répété DEWG est surligné en noir lorsqu'il est présent. Ca : *Capsicum annuum*, St : *Solanum tuberosum*, Cs : *Cucumis sativus*, Le : *Lycopersicon esculentum*, Cu : *Citrus unshiu*, Os : *Oryza sativa*, Br : *Brassica rapa*, At : *Arabidopsis thaliana*, Ps : *Pisum sativum*.

Nous avons voulu vérifier que le peptide de transit putatif de certaines fibrillines est bien capable de cibler *in vivo* une protéine vers le chloroplaste. Pour cela, nous avons utilisé une approche de biologie cellulaire par microscopie à fluorescence. Nous avons exprimé de façon stable une séquence peptidique un peu plus longue que le peptide de transit prédit (Matériel et



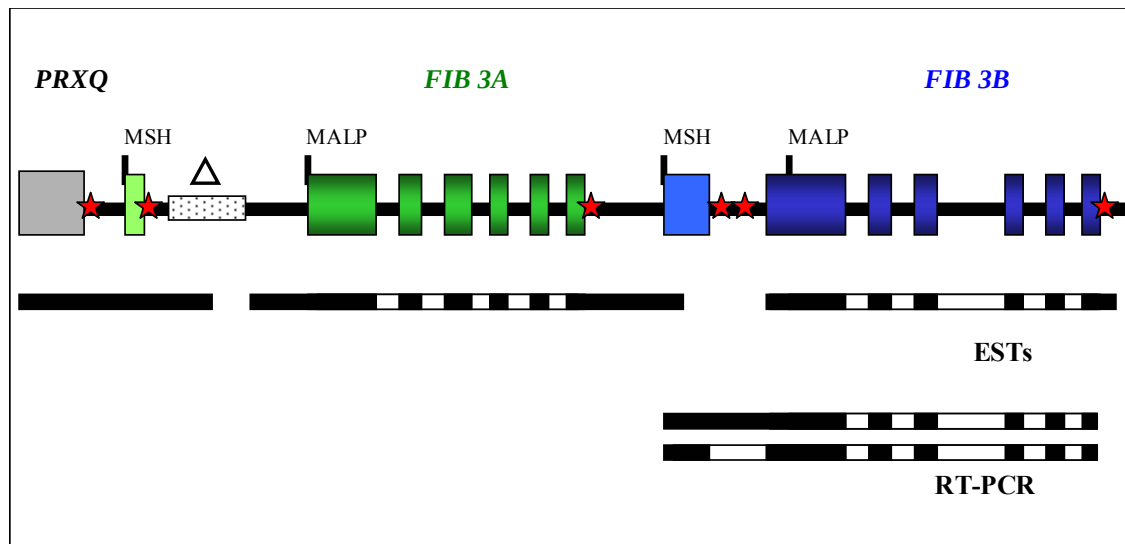
**Figure 12 : Localisation subcellulaire de polypeptides FIB d'*Arabidopsis thaliana*.**

Observations au microscope confocal de la fluorescence de la YFP dans des feuilles d'*Arabidopsis thaliana* transformées avec la construction d'une fusion traductionnelle du peptide d'adressage (TP) de fibrillines d'*Arabidopsis thaliana* avec la YFP. La barre représente 8 $\mu$ m.

Méthodes § 3.4), ceci pour les fibrillines 1a, 1b, 2, 3a et 3b, en fusion traductionnelle avec la protéine fluorescente YFP dans des plants d'*Arabidopsis thaliana*. Les photos de la figure 12 présentent la fluorescence de la YFP et l'autofluorescence de la chlorophylle pour les 5 gènes *FIB* analysés ici. Comme on peut l'observer sur les photos de la superposition des deux types de fluorescence, il y a colocalisation de la fluorescence de la YFP (en vert) avec la fluorescence naturelle de la chlorophylle (en rouge) au niveau des chloroplastes. Les peptides de transit des protéines *FIB* 1a, 1b, 2, 3a et 3b sont donc bien capables d'effectuer un ciblage vers le chloroplaste.

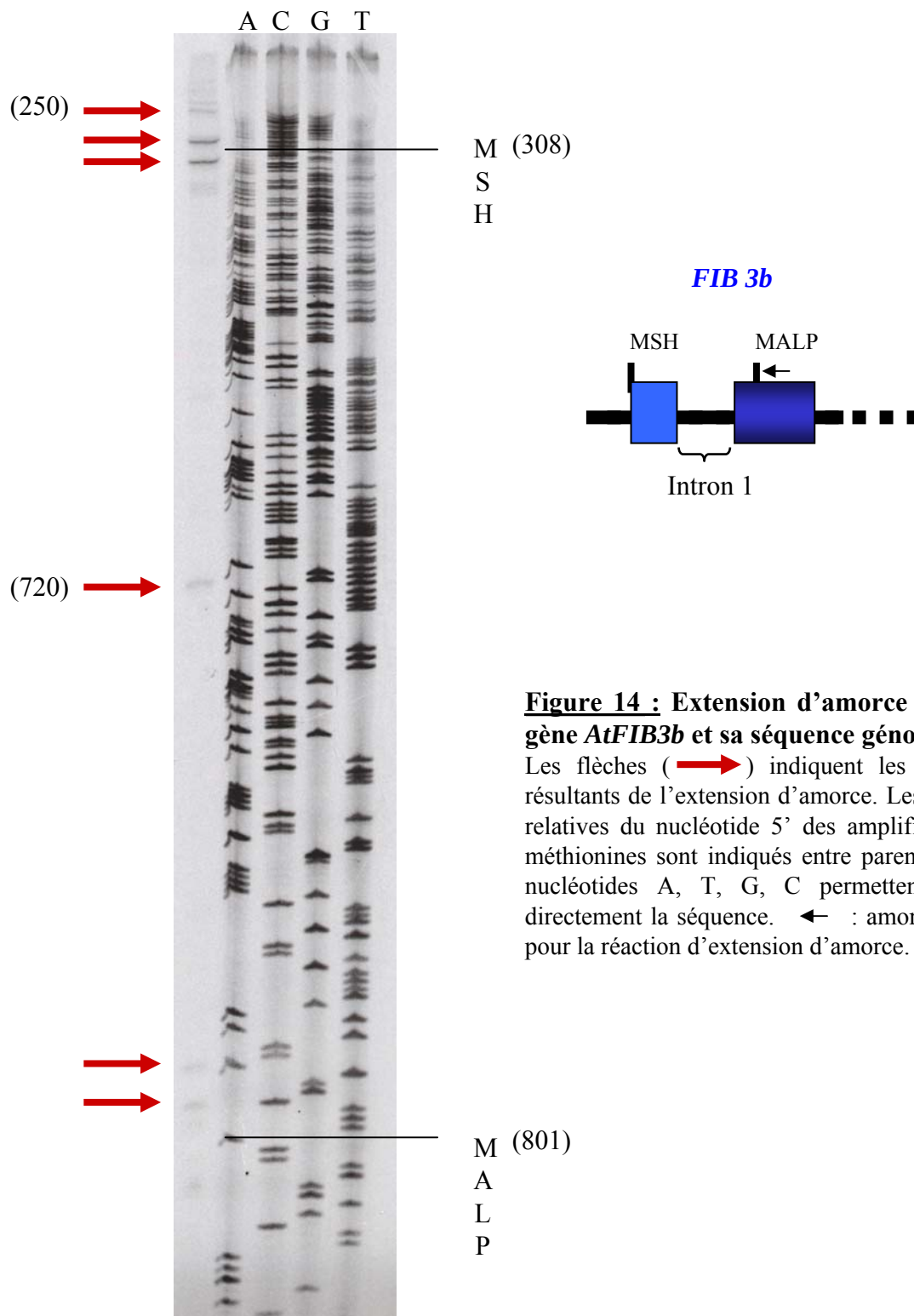
#### 1.4 LA SOUS-FAMILLE *FIB3A,3B* D'*ARABIDOPSIS THALIANA*

Nous n'avons pu trouver dans le génome du riz ou les banques d'EST de tomate que 10 gènes de type fibrilline, alors que chez *Arabidopsis thaliana* nous en avons trouvé 13. Il est donc probable que les 3 gènes supplémentaires d'*Arabidopsis thaliana* sont issus de duplications tardives (§ 1.2.1). En effet, *FIB3a* et *FIB3b* sont positionnés en tandem sur le chromosome 3. Les séquences alignées dans la figure 6 (commençant par MALP... en N-terminal) correspondent aux ADNc les plus longs que l'on trouve dans les bases de données. Cependant, nous avons pu amplifier par RT-PCR un ADNc de *FIB3b* qui peut coder un polypeptide plus long qui commencerait par MSH... (Figure 13).

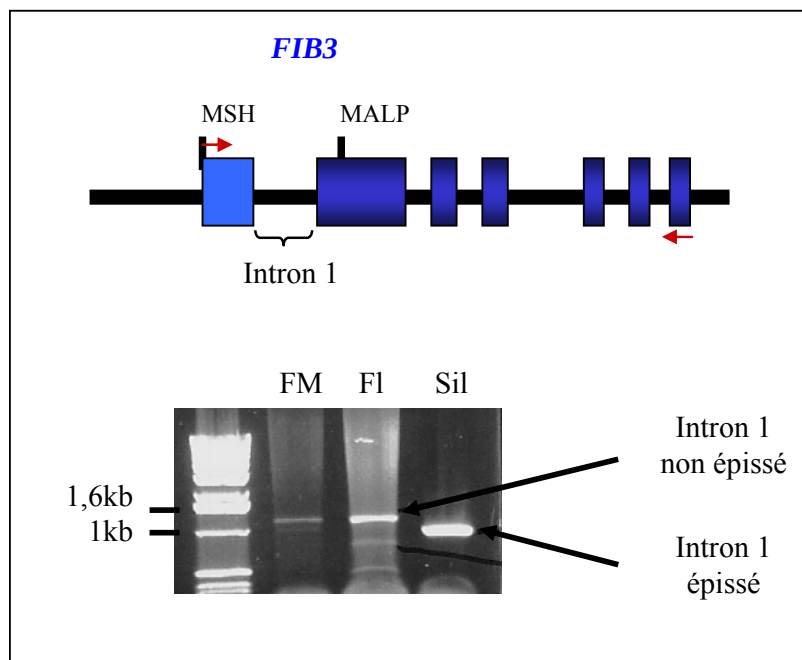


**Figure 13 :** Schéma de l'organisation des gènes *AtFIB 3a, 3b* et du gène amont *PRXQ* sur la séquence génomique du chromosome 3 d'*Arabidopsis thaliana*.

Les ESTs disponibles dans les banques et les fragments amplifiés par RT-PCR sont alignés. Les introns épissés (absents des ESTs et des fragments PCR) sont notés en blanc. Les codons d'initiation putatifs sont indiqués (MSH..., MALP...). Les codons stop sont symbolisés par des étoiles. Une insertion en amont de la séquence de *FIB3a* (AB023041, position 67267-67553) similaire à un segment du promoteur de *PRXQ* (AB023041, position 65208-65524) est schématisée (Δ).



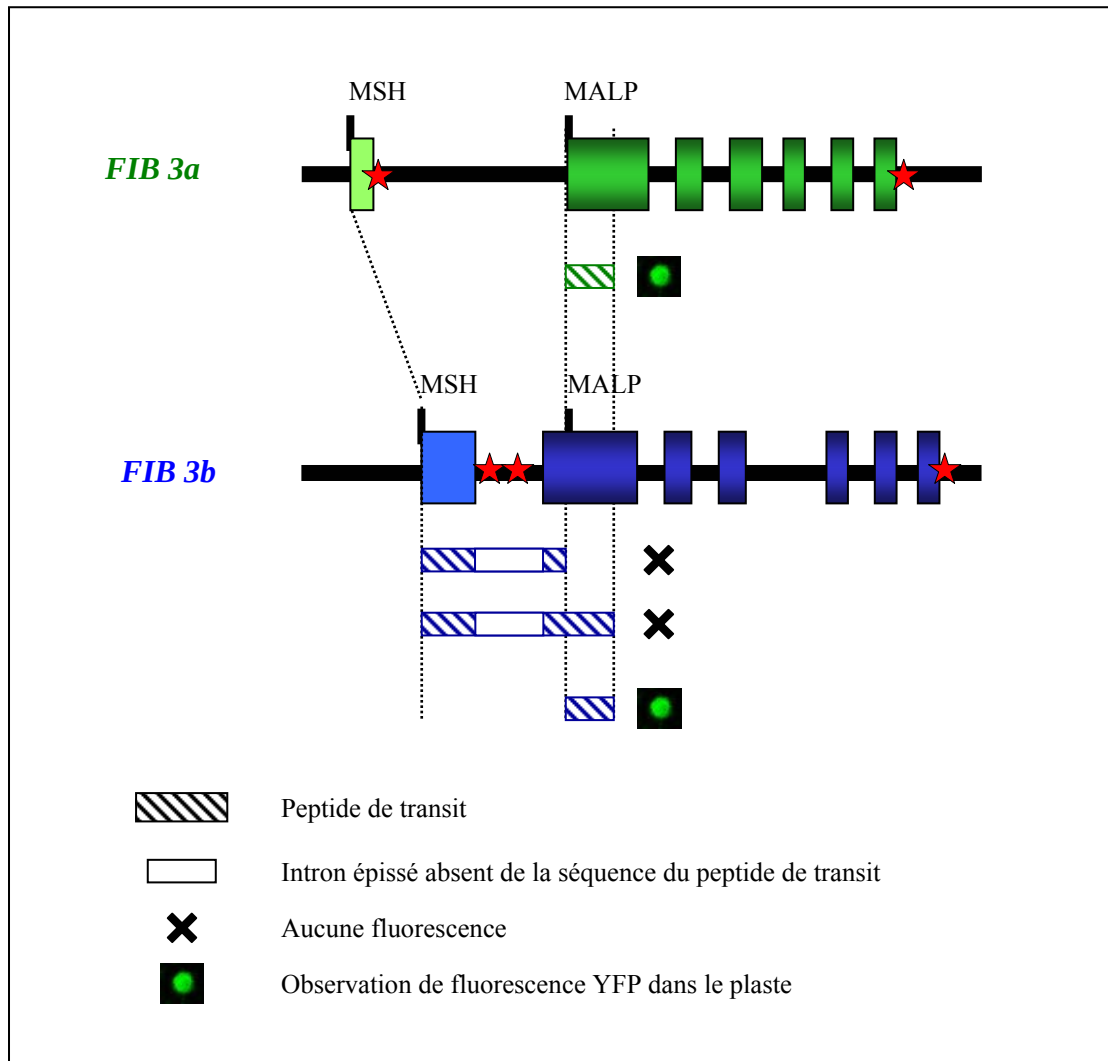
L'utilisation de ce codon d'initiation alternatif en amont produit un précurseur qui nécessite l'épissage d'un intron supplémentaire (cet intron comporte 2 codons stop dans le cadre de lecture symbolisés par des étoiles sur la Figure 13). Nous avons pu cloner cet ADNc épissé dans les siliques (vérifié par séquençage), (Figure 15), mais nous n'avons pas pu retrouver des conditions conduisant à un tel épissage. La prévalence d'une forme « longue » (contenant le codon d'initiation MSH... en amont) pose la question de l'utilisation de la méthionine en aval (MALP...) pour la synthèse du précurseur FIB3b. Une extension d'amorce a permis de révéler la présence de transcrits multiples de *FIB3b* soit de grande taille (contenant le codon d'initiation alternatif), soit de taille plus courte (ne contenant pas le codon d'initiation alternatif), (Figure 14). Il semble donc (au moins dans les conditions expérimentales utilisées ici) que FIB3b est préférentiellement synthétisé à partir de la forme courte de transcrit pour donner un précurseur qui commence à la méthionine en aval (MALP...). Un codon d'initiation alternatif en amont est aussi présent chez *FIB3a*. Cependant, il ne permet d'obtenir qu'un cadre de lecture court.



**Figure 15 : Détection d'un transcrit long épissé du gène *AtFIB3b* par RT-PCR.**

FM : Feuilles Matures ; Fl : Fleurs ; SI : Siliques. → , ← : amorces utilisées pour la PCR.

L'utilisation *in vivo* de la méthionine du MALP... plutôt que celle du MSH... est également confortée par les expériences de localisation subcellulaires de FIB3a et FIB3b en microscopie. En effet, différentes constructions ont été utilisées pour FIB3b lors des expériences de



**Figure 16 :** Schéma des séquences des constructions des peptides d 'adressage fusionnés à la YFP pour les gènes *AtFIB3a* et *AtFIB3b* utilisées lors des observations de la localisation subcellulaire au microscope confocal.

La détection de fluorescence est indiquée pour chaque construction.

localisation subcellulaire des protéines de fusions du peptide de transit FIB3b avec la YFP (Figure 16). La première construction comporte le peptide de transit démarrant au MSH... et allant jusqu'au MALP.... La deuxième démarre au MSH... et va jusqu'au site de coupure probable équivalent à celui de FIB3a. Et enfin la dernière comporte la séquence équivalente à celle de FIB3a (commençant donc au MALP...). Or sur ces trois types de constructions, nous n'avons pu observer de fluorescence que dans le dernier cas. On peut alors se demander si dans sa forme longue (si elle est présente *in vivo* dans des conditions particulières), le précurseur de FIB3b est bien ciblé au plaste ou non sachant que la prédiction informatique pour un départ de la traduction au MSH donne des résultats ambigus.

La comparaison des séquences génomiques du côté 5' de *FIB3a* et *FIB3b*, révèle une homologie significative à l'exception d'une insertion de 286pb chez *FIB3a* (Figure 13) qui montre une étonnante similarité (63%) avec une partie du promoteur du gène de la peroxyredoxine Q. Cette peroxyredoxine (locus At3g26060; Dietz 2003) est située juste en amont de *FIB3a*.

Ces informations suggèrent que les deux gènes *FIB3a* et *FIB3b* résultent d'une duplication récente dans le génome d'*Arabidopsis thaliana* (des expériences de PCR sur ADNg indiquent que cette duplication existe chez les écotypes Columbia, Landsberg erecta et WS ; non montré), et que *FIB3a* a acquis un segment du promoteur d'un gène *PRXQ* annexe situé en amont sur le chromosome.

## **1.5 CONCLUSIONS SUR LES GÈNES FIB**

La fibrilline est présente depuis les cyanobactéries jusqu'aux plantes supérieures, qu'elles soient mono ou dicotylédones. Nous proposons donc que cette famille de gènes provienne de l'évolution d'un gène ancestral certainement présent dans les cyanobactéries à l'origine des chloroplastes lors de l'endosymbiose. La multiplication de ce gène au cours de l'évolution a donné naissance à 3 gènes *FIB* chez les cyanobactéries et à la famille de 10 gènes que l'on retrouve dans les plantes : que ce soit chez une monocotylédone : le riz, ou chez une dicotylédone : la tomate. Pourtant, lors des premières caractérisations des protéines de type fibrilline chez le poivron et la pomme de terre, des expériences de Southern blot indiquaient qu'il n'y avait qu'un seul gène de ce type chez ces plantes (Pozueta-Romero *et al.* 1997, Monte *et al.* 1999). Plus tard, trois gènes ont été découverts chez *Brassica rapa* (Kim *et al.* 2001), mais cela reste éloigné des 10 gènes que nous recensons ici chez les plantes supérieures. Chez les *Brassica*, on trouve 3 gènes supplémentaires qui sont issus de

duplications récentes dans le génome. Chez les algues, on a pu trouver dans les banques d'EST (chez *Chlamydomonas*) au moins huit membres apparentés à la famille fibrilline. Il se peut donc que l'apparition des deux fibrillines supplémentaires chez les plantes soit survenue au cours de l'évolution, après la séparation algues/plantes supérieures. Lors de cette recherche préliminaire, nous n'avons pas pu trouver plus de candidats dans le génome de *Chlamydomonas*, mais une étude plus poussée pourra éclaircir la question.

Il semble donc que l'évolution tende à faire augmenter le nombre de gènes codant des protéines de type fibrillines, peut-être en relation avec une augmentation de la complexité des régulations qui se déroulent chez une plante telle que la tomate ou le riz par rapport à l'algue ou à la cyanobactérie. Chez les cyanobactéries, l'évolution est même allée en sens inverse puisqu'il semble que le gène de la famille 3 des fibrillines de cyanobactérie ait disparu chez les organismes adaptés aux faibles conditions de lumière. Une telle multiplicité de gènes suggère en effet que chaque protéine tend vers une spécialisation de fonction, d'expression ou de localisation. Or il est intéressant de noter que sur les 13 membres présents chez *Arabidopsis thaliana*, pratiquement toutes les protéines correspondantes sont localisées dans le plaste, et plus particulièrement dans les membranes thylacoïdiennes du chloroplaste. Seuls FIB5, 8 et 9 n'ont, à l'heure actuelle, aucune preuve expérimentale de leur localisation dans le plaste. Cependant on ne les retrouve pas non plus dans le protéome mitochondrial. On peut donc penser que la fibrilline pourrait être impliquée dès son origine dans la réponse à des variations d'exposition à la lumière et que chez les plantes supérieures, l'évolution a « recruté » cette protéine pour répondre à d'autres facteurs. Toutes les protéines caractérisées chez les plantes jusqu'à maintenant appartiennent à la sous-famille 1,2 qui présente la particularité de posséder un motif protéique DEWG dont on ne connaît pas la fonction à ce jour. Ce motif est absent de la protéine codée par le gène *FIB1b* des crucifères (*Arabidopsis thaliana* et *Brassica rapa*) et une étude des différences entre les gènes ou de versions mutantes de ces protéines dépourvues du motif pourrait permettre de découvrir l'implication de ce motif.

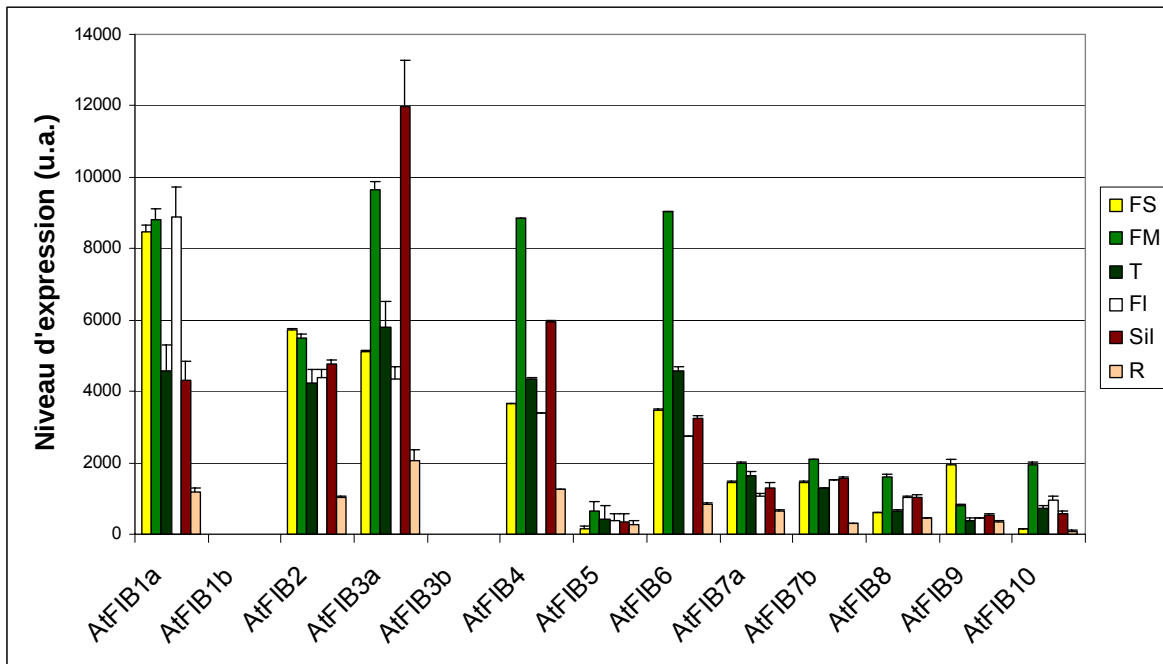
## Chapitre 2

# **Expression des gènes *fibrilline* et de leur protéine**

## 2 EXPRESSION DES GÈNES *FIBRILLINE* ET DE LEUR PROTÉINE

### 2.1 PROFIL D'EXPRESSION DES GÈNES *FIBRILLINE* CHEZ *ARABIDOPSIS THALIANA*

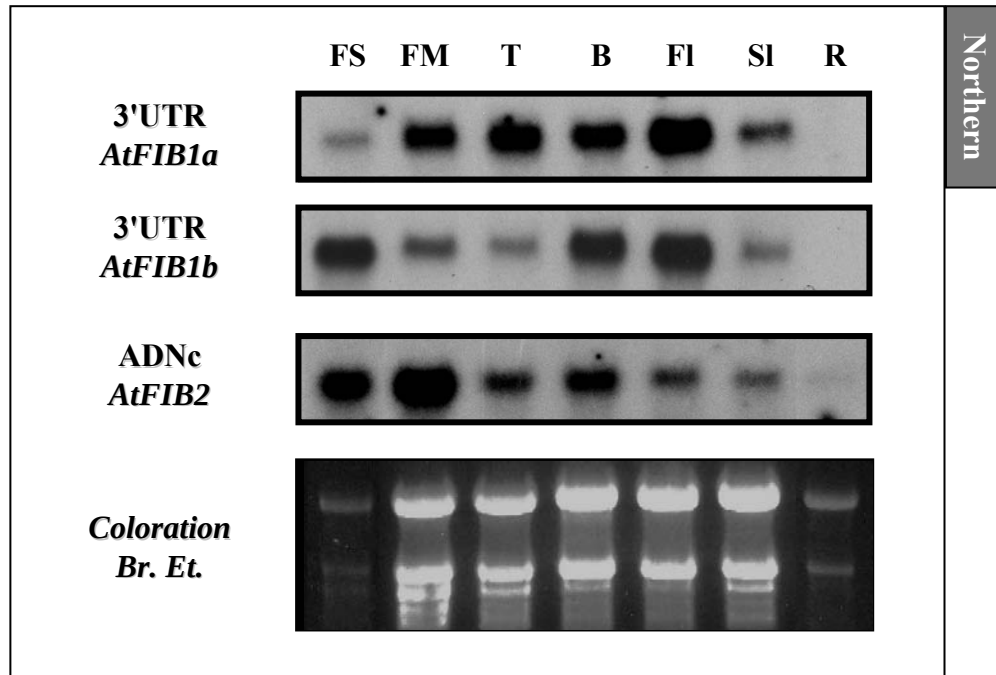
Afin d'avoir une vision d'ensemble du profil d'expression des gènes de la famille multigénique *FIB* dans les différents organes d'*Arabidopsis thaliana*, nous avons compilé les analyses d'expression par puces à ADN disponibles (Figure 17), (Zimmermann *et al.* 2004).



**Figure 17 : Niveaux d'expression des gènes fibrilline d'*Arabidopsis thaliana* dans les différents organes de la plante.**

Les données sont issues de l'analyse des résultats de puces à ADN obtenues sur le site [www.genevestigator.ethz.ch](http://www.genevestigator.ethz.ch). Nombre de puces utilisées : FS : 3, FM : 237, T : 19, FI : 74, SI : 17, R : 208. Aucune donnée n'est disponible pour les gènes *AtFIB1b* et *AtFIB3b*. FS : Feuilles Sénescences ; FM : Feuilles Matures ; T : Tiges ; FI : Fleurs ; SI : Siliques ; R : Racines.

Les différences d'expression nous permettront peut-être de distinguer d'éventuelles spécialisations des membres de la famille multigénique. Tous les membres sont représentés à l'exception de *FIB1b* et *FIB3b*. La première observation est que l'on peut distinguer deux groupes de fibrillines selon leur niveau général d'expression dans les différents organes. Un premier groupe comporte les gènes *FIB 1a*, *2*, *3a*, *4* et *6* qui montre une expression d'un niveau relativement élevé avec des valeurs comprises entre 4000 et 12000 ua. Pour repère, on



**Figure 18 : Profil d'expression des gènes fibrilline 1-2 dans les différents organes d'*Arabidopsis thaliana* par northern blot.**

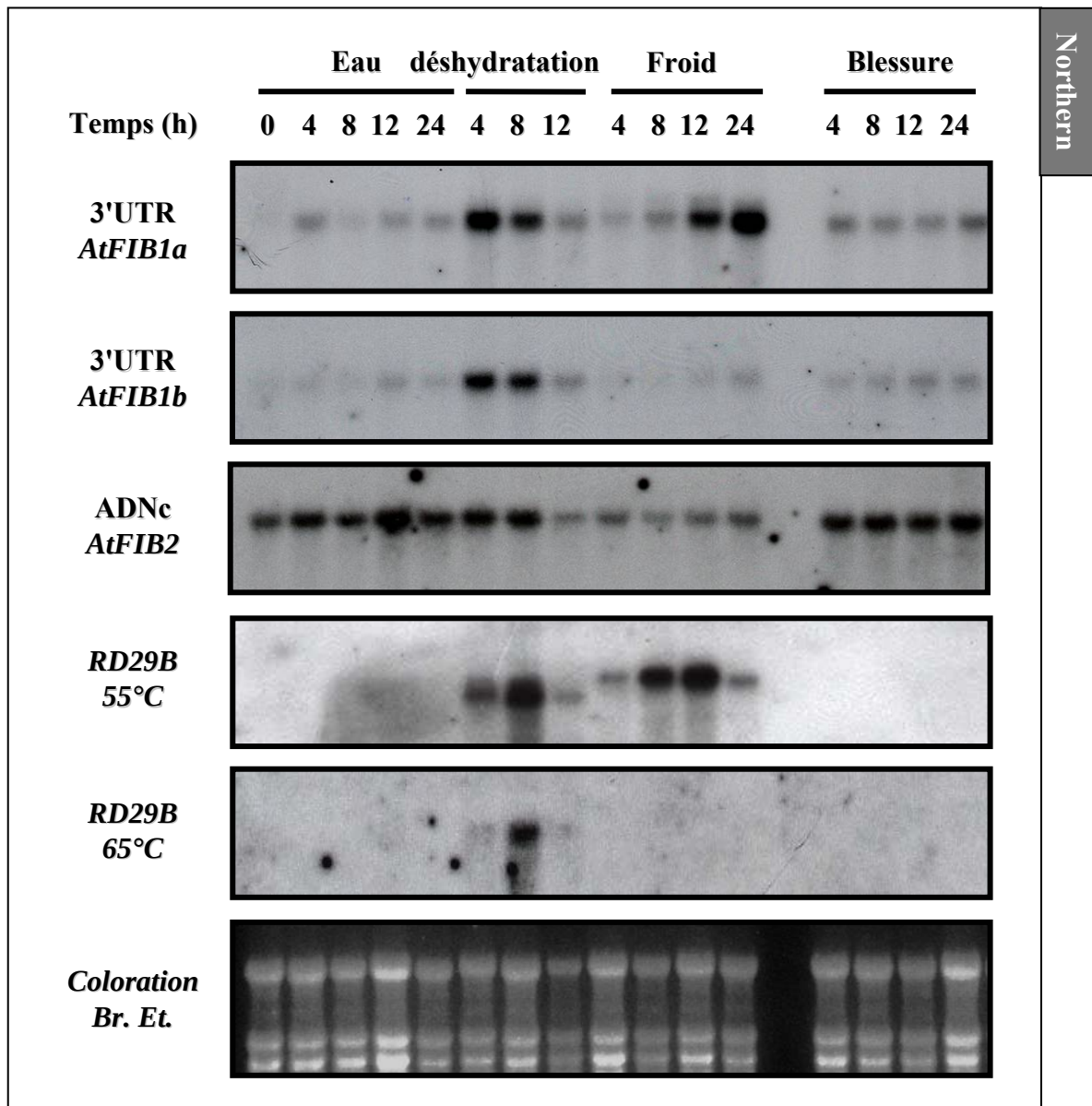
Le gel d'ARN coloré au Br. Et. est visualisé sous UV pour le contrôle de charge. La sonde utilisée pour l'hybridation est indiquée.

FS : Feuilles Sénescentes ; FM : Feuilles Matures ; T : Tiges ; B : Boutons Floraux ; Fl : Fleurs ; Sl : Siliques ; R : Racines.

peut noter que le gène très fortement exprimé de la petite sous unité 1A (At1g67090) de la rubisco montre un niveau d'expression de 50 000 et le gène *RPOX* (At5g15700) d'une polymérase plastidiale faiblement exprimée présente un niveau d'expression de l'ordre de 500. Le deuxième groupe présentant une expression plus faible (en moyenne 5 à 10 fois inférieure avec un maximum proche des 2000) est composée des gènes *FIB 5, 7a, 7b, 8, 9* et *10*. Pour l'ensemble de la famille multigénique, il semble que l'expression soit en général moins importante dans les racines avec une valeur maximum de 2000 pour *FIB3a*. Les autres organes montrent des niveaux d'expression relativement équivalents par rapport aux groupes de niveaux d'expression forts ou faibles que nous venons de décrire. Cependant suivant le gène, une expression prépondérante dans un ou deux organes est observée. Dans pratiquement tous les cas, si un organe présente une expression préférentielle d'un des gènes *FIB*, il s'agit d'une grande quantité de transcrits dans les feuilles matures ou sénescents. C'est le cas pour les gènes *FIB 1a, 3a, 4, 6, 8, 10*. Dans d'autres cas, on retrouve une bonne induction des gènes dans les fleurs (*FIB1a*) ou les siliques (*FIB3a*). Pour les gènes *FIB 2, 7a* et *7b*, le profil d'expression est relativement constitutif.

Afin d'obtenir des données sur l'expression du gène *FIB1b* dans les différents organes d'*Arabidopsis thaliana* (racines, feuilles, boutons floraux, fleurs, tiges et siliques), des expériences de northern blot ont été réalisées à l'aide de sondes spécifiques choisies dans la région 3' non traduite (3'UTR), (Figure 18). L'accumulation des transcrits la plus faible a été observée dans les siliques et les racines. Dans les racines, le signal est probablement sous-estimé de par la faible quantité d'ARN déposée sur le gel. L'expression la plus importante est retrouvée pendant le développement de la fleur pour *FIB1a* et *FIB1b* (par rapport aux feuilles) alors que l'on constate l'inverse pour *FIB2*. On peut remarquer également une différence d'expression entre *FIB1a* et *FIB1b* au niveau des tiges, qui semble donner une certaine spécificité d'expression de *FIB1b* dans les organes floraux. Les transcrits du gène *FIB1b* s'accumulent aussi dans les feuilles sénescents par rapport aux feuilles matures (le signal est là encore sous-estimé de par la faible quantité d'ADN déposée sur le gel).

Si l'on compare maintenant les résultats obtenus par northern blot et par puces à ADN, on remarque qu'ils sont concordants, sauf dans les tiges où le northern blot montre une expression plus importante par rapport aux autres organes. De manière générale, les différences de niveau d'expression semblent moins importantes au vu des résultats obtenus par puces à ADN par rapport au northern blot. Pour ce qui est du gène *FIB2*, on retrouve encore le même schéma d'expression avec un profil relativement constitutif, mais avec des



**Figure 19 : Profil d'expression des gènes fibrilline 1-2 dans les feuilles d'*Arabidopsis thaliana* en conditions de stress par northern blot.**

Des feuilles excisées sont soumises aux différents types de stress pendant une durée variable de 4, 8, 12 ou 24 heures. Pour le contrôle, les feuilles sont mises à flotter sur de l'eau. Pour le stress déshydratation, les feuilles sont placées sur boîte sèche, en condition de stress froid les feuilles sont mises à flotter sur de l'eau à 4°C, et pour le stress blessure les feuilles sont lacérées et mises à flotter sur de l'eau. Le gel d'ARN coloré au Br. Et. est visualisé sous UV pour le contrôle de charge. La sonde utilisée pour l'hybridation est indiquée.

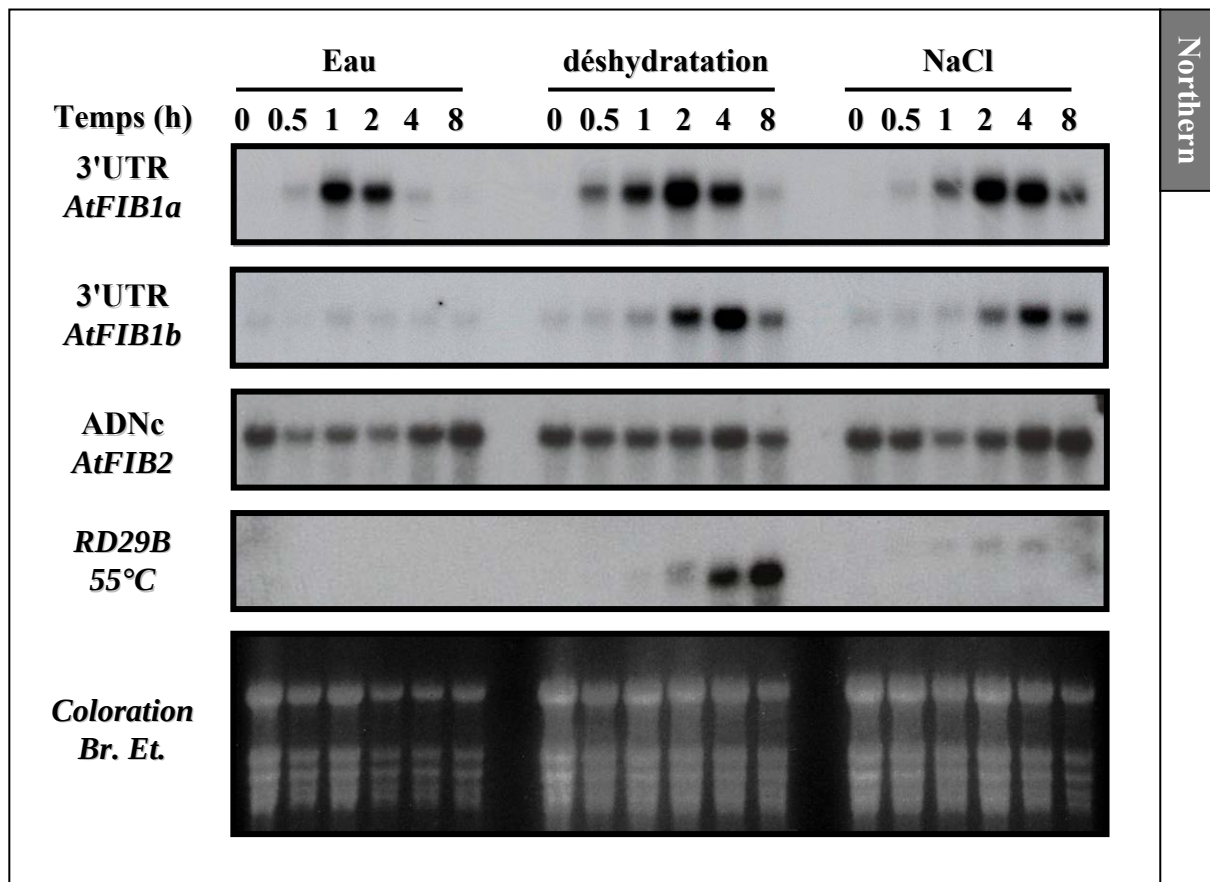
différences notables entre les niveaux d'expression comparés pour les deux techniques. *FIB2* semblait, en effet, montrer une expression plus marquée dans les feuilles sénescentes et les fleurs avec la technique de northern blot. Or l'analyse par puces à ADN ne montre qu'une faiblement augmentation de l'abondance dans ces deux organes par rapport aux autres parties de la plante. Il faut peut être attribuer ces variations à la technique ou aux différences éventuelles de conditions de cultures.

| Gène         | Froid    | Déshydratation | Sel      | Lumière  |
|--------------|----------|----------------|----------|----------|
| <i>FIB1a</i> | + (x2,4) | ?              | + (x3)   | + (x8)   |
| <i>FIB1b</i> | =        | + (x4)         | + (x4)   | + (x3)   |
| <i>FIB2</i>  | =        | =              | =        | ?        |
| <i>FIB3a</i> | =        | - (x2,5)       | =        | =        |
| <i>FIB4</i>  | =        | - (x2,2)       | - (x2,5) | =        |
| <i>FIB6</i>  | =        | =              | - (x2)   | - (x2,5) |
| <i>FIB7a</i> | =        | =              | =        | ?        |
| <i>FIB9</i>  | + (x2,3) | =              | =        | ?        |

**Tableau 4 :** Analyse de la variation d'expression de gènes *FIB* en conditions de stress par puce à ADN.

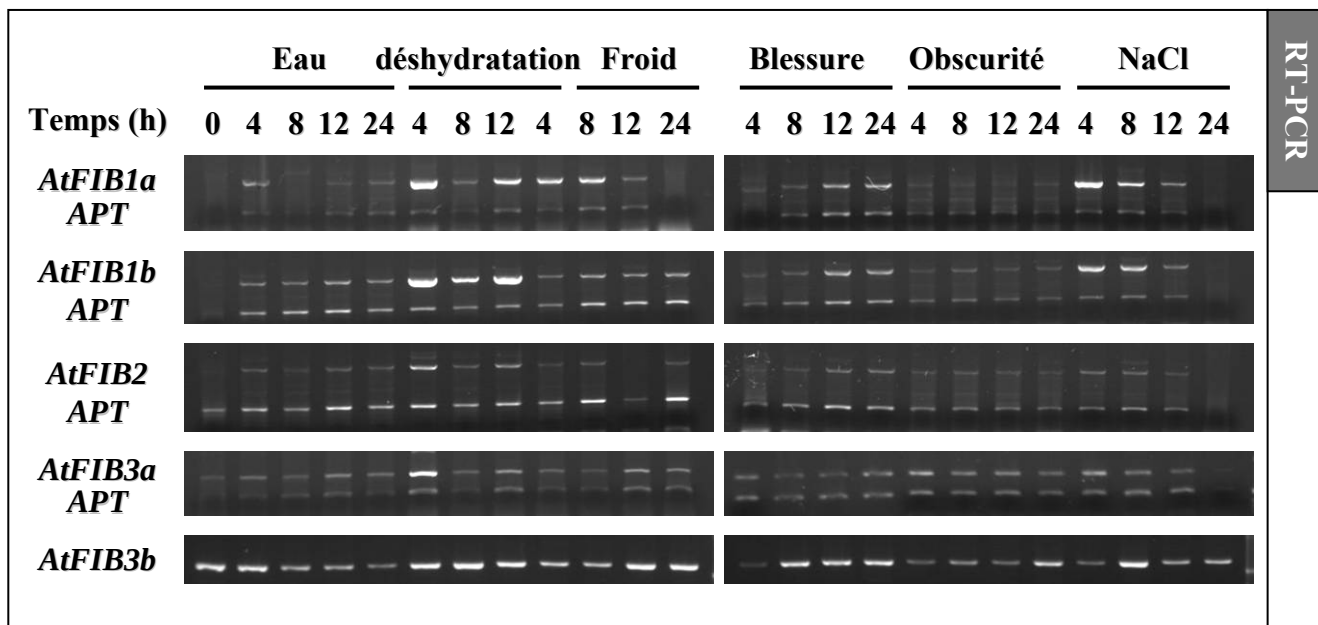
Les données d'expression par puce à ADN statistiquement significatives issues de [http://rarge.gsc.riken.go.jp/microarray/microarray\\_data.pl](http://rarge.gsc.riken.go.jp/microarray/microarray_data.pl) ont été compilées. Aucune donnée n'est disponible pour *FIB 3b*, *5*, *7b* et *10*. +, induction (x2,8 au minimum) ; -, répression (x2,8 au minimum) ; =, pas de variation supérieure à un facteur 2 en comparaison des contrôles (non stressés). ?, donnée non valide. Les nombres entre parenthèses quantifient la variation d'expression.

La plupart des gènes codant des protéines de type fibrilline montrent une régulation environnementale (Introduction § 4.1.2, Gillet *et al.* 1998, Pozueta-Romero *et al.* 1997). C'est pourquoi nous avons examiné les données d'expression par puce à ADN des gènes codant les fibrillines d'*Arabidopsis thaliana* dans des conditions de stress salin, déficit hydrique et d'exposition à la lumière après une période d'obscurité (<http://rarge.gsc.riken.jp/>). Les profils d'expression des différents gènes nous permettront de dégager d'éventuelles spécialisations (Tableau 4). Aucune donnée n'est disponible pour *FIB 3b*, *5*, *7b*, *8* et *10*. Le Tableau 4 indique que *FIB1a* et *FIB1b* sont induits pour trois des quatre stress appliqués tandis que *FIB9* montre seulement une légère induction par le froid. *FIB2* et *FIB7a* semblent avoir une expression inchangée pendant le stress tandis que *FIB3a*, *4* et *6* montrent une légère répression de leur expression suite à un stress. Les gènes de la famille 1 semblant être plus particulièrement induits lors de stress, nous avons effectué par northern blot une analyse cinétique plus fine lors de 3 types de stress (déshydratation, froid et blessure) sur des feuilles excisées d'*Arabidopsis thaliana* (Figure 19). Les résultats montrent qu'un stress basse température appliqué aux feuilles mène à une répression de l'expression de *FIB2* et à une induction de l'expression de *FIB1a* entre 12 et 24 heures après le stress. *FIB 1a* et *1b* sont



**Figure 20 :** Profil d'expression des gènes fibrillines 1-2 dans les feuilles d'*Arabidopsis thaliana* en conditions de stress par northern blot (cinétique courte).

Des feuilles excisées sont soumises aux différents types de stress pendant une durée variable de 4, 8, 12 ou 24 heures. Pour le contrôle, les feuilles sont mises à flotter sur de l'eau. Pour le stress déshydratation, les feuilles sont placées sur boîte de Pétri sèche, en condition de stress froid les feuilles sont mises à flotter sur de l'eau à 4°C, et pour le stress blessure les feuilles sont lacérées et mises à flotter sur de l'eau. Le gel d'ARN coloré au Br. Et. est visualisé sous UV pour le contrôle de charge. La sonde utilisée pour l'hybridation est indiquée.



**Figure 21 : Profil d'expression de fibrillines dans les feuilles d'*Arabidopsis thaliana* en conditions de stress par RT-PCR.**

Des feuilles excisées sont soumises aux différents types de stress pendant une durée variable de 4, 8, 12 ou 24 heures. Pour le contrôle, les feuilles sont mises à flotter sur de l'eau. Pour le stress déshydratation, les feuilles sont placées sur boîte de Pétri sèche, en condition de stress froid les feuilles sont mises à flotter sur de l'eau à 4°C, et pour le stress blessure les feuilles sont lacérées et mises à flotter sur de l'eau. Le gène APT est utilisé comme contrôle.

induits par la déshydratation avec un maximum à 4 heures, alors que *FIB2* ne semble pas affecté. Un stress blessure, connu pour induire l'orthologue de *C. annuum* (Chen *et al.* 1998), ne semble avoir qu'un faible effet sur l'expression des gènes *FIB 1a*, *1b*, 2 d'*Arabidopsis thaliana*. Notons au passage que l'induction de l'expression des gènes *RD29A* et *RD29B* (connus pour être induit lors d'un stress de déshydratation, ou par un stress basse température pour *RD29A* (Yamaguchi-Shinozaki et Shinozaki 1993)) suit le même profil d'expression que celui des gènes *FIB1a* ou *FIB1b*. Une cinétique plus courte a été effectuée pour des stress de déshydratation et nous avons ajouté un stress salin pour les mêmes types d'échantillons (Figure 20). On retrouve ici l'induction de *FIB 1a* et *1b* lors d'une déshydratation, et on peut voir également qu'en condition de stress salin, ces deux gènes sont également induits contrairement à *FIB2* dont l'accumulation des transcrits ne semble pas affectée.

Ces analyses d'expression ont également été réalisées par RT-PCR semi quantitative (Figure 21) en ajoutant l'étude des deux gènes *FIB3a* et *FIB3b*. Un contrôle de charge, représenté par l'expression du gène *APT* (adénosine phosphotransférase), (Cowling *et al.* 1998), est visualisable dans chaque cas par la bande amplifiée de faible masse moléculaire. Nous avons pu, dans ce cas, analyser également l'expression des gènes *FIB 3a* et *3b*. Pour *FIB3b*, nous n'avons pas amplifié le contrôle car les amplicons auraient été de même taille et nous avons dû effectuer 5 cycles PCR de plus avec deux fois plus de matrice ADNc que pour les autres gènes afin d'obtenir un signal. On retrouve par cette technique un profil d'expression du gène *FIB2* relativement constitutif. Pour *FIB 1a* et *1b*, l'induction par la déshydratation, le sel ou la blessure est aussi visible, de même qu'en condition de stress basse température pour *FIB1a*. L'accumulation des transcrits de *FIB3a* se rapproche d'un profil de type constitutif comme observé pour *FIB2* alors que pour *FIB3b*, on retrouve une légère induction pour toutes les conditions de stress utilisées ici sauf pour l'obscurité. On peut noter d'ailleurs qu'à l'obscurité, tous les gènes analysés ici présentent une diminution de leur expression.

Pour conclure, les gènes *FIB* d'*Arabidopsis thaliana* sont relativement spécifiques d'un ou deux organes (fleurs et/ou feuilles), mais ils sont exprimés aussi dans les autres organes, excepté dans les racines qui présentent le niveau d'expression le plus faible pour tous les gènes *FIB*. Dans le cas des différents types de stress appliqués, on retrouve également des spécificités d'expression de chacun des gènes *FIB*. Ces résultats indiquent une spécialisation d'expression, et peut être de fonction, des différents membres de la famille de gènes *FIB* d'*Arabidopsis thaliana* au sein de la plante.

Tailles attendues :

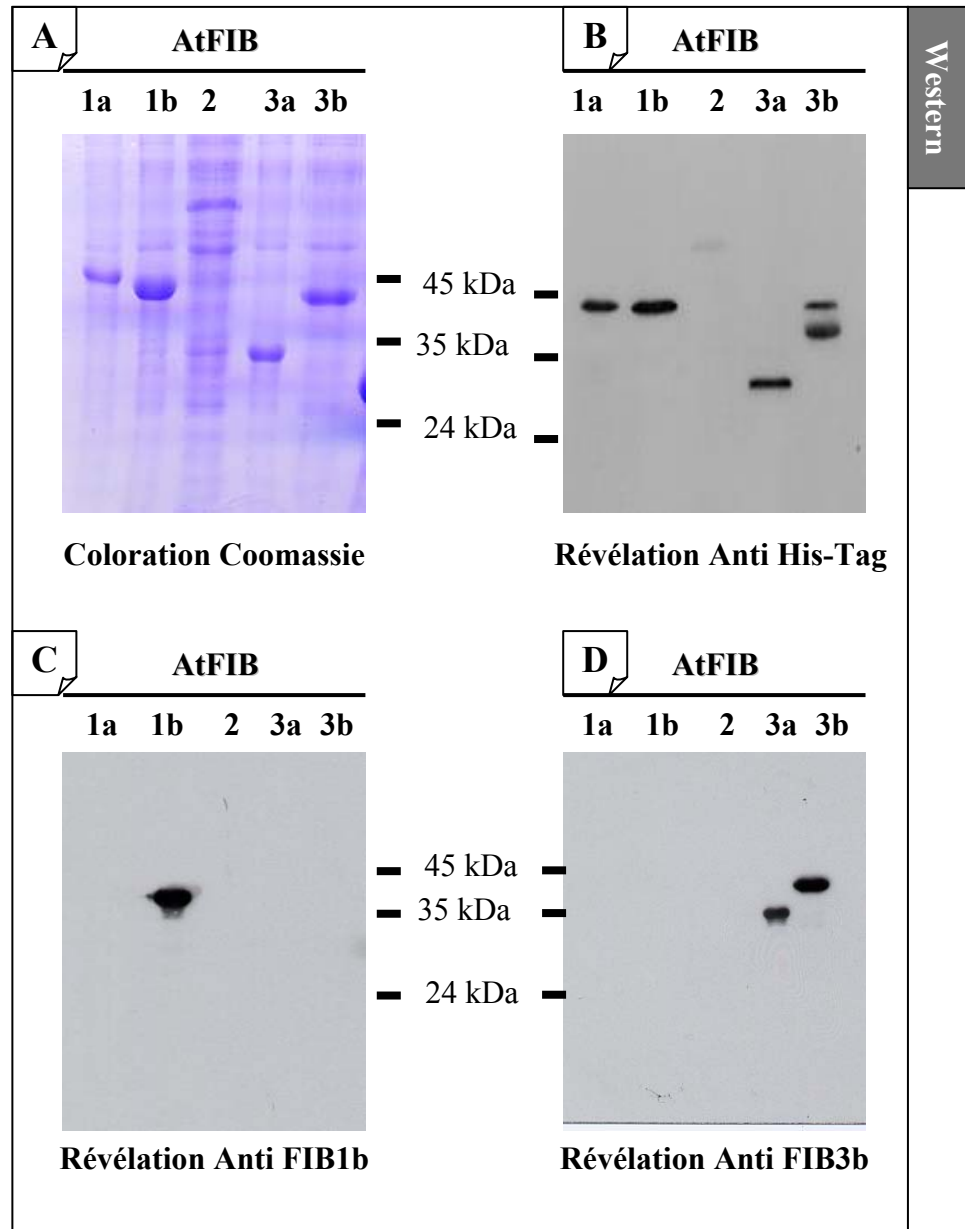
AtFIB1a = 36 kDa

AtFIB1b = 35 kDa

AtFIB2 = 41 kDa

AtFIB3a = 28 kDa

AtFIB3b = 36 kDa



**Figure 22 : Production et détection de protéines fibrillines recombinantes d'*Arabidopsis thaliana* chez *E. coli*.**

Les gels n'ont pas tous la même concentration d'acrylamide. Les tailles attendues des protéines et la position des marqueurs de taille sont indiquées. A : Coloration Coomassie. Révélation avec les anticorps anti HIS-Tag (B) anti AtFIB1b purifié (C) et anti AtFIB3b purifié (D).

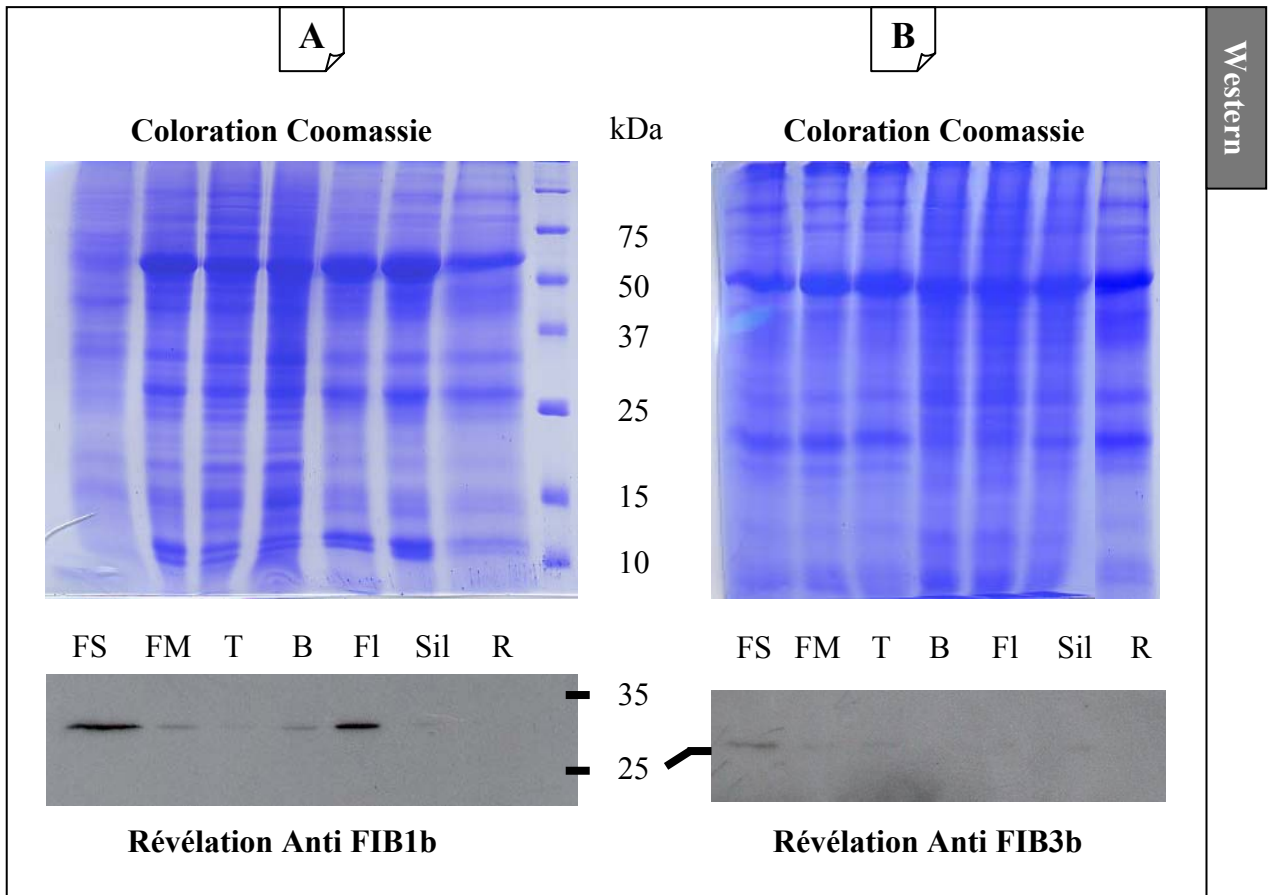
## **2.2 ANALYSE DE L'ACCUMULATION DES PROTÉINES FIBRILLINES**

Les protéines de type fibrilline caractérisées dans les différentes plantes montre généralement une régulation transcriptionnelle (Gillet *et al.* 1998, Pozueta-Romero *et al.* 1997, Vishnevetsky *et al.* 1996). Nous avons donc voulu étudier l'accumulation des protéines FIB puisque les transcrits des gènes *FIB 1a* et *1b* sont exprimés dans les fleurs et/ ou les feuilles, ou en conditions de stress dans les feuilles d'*Arabidopsis thaliana* (Figures 18 et 19). Nous avons focalisé notre étude sur les fibrillines de type 1, qui sont les plus proches de la fibrilline de poivron et qui montrent une forte expression dans les feuilles en conditions de stress. Nous avons également étudié la sous-famille FIB3a,3b.

### **2.2.1 Protéines recombinantes et test des anticorps**

Des anticorps spécifiques des deux fibrillines d'*Arabidopsis thaliana* : FIB1b et FIB3b ont été produits (Matériel et Méthodes § 7) respectivement, contre la protéine FIB1b tronquée de sa partie N-terminale, et 2 peptides de la protéine FIB3b. Afin de tester l'efficacité de ces anticorps, nous avons cloné les ADNc des gènes *FIB 1a*, *1b*, *2*, *3a*, *3b* en ajoutant une étiquette de 6 histidines (His-Tag) en position C-terminale des protéines, ce qui nous a permis de purifier facilement les protéines recombinantes exprimées chez *Escherichia coli* et de les détecter grâce à un anticorps anti His-Tag. Nous avons ensuite testé les anticorps sur des extraits bactériens des souches exprimant les différentes fibrillines. Les anticorps ont été purifiés contre leur protéine respective FIB1b et FIB3b car les tests sur extraits végétaux faisaient apparaître de multiples bandes qui ne permettaient pas l'interprétation du signal (non montré).

Les résultats de la détection des protéines FIB recombinantes par ces anticorps purifiés sont résumés dans la figure 22. Tout d'abord, sur le gel coloré au bleu de Coomassie, on peut observer l'accumulation des protéines FIB dans les fractions bactériennes. Comme l'indique le western blot utilisant l'anticorps anti His-Tag, pour chacune des 5 fibrillines, on ne détecte qu'une seule bande (sauf pour FIB3b) dont la taille correspond à celle attendue. La bande supplémentaire de FIB3b, plus petite, peut être le résultat d'une dégradation ou d'une initiation de la traduction de *FIB3b* à partir d'une méthionine en aval de celle du MSH (§ 1.4). En effet l'ADNc utilisé pour la surproduction de la protéine chez *E. coli* est la forme longue que nous avons pu isoler (commençant au MSF...), ce qui explique aussi la différence de taille entre les protéines FIB3a et FIB3b sur ce western blot.



**Figure 23 : Accumulation des protéines FIB1b et FIB3b dans les différents organes d'*Arabidopsis thaliana* (Coomassie et western blot).**

Une quantité équivalente de protéine a été chargée pour chacun des organes. La révélation est effectuée avec l'anticorps purifié anti AtFIB1b (A) ou avec l'anticorps purifié anti AtFIB3b (B). La position des marqueurs de taille est indiquée.

FS : Feuilles Sénescentes ; FM : Feuilles Matures ; T : Tiges ; B : Boutons Floraux ; Fl : Fleurs ; Sl : Siliques ; R : Racines.

Dans le cas du western blot utilisant l'anticorps anti FIB1b, on peut voir que seule la bande correspondant à FIB1b est détectée alors qu'aucune autre fibrilline n'est reconnue par cet anticorps. L'anticorps purifié est donc très spécifique de la protéine FIB1b, ce qui n'était pas le cas du sérum non purifié qui lui permettait dans les mêmes conditions de détecter les 3 protéines FIB1a, 1b et 2 (non montré), appartenant à la même sous-famille et donc relativement proches.

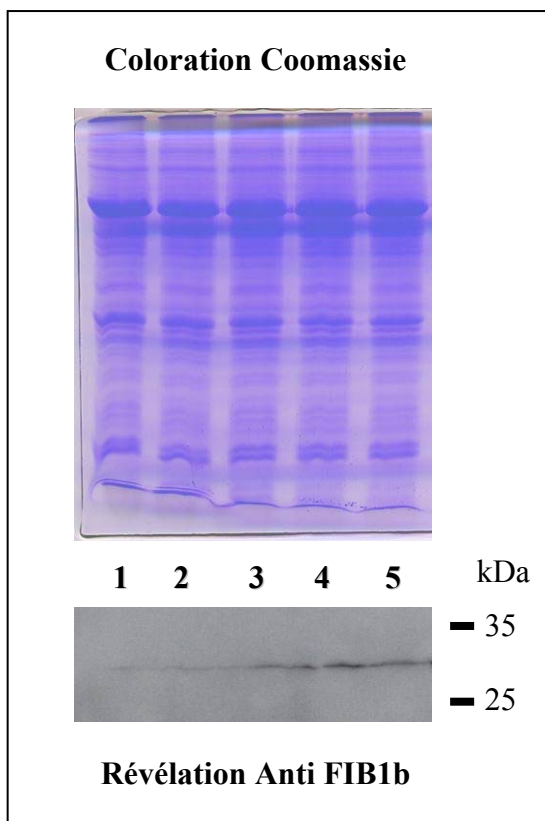
L'anticorps anti FIB3b reconnaît non seulement la protéine FIB3b mais aussi la protéine FIB3a, mais avec une affinité plus faible. Les protéines FIB1a et FIB1b ne sont pas détectées par cet anticorps.

Nous disposons donc ici de deux anticorps fonctionnels, d'une part un anticorps spécifique de la protéine FIB1b et, d'autre part, un anticorps anti FIB3b qui reconnaît les fibrillines FIB3a et FIB3b. Ces deux anticorps vont nous permettre d'étudier les protéines FIB1b, et FIB3a et FIB3b chez *Arabidopsis thaliana*.

#### 2.2.2 Accumulation des protéines FIB1b et FIB3a,b chez *Arabidopsis thaliana*

A l'aide des deux anticorps purifiés, nous avons testé la présence des polypeptides FIB sur des extraits de plantes correspondant aux différents organes d'*Arabidopsis thaliana*. La figure 23A présente les résultats obtenus avec l'anticorps anti FIB1b. On peut donc détecter un fort signal correspondant à FIB1b dans les feuilles sénescentes et les fleurs, plus faiblement dans les feuilles matures et les boutons floraux. On distingue une très faible bande dans les tiges et les siliques, et rien n'apparaît dans les racines. Ce profil correspond bien à celui de l'accumulation des ARNm de *FIB1b* (Figure 18), excepté pour les boutons floraux où le northern blot présumait que l'on aurait une plus forte accumulation du peptide FIB1b dans cet organe.

Nous avons également testé la présence des protéines FIB3b sur ces mêmes fractions des organes d'*Arabidopsis thaliana* à l'aide de l'anticorps anti FIB3b. Cependant, on ne détecte qu'un signal très faible quelque soit l'organe testé (Figure 23B). Ceci peut s'expliquer par le fait que FIB3b n'est pas très exprimé dans les conditions de cultures standard. Les expériences de RT-PCR indiquent d'ailleurs que le niveau d'expression de ce gène est faible. On peut tout de même voir une accumulation dans les feuilles sénescentes. Cependant il est difficile d'attribuer le signal observé à FIB3b car l'anticorps reconnaît aussi FIB3a mais avec une affinité plus faible.

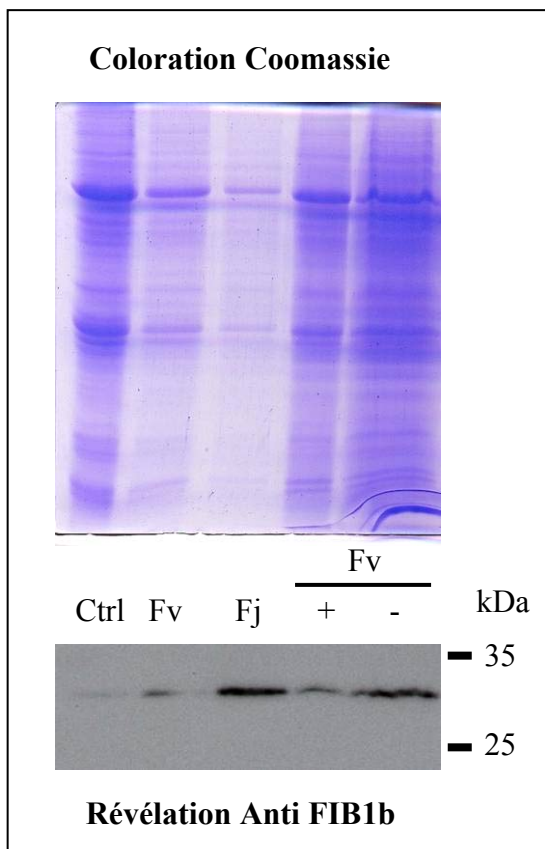


Western

**Figure 24 : Accumulation de la protéine FIB1b dans des feuilles excisées d'*Arabidopsis thaliana* en conditions de stress.**

La révélation est effectuée avec l'anticorps anti AtFIB1b purifié. La position des marqueurs de taille est indiquée. Les feuilles excisées sont placées en boîte de Pétri :

- 1 : 4h sur de l'eau (contrôle).
- 2 : 4h de déshydratation.
- 3 : 4h de déshydratation + 1 jour sur de l'eau.
- 4 : 4h de déshydratation + 2 jours sur de l'eau.
- 5 : 4h sur de l'eau + 2 jours sur de l'eau (contrôle).



Western

**Figure 25 : Accumulation de la protéine FIB1b dans les feuilles d'*Arabidopsis thaliana* en conditions de déficit nutritif (Coomassie et western blot).**

La révélation est effectuée avec l'anticorps anti AtFib1b purifié. La position des marqueurs de taille est indiquée.

- Ctrl : condition contrôle (une plante par pot).
- Fv : feuilles vertes (plusieurs plantes par pot).
- Fj : feuilles jaunes (plusieurs plantes par pot).
- +: une plante dans un pot arrosée avec engrais.
- : une plante dans un pot arrosée sans engrais.

Nous avons ensuite voulu déterminer si les protéines FIB s'accumulaient en condition de stress comme c'est le cas pour leurs ARNm. Nous avons donc testé un stress de déshydratation et un stress salin qui menaient tous deux à une réponse maximale dans les expériences de northern blot pour *FIB1b*. Aucun des deux stress ne conduit à une accumulation massive de la protéine FIB1b. Comme l'indique la figure 24, la protéine est présente en moins grande quantité que dans le contrôle (lignes 4 et 5). Ceci même après une récupération post-stress qui aurait pu être nécessaire à la reprise de la synthèse protéique. Ceci peut s'expliquer par le fait que la fibrilline est sollicitée en cas de stress et que cela conduit à sa dégradation, diminuant ainsi le pool de protéines dont le renouvellement plus important est conforté par l'accumulation des transcrits de ce gène. Une autre explication est que nous sommes en présence d'une régulation post-transcriptionnelle de ce gène.

La présence de fortes quantités de transcrits de la fibrilline dans les feuilles sénescentes (Figure 18) nous a suggéré de tester la présence de la protéine dans des extraits de feuilles jaunes de plantes semées en grand nombre dans un pot. La protéine FIB1b s'accumule dans les feuilles jaunes comparativement aux feuilles vertes dans les plantes semées en forte densité (Figure 25). Étant donné qu'un tel jaunissement des feuilles en conditions de culture en forte densité peut provenir d'une carence nutritive, nous avons semé une plante par pot que nous avons arrosée avec ou sans engrais. On observe alors le même type d'induction de l'accumulation de la protéine FIB1b dans les feuilles vertes des plantes qui n'ont pas profité d'un apport d'engrais, que dans les feuilles jaunes des semis en forte densité (Figure 25). Il semble donc que le gène de la fibrilline réponde à un déficit nutritif chez les plantes. A notre connaissance, c'est la première fois que l'expression d'un gène fibrilline est mise en relation avec une carence nutritive. La fibrilline a jusqu'à maintenant surtout été caractérisée dans des conditions de stress.

### **2.3 CONCLUSIONS SUR L'EXPRESSION DES GÈNES FIB ET DE LEURS PROTÉINES**

Les données d'expression par puces à ADN nous montrent deux groupes de niveau d'expression, l'un comportant des gènes *FIB 5, 7a, 7b, 8, 9* et *10* avec des expression faibles, l'autre est composé des gènes *FIB 1a, 1b, 2, 3a, 4* et *6* qui montrent des niveaux d'expression relativement élevés. Nous avons pu voir que, principalement dans ce dernier groupe, les gènes *FIB* présentaient une spécificité d'expression dans certains organes comme les feuilles matures et sénescentes (*FIB 1a, 3a, 4, 6*), les fleurs (*FIB1a*), ou encore les siliques (*FIB3a*).

Nous avons pu confirmer une telle accumulation prépondérante des transcrits dans les fleurs et les feuilles sénescences par nos expériences de northern blot effectuées sur *FIB 1a*, *1b* et 2.

Les trois gènes *FIB 1a*, *1b* et 2 sont respectivement les homologues des gènes *PAP1*, *PAP2* et *PAP3* de *Brassica rapa* (Kim *et al.* 2001). On retrouve entre ces deux *Brassicaceae* les mêmes profils d'expression de leurs homologues puisque *FIB1a* et *PAP1* sont exprimés tous deux dans les feuilles et les fleurs. *FIB1b* et *PAP2* ont tous deux une expression préférentielle dans les fleurs (par rapport aux feuilles) et *FIB2* et *PAP3* semblent montrer une expression relativement constitutive. La régulation des homologues respectifs des gènes *FIB* chez ces deux plantes est donc fortement conservée, même pour *FIB1b* et *PAP2*, en dépit de la coloration présente dans les pétale de *Brassica rapa* et absente de ceux d'*Arabidopsis thaliana*. Il est intéressant de noter que des gènes *FIB* d'autres plantes s'expriment dans les fleurs comme chez *Cucumis sativus* (Smirra *et al.* 1993) pour la protéine CHRC. Or, chez cette plante, comme chez *Brassica rapa*, les fleurs présentent des pétales colorés qui accumulent des caroténoïdes. Dans le cas d'*Arabidopsis thaliana* dont les pétales sont blancs, on peut donc se demander quelle est la signification biologique d'une telle induction des gènes fibrilline et en particulier de *FIB1b*.

L'induction des gènes fibrilline est aussi liée à des conditions menant à un stress de type oxydant dans les feuilles (Manac'h et Kuntz 1999). Les données d'expression par microarray dans de telles conditions montrent que les différents gènes *FIB* d'*Arabidopsis thaliana* ne réagissent pas de la même manière aux conditions appliquées aux plantes. En effet, tandis que *FIB1a* et *FIB1b* sont induits par plusieurs stress, *FIB9* n'est légèrement induit que par le froid et *FIB2* et *FIB7a* ne semblent pas affectés. Une légère répression est observée pour *FIB3a*, *FIB 4* et *FIB6*. On peut alors supposer que ces différences reflètent des spécialisations fonctionnelles issues de cette multiplicité des gènes *FIB*.

Nous avons pu montrer aussi bien par northern blot que par RT-PCR que chez *Arabidopsis thaliana*, le gène *FIB1a* est induit dans toutes les conditions de stress que nous avons utilisées. *FIB1b* est quant à lui sensible uniquement aux conditions de déshydratation et de sel, et enfin *FIB2* est, lui, peu ou pas affecté par les changements de conditions que nous avons pu tester. Ceci indique que les mécanismes de régulation de l'expression des gènes fibrilline seraient bien conservés chez les végétaux puisque ce type d'inductions a été précédemment observé chez d'autres plantes (Chen *et al.* 1998, Gillet *et al.* 1998)). Cependant, les homologues *PAP 1*, 2 et 3 de ces trois gènes chez *Brassica rapa* ne montrent pas une telle induction (Kim *et al.* 2001). En effet, les stress déshydratation et ozone

appliqués n'induisent pas les gènes *PAP*, seuls le stress blessure et l'augmentation lumineuse montrent une induction. Or, nous avons observé par northern blot en conditions de stress, que les transcrits du gène *AtFIB1b* sont visibles pour 4 et 8 heures de stress et disparaissent au-delà de ce temps. Cette induction transitoire pourrait expliquer les résultats contradictoires sur l'accumulation des transcrits suite à un déficit hydrique, obtenus par Kim *et al.* (2001) et Chen *et al.* (1998), ou Gillet *et al.* (1998) et Rey *et al.* (2000). La spécificité de la cinétique d'induction des gènes *FIB* chez une espèce et la durée des stress serait la cause de ces différences constatées.

La quantité de protéine FIB1b dans les différents organes de la plante suit bien le profil d'expression que nous avons pu observer par northern blot. Il semble donc que la régulation tissu spécifique de FIB1b soit transcriptionnelle. Ceci a d'ailleurs été montré pour différents homologues de la fibrilline chez les autres plantes (Gillet *et al.* 1998, Vishnevetsky *et al.* 1996). En revanche, l'accumulation de transcrits *FIB1b* que l'on observe en conditions de déshydratation n'est pas observable au niveau protéique, contrairement à ce qui avait été montré chez *Solanum tuberosum* (Gillet *et al.* 1998), ou chez le poivron (Chen *et al.* 1998), mais ce, pour des cultures et des modèles différents. Dans notre cas, on observe que, dans des conditions de stress hydrique où la protéine doit vraisemblablement jouer son rôle, la quantité de protéine n'augmente pas. Ceci peut s'expliquer par une augmentation de la dégradation de la protéine suite au stress et l'accumulation de transcrits observée permettrait de maintenir une quantité de protéine suffisante face à l'augmentation du renouvellement de cette protéine.

Nous avons pu observer par des expériences d'immunodétection que la protéine FIB1b s'accumulait dans des feuilles qui jaunissent. Le phénotype de ces feuilles apparaissait lors de cultures dans des pots comportant des semis de plusieurs plantes, alors que les pots ne comportant qu'une seule plante, ne montraient pas ce phénotype ; ceci peut être à cause d'un épuisement plus rapide des nutriments dans le 1<sup>er</sup> cas. L'expérience que nous avons menée sur des plantes dont l'arrosage a été ou non complété par de l'engrais prouve que la protéine s'accumule en condition de carence nutritive. Or les feuilles de ces plantes « carencées » semblent entrer en sénescence plus rapidement car leurs feuilles jaunissent plus tôt. On peut alors se demander si l'accumulation de la protéine FIB1b dans ce cas, est imputable au déficit nutritif ou à des conditions de stress qui se mettent en place lors de la sénescence « favorisée » par la carence. Dans ce dernier cas, le déficit nutritif ne serait qu'une cause indirecte de cette réponse, qui jusqu'à présent, a été caractérisée comme conséquence de conditions de stress.

Malgré la faible efficacité de détection par notre anticorps, nous avons révélé la présence des protéines FIB 3a, 3b dans les feuilles sénescentes d'*Arabidopsis thaliana*. Nous ne pouvons pas distinguer la protéine FIB3a de son paralogue FIB3b car notre anticorps reconnaît les deux polypeptides. Cependant, lors de nos expériences de RT-PCR, il nous a fallu opérer plus de cycles d'amplification pour obtenir un signal pour *FIB3b* que pour *FIB3a*. Il semble donc que *FIB3b* soit exprimé plus faiblement que *FIB3a*, du moins dans les feuilles.

Pour les différents stress envisagés, *FIB3b* semble induit et son profil d'expression est assez similaire à celui des *FIB1a*. *FIB3a*, lui, montre un profil d'expression relativement constitutif comparable à celui de *FIB2* quelles que soient les conditions testées. Or d'après notre analyse de sa zone promotrice (§ 1.4), *FIB3a* présente une insertion d'un fragment du promoteur du gène *PRXQ*. On aurait pu penser que l'expression de *FIB3a* pourrait être soumise (en partie au moins) aux mêmes types de régulation qui s'opèrent pour le gène *PRXQ*. En effet, ce gène est impliqué dans la défense contre les ROS, qui induisent son expression (Horling *et al.* 2003). Pourtant, l'expression du gène *FIB3a* ne semble pas influencée par les stress que nous avons appliqués, qui conduisent en partie à un stress oxydant produisant des ROS. Une étude de cette zone promotrice permettrait de déterminer si celle-ci influence la régulation de l'expression du gène *FIB3a*, peut être en répondant aux mêmes mécanismes de régulations survenant chez *PRXQ*. Il est intéressant de noter qu'une protéine plastidiale (thioredoxine CDSP32) caractérisée pour son induction au cours d'un stress de déshydratation chez la pomme de terre (Pruvot *et al.* 1996b, Rey *et al.* 1998, Broin *et al.* 2000) interagit avec PRXQ d'*Arabidopsis thaliana* (Rey *et al.* 2005).

## Chapitre 3

# **Fonction des fibrillines**

### **3 TENTATIVE D'APPROCHE DE LA FONCTION DE LA FIBRILLINE**

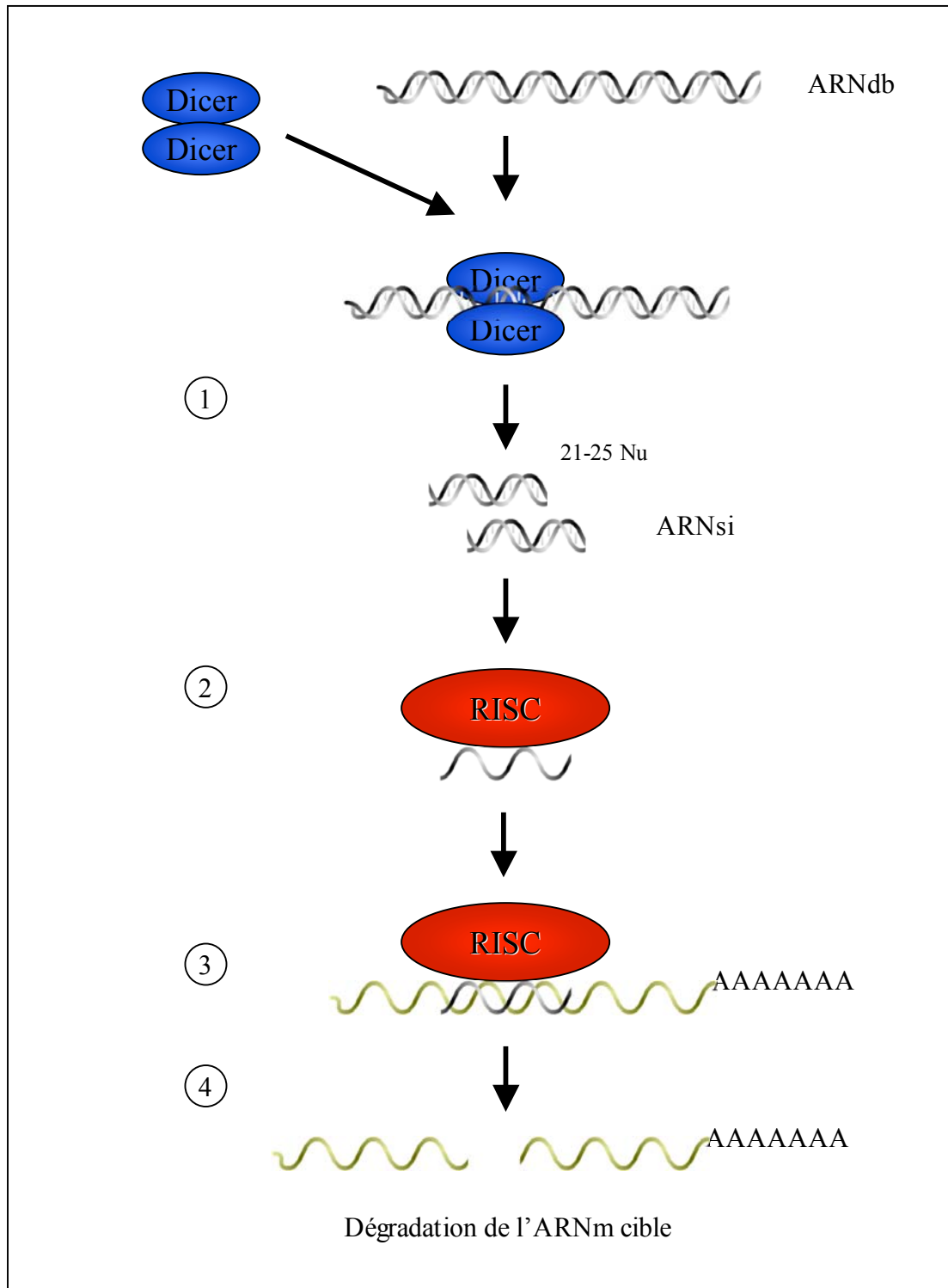
Les fibrillines déjà caractérisées sont impliquées dans deux types de phénomènes (Introduction § 4.3) : la formation de structures macromoléculaires incluant des caroténoïdes dans les chromoplastes de poivron (Deruere *et al.* 1994b), mais aussi la réponse à différents stress au niveau des organes verts (Eymery et Rey 1999, Rey *et al.* 2000). Cependant, nous ne disposons pas de plus d'information quant à la fonction précise des protéines de cette famille chez *Arabidopsis thaliana*.

Pour appréhender la fonction d'un gène, on peut utiliser la technique de génétique inverse qui se base sur l'analyse du phénotype de plantes mutantes dans le gène d'intérêt, c'est à dire des plantes qui n'expriment plus la protéine codée, ou alors une forme inactive de celle-ci. L'analyse du phénotype de l'individu permet alors de déterminer la fonction du gène inactivé. Deux techniques sont entre autres disponibles chez les plantes. On peut utiliser d'une part des lignées d'insertions d'ADN-T dans le gène d'intérêt, dont les individus ne peuvent plus exprimer la protéine codée par le gène (lignées KO pour un seul gène). D'autre part, on peut recourir à la technique de « l'ARN interférence », qui permet de diminuer par « silencing » l'expression d'un ou plusieurs gènes d'intérêt.

#### **3.1 PRODUCTION DE PLANTES ARNi POUR LES GÈNES *FIB1A*, *1B*, *2***

##### **3.1.1 La technique d'« ARN interférence »**

Parmi les membres de la famille fibrilline que nous étudions ici, les plus proches du gène de la fibrilline de poivron, représentés par la sous-famille 1-2 des fibrillines d'*Arabidopsis thaliana*, sont très similaires entre eux, notamment *FIB 1a* et *1b* (76% d'identité). Il est donc probable que l'inactivation de l'un des gènes soit compensée par les autres gènes de la sous-famille 1-2. Nous avons donc opté pour l'ARN interférence qui permet l'inactivation partielle de gènes, mais qui a l'avantage de pouvoir jouer sur l'expression de plusieurs gènes en même temps. En effet, si il existe une redondance de fonction entre ces protéines, l'analyse de mutants KO dans lesquels un seul gène serait inactivé par insertion, pourrait être fastidieuse car les autres membres de la famille de ce gène peuvent compenser l'effet de la mutation. Il faudrait alors obtenir un individu double ou triple mutant pour espérer voir un phénotype. Ceci implique de nombreux croisements et la recherche d'homozygotes double/triple mutants.



**Figure 26 : Schéma du mécanisme de « l'ARN interférence » (ARNi) d'après Waterhouse *et al.* 2003.**

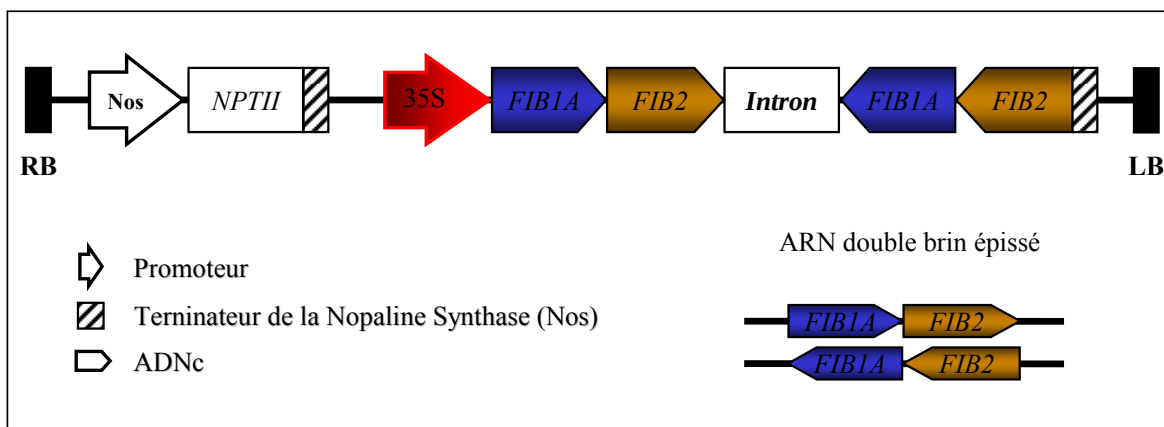
- ① : Digestion de l'ARN double brin par le complexe Dicer en petits ARNsi de 21 à 25 nucléotides.
- ② : Association des ARNsi avec le complexe RISC et élimination de l'un des brins.
- ③ : Hybridation de l'ARNm cible complémentaire à l'ARNsi.
- ④ : Dégradation de l'ARNm cible.

D'autre part, si les gènes sont situés sur un même chromosome, il faut en plus qu'un événement de recombinaison ait lieu pour obtenir un double mutant.

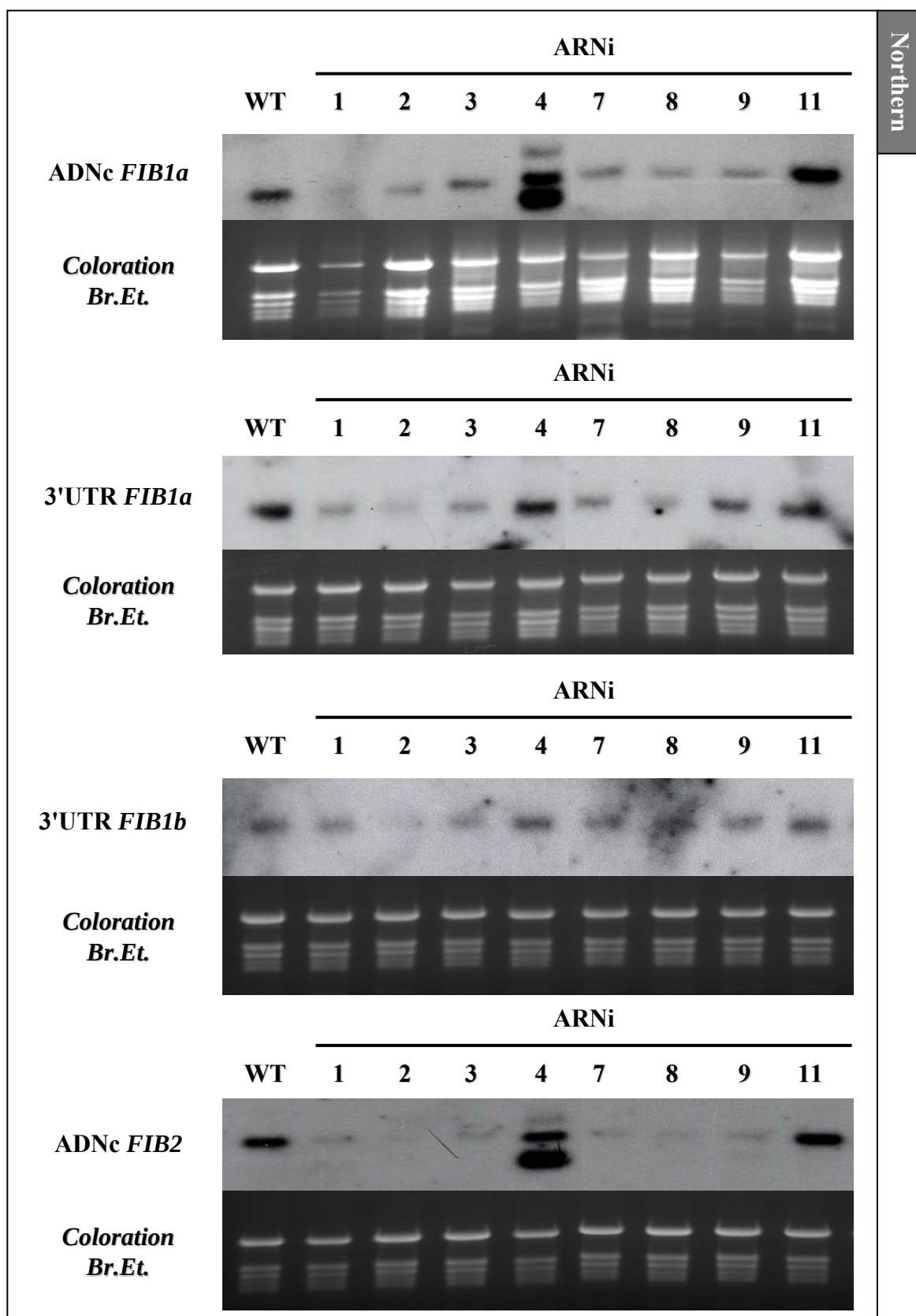
La technique de l'ARN interférence provient de l'utilisation d'un mécanisme naturel d'extinction de gènes, initialement connu sous le nom de PTGS (post-transcriptionnal gene silencing), qui serait un point clef dans la défense contre les virus (Waterhouse *et al.* 2001) ou un moyen de réguler l'expression de gènes (Hunter et Poethig 2003, Kidner et Martienssen 2003). Ce phénomène passe par la formation d'ARN doubles brins (Waterhouse *et al.* 2001) qui sont ensuite digérés en petits fragments appelés ARNsi (small interfering RNA) de 21 à 25 nucléotides grâce à l'enzyme « Dicer » (Figure 26). Ces petits ARN vont permettre la reconnaissance spécifique des ARNm endogènes auxquels ils sont complémentaires grâce à un complexe RISC (RNA Induced Silencing Complex) dont l'activité nucléase permettra la dégradation (Hannon 2002, Pickford et Cogoni 2003, Tijsterman *et al.* 2002). Ce mécanisme a été utilisé pour diminuer l'expression d'un gène d'intérêt par l'expression ectopique d'un ARN double brin lui correspondant (Waterhouse et Helliwell 2003).

### 3.1.2 Production et analyse de plantes ARNi *FIB1-2*

Nous avons choisi d'essayer d'inactiver les gènes *FIB 1a*, *1b* et *2* à la fois, en introduisant une construction comprenant les ADNc des gènes *FIB 1a* et *2* contigus en répétition inversée et séparée par un intron (Figure 27). *In vivo*, l'épissage de l'intron conduira à la formation d'un ARN double brin comprenant les séquences des ADNc de *FIB1a* et *FIB2*. De part leur grande similarité de séquence et la présence de plusieurs séquences de 21pb identiques, les expressions de *FIB1a* et *FIB1b* devraient être toutes deux affectées par cette construction, ainsi que celle de *FIB2* (Wesley *et al.* 2001).



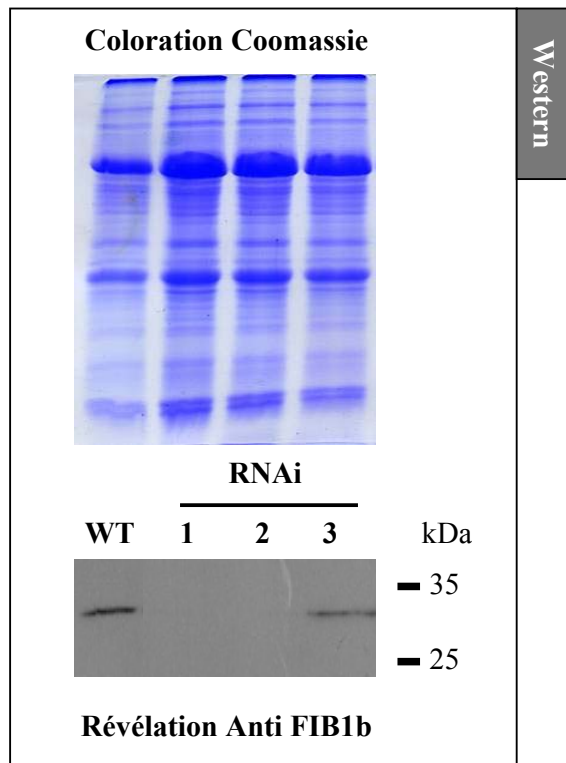
**Figure 27 :** Schéma de la construction génique ARNi introduite chez *Arabidopsis thaliana*. L'ARN double brin obtenu *in vivo* après épissage de l'intron est schématisé.



**Figure 28 : Profil d'expression des fibrillines *AtFIB1a*, *1b* et 2 dans des lignées ARNi *FIB1-2* d'*Arabidopsis thaliana*.**

Extraction des ARN totaux de feuilles. Le gel d'ARN coloré au Br.Et. est visualisé sous UV pour le contrôle de charge. La sonde utilisée pour l'hybridation est indiquée.

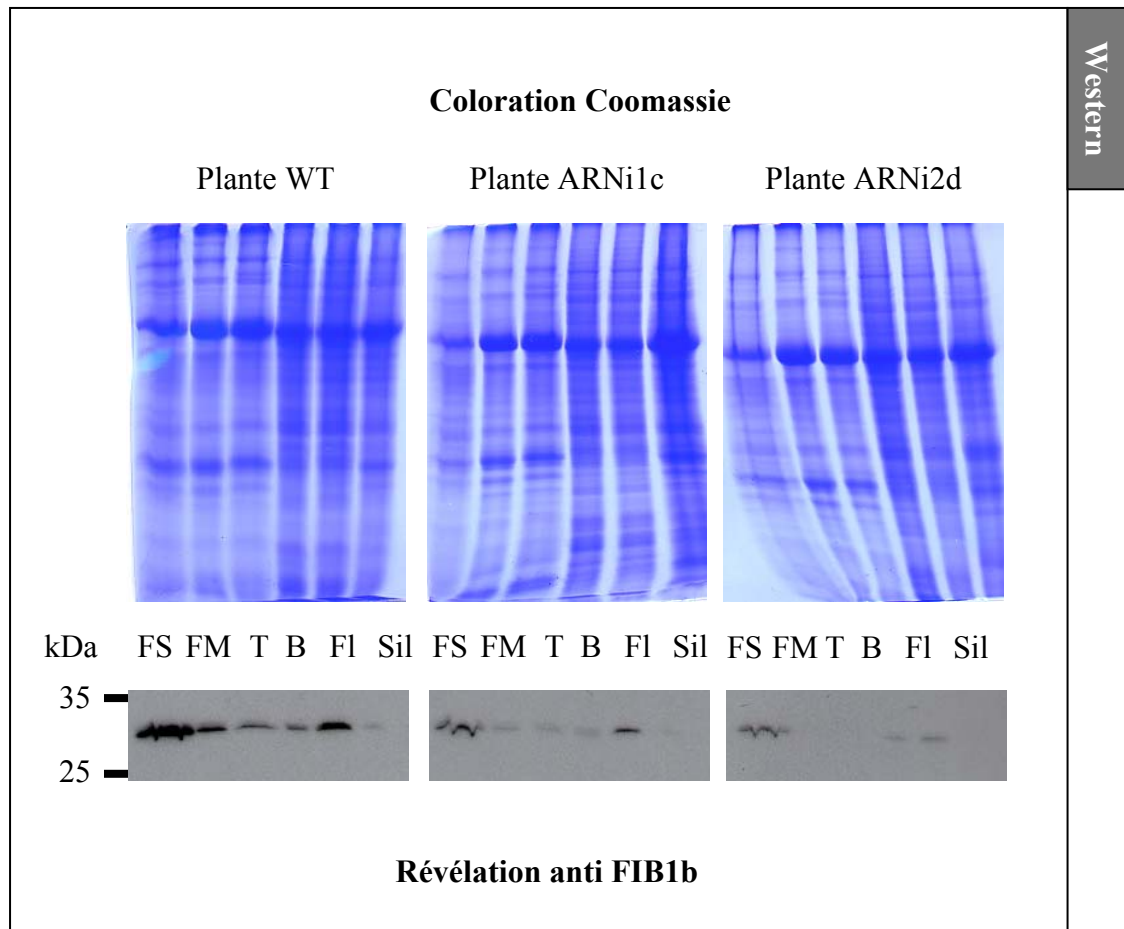
Cette construction a été introduite chez *Arabidopsis thaliana* par « transformation stable », et nous avons analysé l'expression des gènes *FIB 1a*, *1b*, et *2* dans 8 lignées transformées. La figure 28 montre les résultats obtenus. Le premier northern blot correspond à la détection des transcrits correspondants aux 2 gènes *FIB 1a* et *1b* grâce à une sonde comportant la séquence ADNc de *FIB1a*. La similarité de séquence de ces deux gènes conduit à la détection des deux types d'ARNm en même temps par la sonde *FIB1a* parmi les ARN totaux issus des transformants primaires. Comme on peut le constater, les lignées 1, 2, 3, 7, 8 et 9 montrent une diminution de l'accumulation des transcrits des 2 gènes par rapport à la lignée sauvage (wt), ce qui n'est pas le cas des lignées 4 et 11. La lignée 4 montre d'ailleurs un doublet non expliqué. Nous avons suivi séparément l'expression des 3 gènes *FIB 1a*, *1b* et *2* en utilisant des sondes spécifiques correspondants aux régions 3'UTR de *FIB1a* ou de *FIB1b* ou l'ADNc de *FIB2* sur les ARN totaux de ces lignées. On remarque pour chacun de ces 3 gènes fibrilline, une forte diminution de l'accumulation de leurs transcrits respectifs, sauf pour les lignées 4 et 11 comme vu précédemment. Les lignées présentant les plus fortes extinctions d'expression étant les lignées 1 et 2. Les bandes supplémentaires que l'on observe dans la lignée 4 sont révélées lors de l'utilisation de sonde ADNc de *FIB1a* ou *FIB2*, mais pas avec les sondes 3'UTR de *FIB1a* ou *FIB1b*. Or, ces sondes ADNc peuvent reconnaître le transgène, les bandes supplémentaires correspondent donc probablement aux transcrits de celui-ci.



**Figure 29 : Détection de la protéine FIB1b par western blot dans les feuilles de plantes sauvages et de lignées ARNi FIB1-2 d'*Arabidopsis thaliana*.**

La révélation est effectuée avec l'anticorps anti AtFIB1b purifié.

Une quantité équivalente de protéines a été chargée dans chaque puit. La position des marqueurs de taille est indiquée.



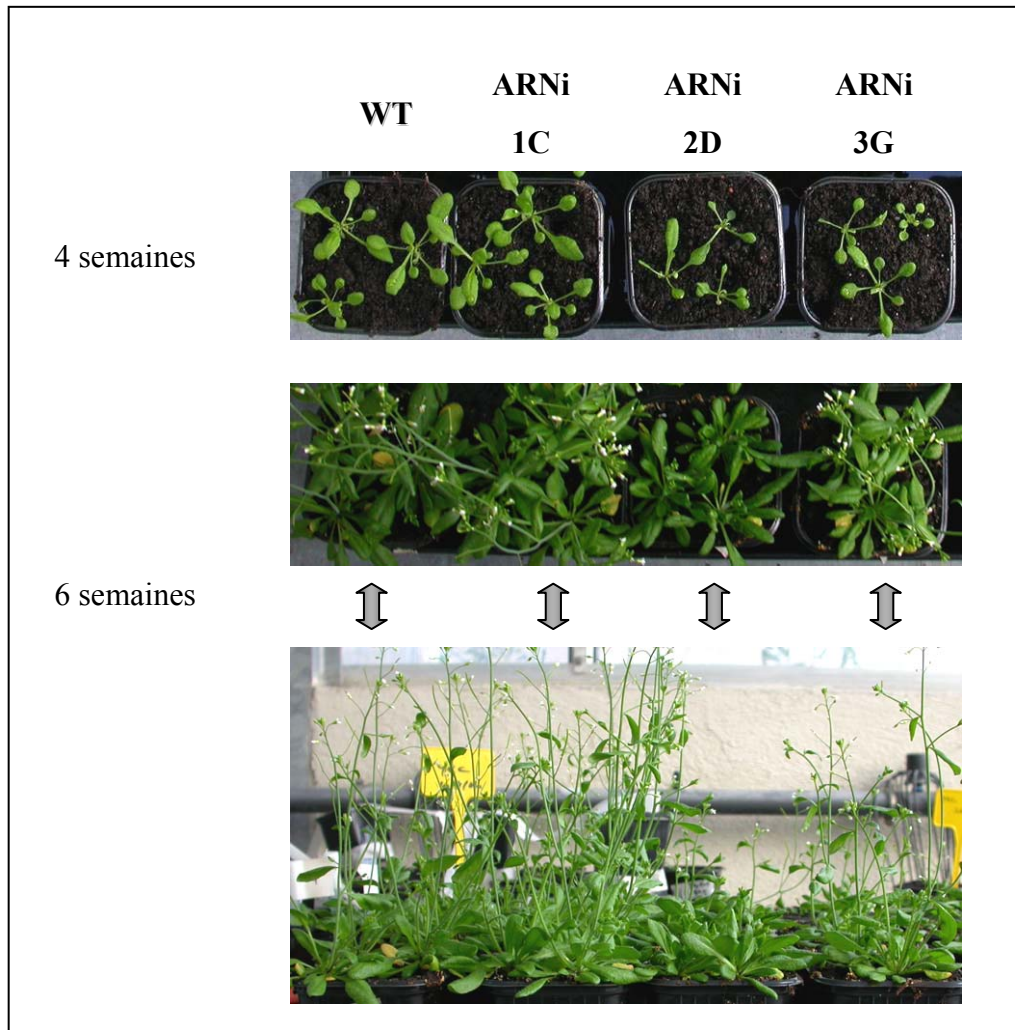
**Figure 30 : Accumulation de la protéine FIB1b dans les différents organes des lignées ARNi *FIB1-2* d'*Arabidopsis thaliana* (Coomassie et western blot).**

La révélation est effectuée avec l'anticorps anti AtFIB1b purifié. La position des marqueurs de taille est indiquée.

FS : Feuilles Sénescentes ; FM : Feuilles Matures ; T : Tiges ; B : Boutons Floraux ; Fl : Fleurs ; Sl : Siliques ; R : Racines.

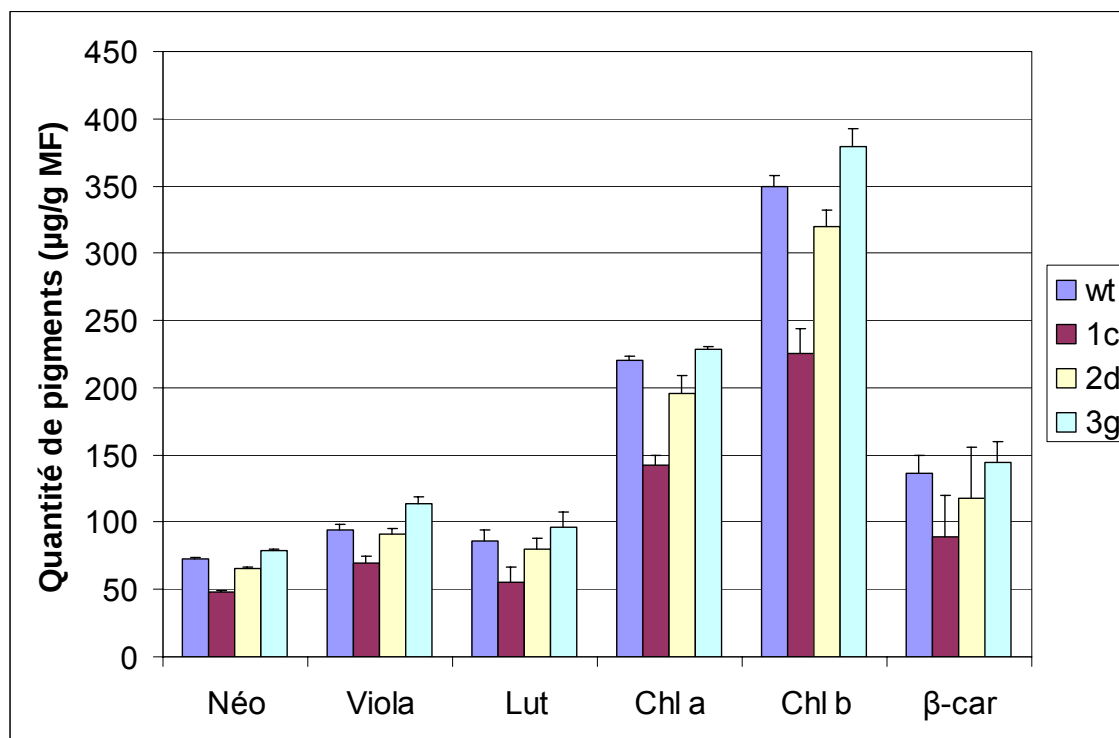
Nous avons ensuite analysé la quantité de protéines FIB1b dans ces lignées ARNi, tout d'abord dans les transformants primaires correspondants. Par immunodétection avec l'anticorps anti FIB1b, nous n'observons aucun signal dans les lignées ARNi 1 et 2, alors que la lignée 3 présente une faible quantité de la protéine, plus faible que dans la lignée sauvage (Figure 29). La quantité de protéine FIB1b a ensuite été analysée dans la descendance de ces lignées, obtenue par autofécondation. Les lignées ARNi 1c et 2d ont été caractérisées comme homozygotes pour la construction ARNi et sont, par conséquent, susceptibles de présenter un phénotype d'extinction de l'expression de gènes *FIB* important. La figure 30 présente les résultats obtenus par western blot en utilisant l'anticorps anti FIB1b dans les différents organes de ces plantes. Chez la plante sauvage, on retrouve le même profil que celui obtenu précédemment (à noter que cette fois les racines n'ont pas été incluses). Pour les lignées ARNi 1c et 2d, on peut remarquer que la quantité de FIB1b détectée est moins importante que dans le sauvage (par rapport à la quantité de protéines totales), ceci pour tous les organes. Cette diminution globale de la quantité de protéine concorde avec la baisse de la quantité de transcrits que nous avons observée, produite par l'interférence ARN. L'ensemble de ces résultats indique que nous n'avons pu obtenir dans ce cas précis qu'au mieux une forte diminution de la quantité de protéine présente dans les plantes, mais en aucun cas une disparition complète.

Dans un premier temps, nous n'avons pas décelé de phénotype particulier chez ces plantes ARNi, quelles que soient les conditions dans lesquelles nous avons pu cultiver ces lignées. Des stress de type forte lumière ou déshydratation n'ont pas donné de différence notable. Nous supposons que la petite quantité de protéines qui persiste suffit au bon développement de la plante dans les conditions testées. D'autres individus de ces lignées ont été semés en serre (où la température a fluctué de 10 à 24°C) et dans ces conditions, nous avons vu apparaître une différence de croissance entre les lignées (Figure 31). En effet, alors que les lignées sauvages (wt) et ARNi 1c montrent des plantes de 4 semaines de taille comparable, les lignées ARNi 2d et 3g montrent des plantes accusant un léger retard de croissance par rapport aux lignées sauvages et ARNi 1c, caractérisée par une paire de feuilles en moins et une taille des feuilles réduite de moitié. Cette différence se maintient également à 6 semaines lorsque les plantes sauvages et ARNi 1c ont déjà plusieurs fleurs matures, alors que la lignée ARNi 3g ne comporte que quelques jeunes inflorescences et que les inflorescences de la lignée 2d commencent à peine à se développer. La croissance des plantes de la lignée ARNi 2d, qui possède le niveau d'expression et la quantité de protéine FIB 1b les plus faibles, est visiblement la plus affectée.



**Figure 31 :** Phénotype de plants d'*Arabidopsis thaliana* de 3 lignées ARNi *FIB1-2* . Les plantes ont poussé à une température de 15°C.

Nous savons que l'un des rôles de la fibrilline est lié au stockage des caroténoïdes dans les fleurs ou les fruits colorés et qu'elle semble liée aux membranes thylacoïdiennes qui contiennent également des caroténoïdes nécessaires à la photosynthèse. Nous avons donc étudié si les modifications de la quantité de protéine FIB1b dans les lignées ARNi que nous avons observées jusqu'ici ont des répercussions sur la quantité de pigments caroténoïdiens dans ces même lignées. Nous avons pour cela mesuré le contenu en pigment de feuilles matures par HPLC. Les résultats obtenus sont consignés dans l'histogramme de la Figure 32. Ils montrent une diminution du contenu en chlorophylles et en caroténoïdes dans les lignées ARNi par rapport à la lignée sauvage. Cette diminution est d'environ 30% pour la lignée ARNi 1c, de moins de 10% pour la lignée 2d et la lignée 3g ne montre pas de différence, voire une quantité légèrement accrue de chlorophylles et de caroténoïdes. Cependant, ces différences de contenu en pigments ne correspondent pas aux différences que l'on peut observer au niveau de l'expression des protéines FIB ou du phénotype.



**Figure 32 :** Analyse par HPLC du contenu en pigments de feuilles d'*Arabidopsis thaliana* de lignées sauvages et ARNi *FIB1-2*.

Néo : néoxanthine, Viola : violaxanthine, Lut : lutéine, Chl a : chlorophylle a, Chl b : chlorophylle b, β-car : β-carotène. Les résultats sont à la masse fraîche (MF).

### 3.1.3 Production et analyse de plantes ARNi *FIB3a-b*

Afin d'étudier la fonction des protéines codées par la sous-famille 3a-3b, nous avons à nouveau utilisé l'approche ARNi pour diminuer l'expression de ces deux gènes. En effet, ces derniers étant l'un à la suite de l'autre sur le chromosome 3 d'*Arabidopsis thaliana* (Figure 13), l'obtention d'une lignée double KO par croisements de lignées simple KO de chacun des deux gènes, nécessiterait un événement de recombinaison chromosomique entre ces deux gènes consécutif, ce qui est un événement très peu probable.

Nous avons analysé l'accumulation des transcrits de ces deux gènes dans les six lignées ARNi. Les résultats des northern blot montrent qu'aucune des 6 lignées obtenues ne comporte de diminution de l'expression des gènes *FIB 3a* et *3b*. Cette absence d'effet pourrait être due à une faible efficacité de la construction provoquée par un effet « de position » au niveau du site d'insertion dans nos 6 lignées. Une autre explication est que l'un des membres (ou les deux) de cette sous-famille est indispensable à la croissance des plantes et que par conséquent, seules les lignées présentant une suppression faible ou nulle de l'expression de ces gènes sont viables. Ce point reste à éclaircir.

## 3.2 CONCLUSIONS SUR LA FONCTION DES FIBRILLINES

Nous avons montré dans le paragraphe 1 qu'il existe une famille de gène *FIB* comportant 13 membres formant 10 groupes. Pour tenter d'appréhender la fonction de cette famille de gènes, nous avons produit une lignée transgénique comportant une construction de type ARNi permettant de diminuer l'expression de la sous-famille *FIB1-2* d'*Arabidopsis thaliana*. Les plantes qui en découlent montrent un défaut de croissance par rapport aux plantes sauvages et le phénotype est d'autant plus visible que la quantité de protéines est plus faible chez la lignée ARNi. Différentes études suggèrent deux rôles pour ce type de protéines : un premier qui est de former des structures permettant de stocker les caroténoïdes qui s'accumulent dans certains organes (Deruere *et al.* 1994b), un deuxième est lié à la nécessité de maintenir la stabilité des membranes, notamment dans les thylacoïdes lors de conditions de stress (Eymery et Rey 1999, Rey *et al.* 2000). Si on analyse plus largement le rôle « biochimique » des fibrillines, ces deux fonctions se résument en un maintien de structures membranaires, lipidiques/hydrophobes dans un milieu aqueux cellulaire. Ceci recouvre la fonction de stockages des pigments caroténoïdiens hydrophobes, et celle de maintien de l'intégrité des membranes thylacoïdiennes lors de stress. On peut alors supposer que la fonction première de cette protéine lors de son apparition au cours de l'évolution est le maintien de l'intégrité des

membranes et que le stockage des caroténoïdes au sein d'ultrastructures stables a été favorisé par cette protéine ancestrale.

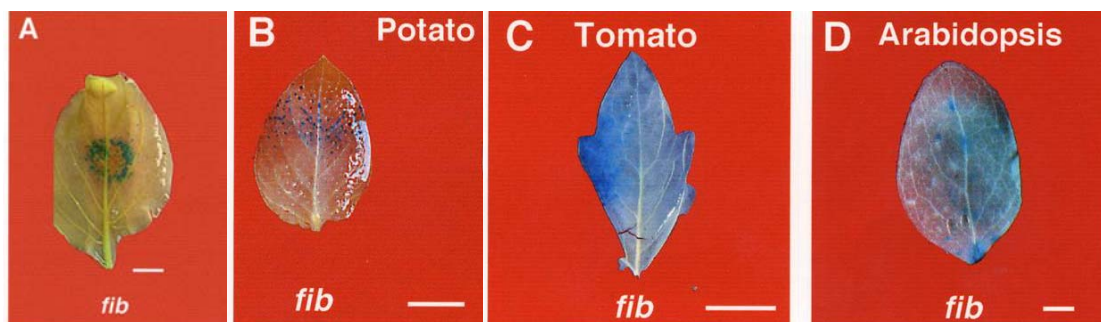
Le rôle de la protéine fibrilline au niveau des membranes thylacoïdiennes dans la réponse à au stress permettrait d'expliquer le retard de croissance observé chez nos lignées transgénique ARNi. Une sensibilité aux stress plus importante, causée par la diminution de la quantité de protéines FIB1-2 disponible dans ces lignées, diminuerait l'efficacité du métabolisme. La conséquence de ceci serait le retard de croissance observé dans ces lignées, qui se manifeste également par une floraison plus tardive. C'est exactement le phénotype inverse de ce qui a été observé chez des plants de tabac transgéniques sur-exprimant la fibrilline de poivron constitutivement (Rey *et al.* 2000). La « fonction protectrice » de la fibrilline permettrait un meilleur développement de la plante en réponse aux conditions environnementales. Cependant, ce phénotype reste à confirmer et des études plus approfondies des ces lignées ARNi permettront de mieux cerner le rôle des protéines de type fibrilline, comme par exemple, l'analyse de l'efficacité de la photosynthèse.

## Chapitre 4

# **Recherche de régulateurs du promoteur de la fibrilline**

#### **4 RECHERCHE DE RÉGULATEURS DU PROMOTEUR DE LA FIBRILLINE PAR UNE APPROCHE GÉNÉTIQUE**

Le gène de la fibrilline de poivron a fait l'objet de nombreuses études qui montrent une induction lors de la différenciation des chromoplastes (Deruere *et al.* 1994b, Pozueta-Romero *et al.* 1997) ou de la réponse à un stress (Kuntz *et al.* 1998, Chen *et al.* 1998, Manac'h et Kuntz 1999). Ces études indiquent également que ce gène est généralement soumis à une régulation transcriptionnelle. Afin de mieux comprendre la régulation et l'implication du gène *FIB* dans la réponse au stress, nous avons donc développé une approche génétique de recherche de mutant de régulation du promoteur de la fibrilline de poivron. Cependant, le poivron n'étant pas adapté à une approche génétique, nous avons choisi d'utiliser *Arabidopsis thaliana* comme plante modèle. Des essais de biolistique ont montré que le promoteur de la fibrilline de poivron peut être induit chez d'autres plantes comme la tomate ou *Arabidopsis thaliana* (Figure 33, Langenkämper *et al.* 2001). Les mécanismes de réponse au stress du promoteur de la fibrilline sont donc relativement bien conservés au sein des plantes, ce qui suggère que nous puissions utiliser ce promoteur chez d'autres plantes pour la recherche de ses régulateurs.

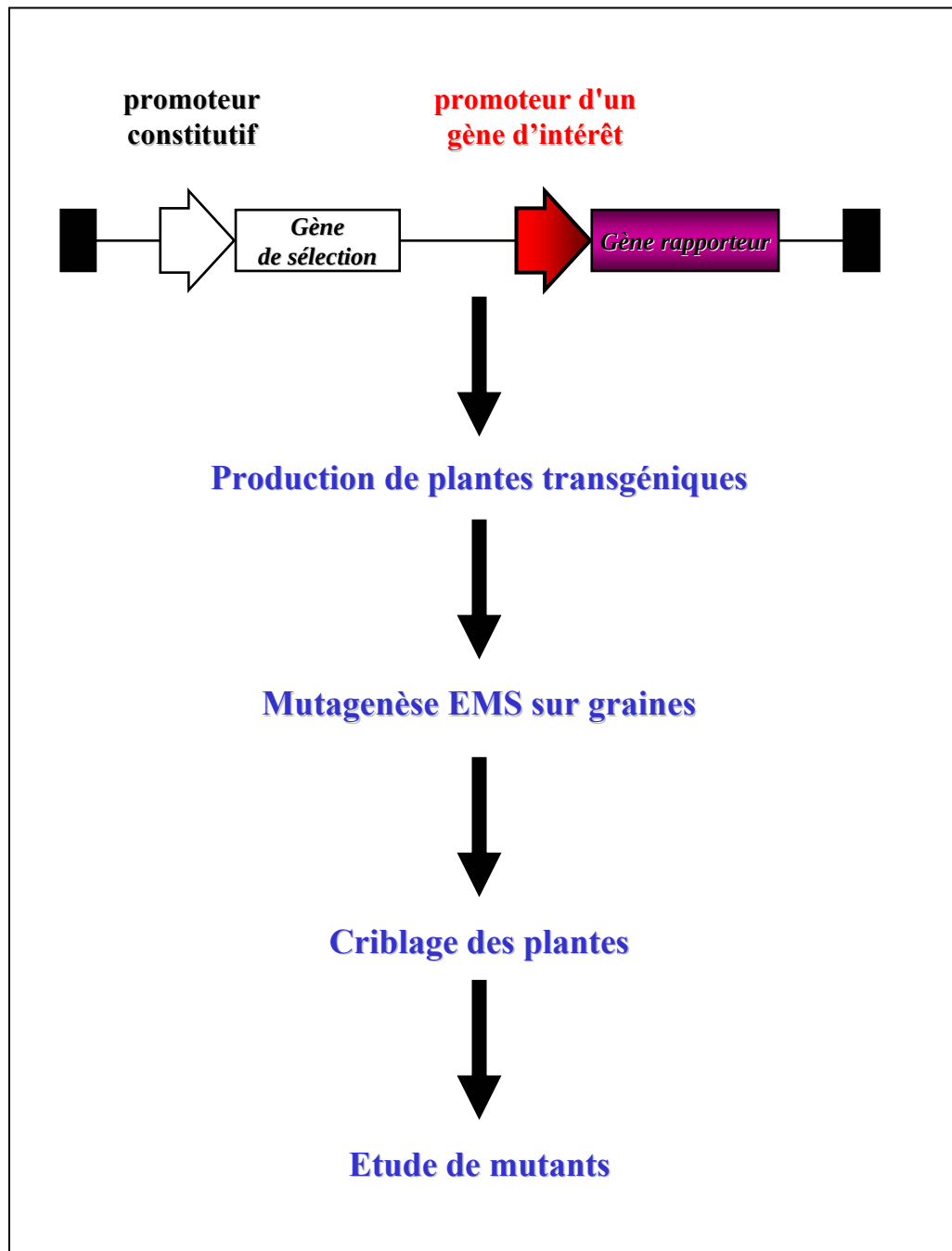


**Figure 33 :** Induction du promoteur *pFIB* de poivron contrôlant l'expression du gène rapporteur *GUS*, visualisée par coloration histochimique de feuilles de différentes plantes lors de transformations par biolistique (G. Langenkämper *et al.* 2001).

A : Feuille de poivron, B : Feuille de pomme de terre, C : Feuille de tomate, D : Feuille d'*Arabidopsis thaliana*.

##### **4.1 PRINCIPE DE L'APPROCHE**

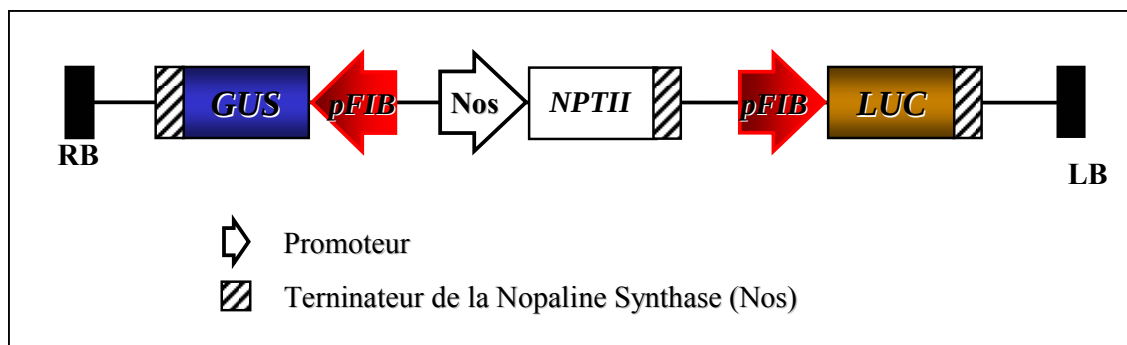
Le principe est d'obtenir une construction génique comportant un gène rapporteur dont l'expression est contrôlée par le promoteur d'intérêt, en l'occurrence celui du gène *FIB* de



**Figure 34 :** Schéma du principe de l'approche génétique de recherche de mutants de régulation du promoteur de la fibrilline.

poivron et de l'introduire chez *Arabidopsis thaliana*. Une population de plantes transgéniques est ensuite produite, mutagenisée et criblée. Le but est de trouver des mutants dont l'activité du gène rapporteur dirigée par le promoteur de la fibrilline de poivron est altérée, en vue de caractériser le(s) gène(s) impliqué(s) dans la régulation de ce promoteur (Figure 34).

Nous avons choisi d'utiliser une construction double : elle comprend deux copies du promoteur de la fibrilline de poivron, chacune contrôlant l'expression d'un gène rapporteur, à savoir le gène de la luciférase (*LUC*) et le gène de la glucuronidase (*GUS*), (Figure 35). L'intérêt de cette double construction est de permettre d'observer facilement l'induction du promoteur de la fibrilline (et ce même *in vivo* grâce à l'utilisation de la luciférase), mais aussi et surtout, de pouvoir discriminer les mutations d'intérêt qui toucheront un régulateur du promoteur de la fibrilline, des mutations non informatives qui auront touché le gène rapporteur observé, ou le promoteur de la fibrilline de poivron que nous avons introduit. Autrement dit, seule une mutation affectant un régulateur du promoteur de la fibrilline modifiera l'expression des deux gènes rapporteurs en même temps. Le vecteur binaire contenant cette construction génique a été utilisé pour transformer *Arabidopsis thaliana*. Pour une étude de ce type, le modèle *Arabidopsis thaliana* regroupe tous les avantages requis (Baudouin et Nam-Hai 1996) : la facilité de culture, les données génomiques et un cycle de vie court.

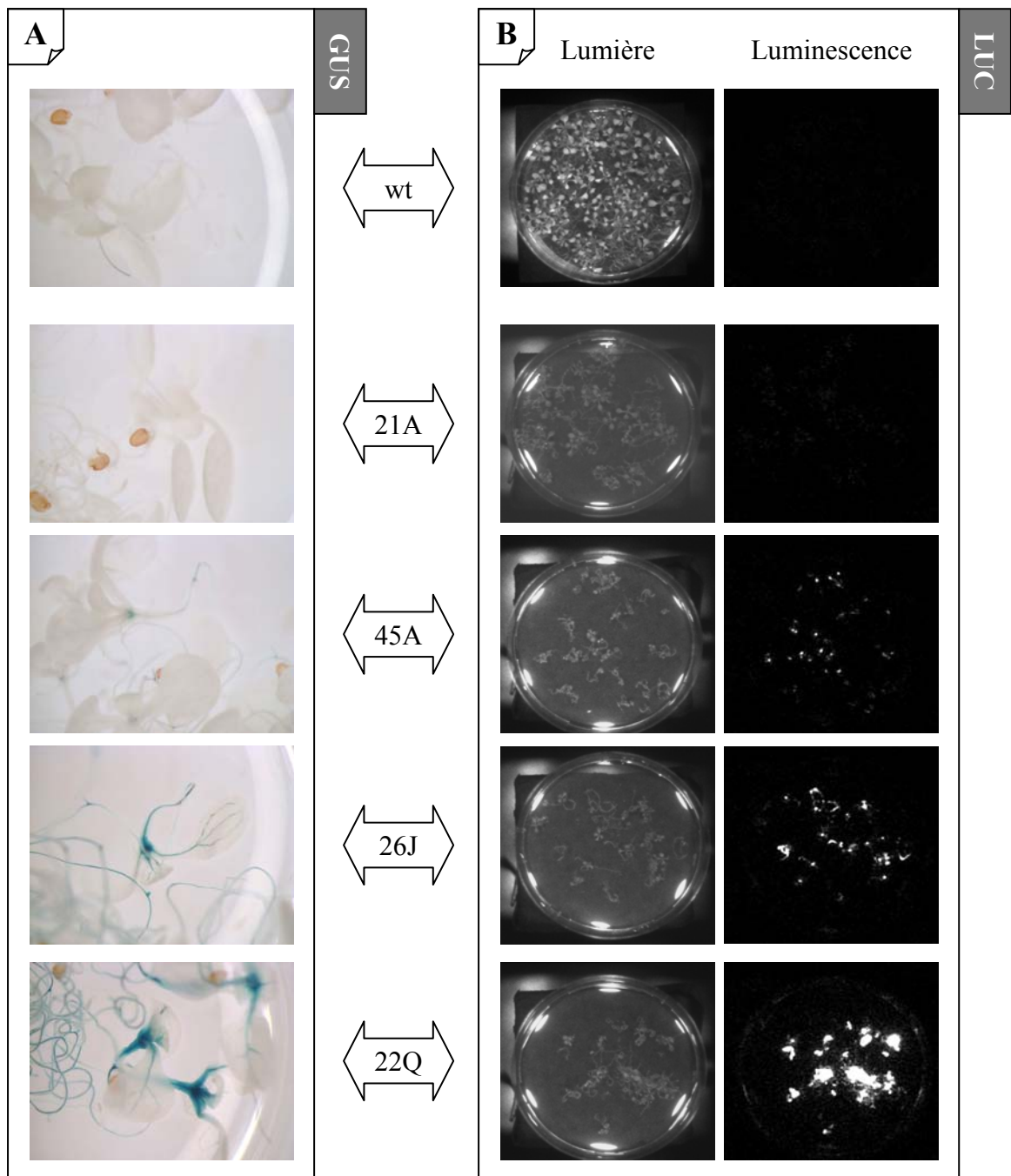


**Figure 35 : Schéma de la construction génique introduite chez *Arabidopsis thaliana*.**

La construction est composée de deux promoteurs de la fibrilline de Poivron, contrôlant chacun l'expression d'un gène rapporteur : la luciférase ou la glucuronidase. Cette construction comprend les terminateurs Nos de la nopaline synthase pour chacun des gènes présents. Le marqueur de sélection est le gène *NPTII* qui code l'enzyme néomycine phosphotransférase qui confère à la plante transformée la capacité de pousser sur un milieu contenant l'antibiotique kanamycine

## 4.2 ÉTUDE DES LIGNÉES TRANSGÉNIQUES

Le transfert génique de la construction chez *Arabidopsis thaliana* écotype Columbia a été effectué par transformation classique par « trempage de fleurs » dans une suspension

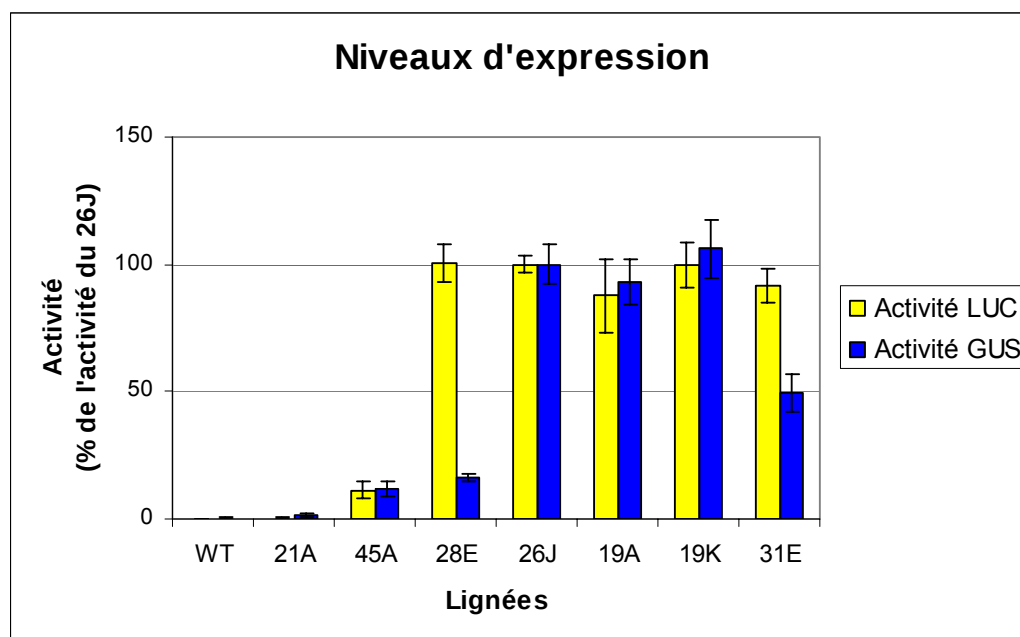


**Figure 36 : Activités glucuronidase et luciférase de plantules d'*Arabidopsis thaliana* de 7 jours sauvages (wt) et de transformants indépendants *pFIB::GUS pFIB::LUC* (21A, 45A, 26J, 22Q).**

A : GUS : Coloration GUS histochimique.

B : LUC : Activité luciférase.

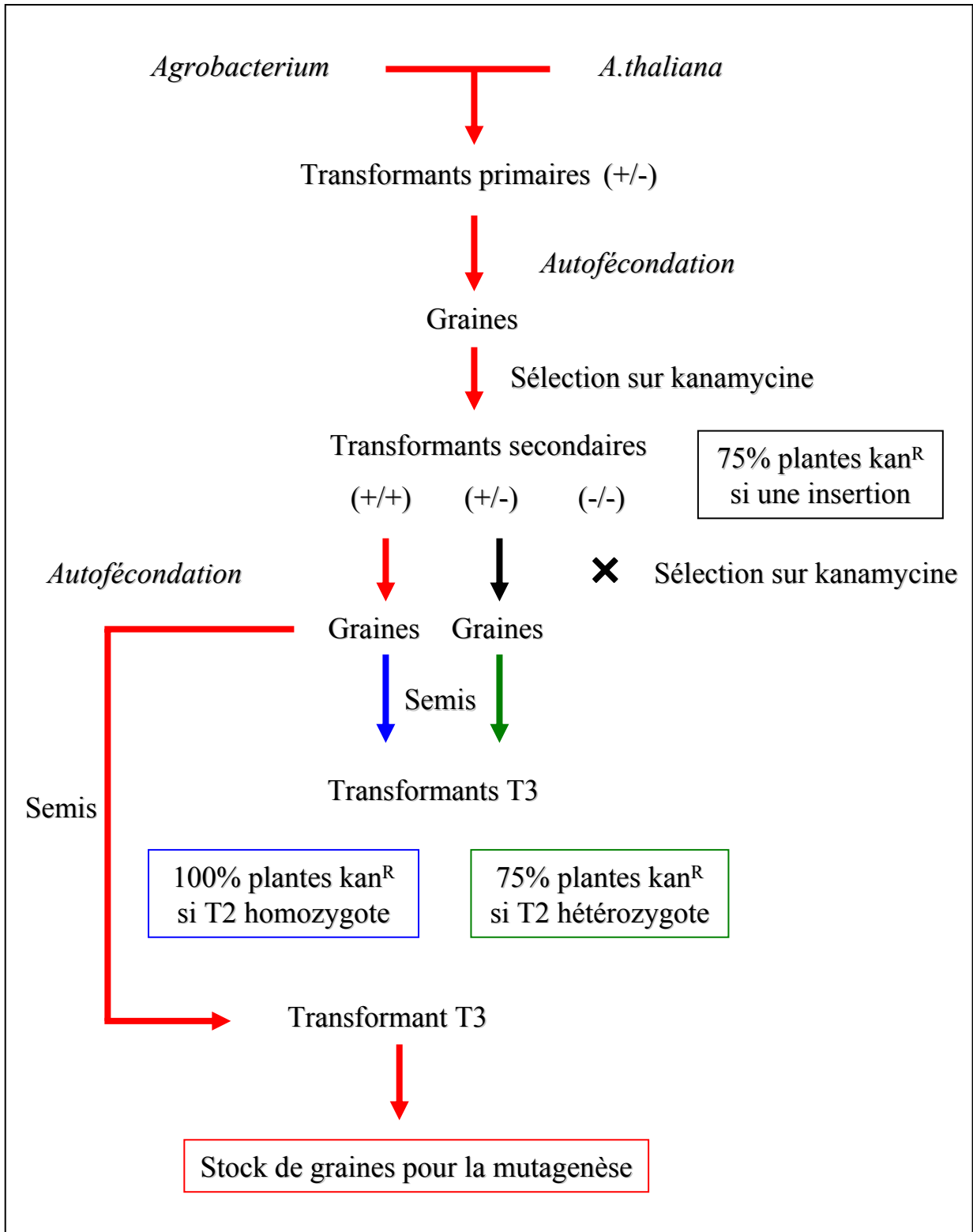
d'*Agrobacterium tumefaciens* (Matériel et Méthodes § 3.1). Nous avons obtenu ainsi une quinzaine de transformants primaires après sélection des plantes sur kanamycine. Nous avons donc testé l'activité des gènes rapporteurs dans la descendance de ces lignées. Sur la figure 36, on peut voir les activités glucuronidase, visualisées par coloration histochimique, et luciférase, pour des plantules de 15 jours de 4 transformants indépendants. Nous pouvons voir ici différents niveaux d'expression des deux gènes rapporteurs, avec des colorations bleues faibles pour les lignées 45A, voir nulles pour la lignée 21A et des colorations plus intenses pour les lignées 26J et 22Q. L'activité luciférase de chacune de ces lignées suit le profil d'intensité décrit pour la coloration histochimique. Ces différences de niveau d'activité des gènes rapporteurs sont attribuées aux effets de position de l'insertion du transgène dans le génome de la plante.



**Figure 37:** Essais quantitatifs d'activités glucuronidase et luciférase de lignées transgéniques indépendantes *pFIB::GUS* *pFIB::LUC* de plantules *d'Arabidopsis thaliana* de 15 jours.

Les valeurs sont données en pourcentages de l'activité de la lignée 26J (LUC :  $25 \cdot 10^6$  RLU/mg protéines, GUS : 3800 pmole 4Mu/min/mg protéine).

Nous avons ensuite voulu caractériser plus précisément les activités des gènes rapporteurs dans ces lignées. Pour cela, nous avons effectué des essais glucuronidase et luciférase quantitatifs sur des extraits de plantes de 15 jours issues de 7 lignées indépendantes. La Figure 37 présente les résultats obtenus. Les résultats sont exprimés en pourcentage de l'expression par rapport à l'activité observée dans la lignée 26J. On retrouve dans ce graphe un niveau



**Figure 38 :** Schéma du principe la recherche d'une lignée homozygote d'*Arabidopsis thaliana* ne contenant qu'un seul évènement d'insertion d'ADN-T pour la production du stock de graines à mutageniser.

(+/+) : Plante homozygote pour le transgène, (+/-) : Plante hétérozygote pour le transgène.

La ségrégation des transgènes est suivie par la sélection des plantule résistantes à la kanamycine (kan<sup>R</sup>). Les flèches rouges indiquent le cheminement et la sélection des plantes conduisant à la production du stock de graine pour la mutagenèse.

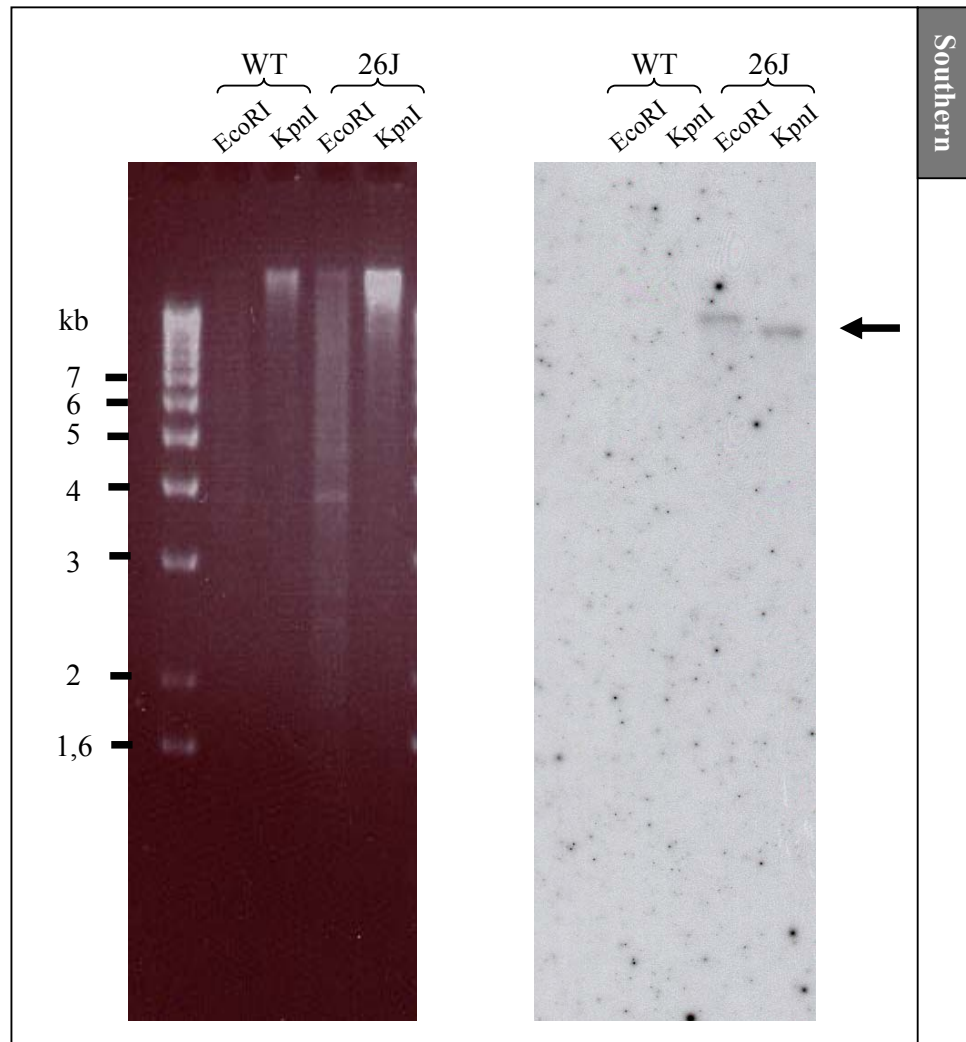
d'activité très faible pour les deux gènes rapporteurs dans la lignée 21A et légèrement plus élevé dans la lignée 45A, comme observé en coloration. Différents niveaux d'activité que ce soit pour le gène rapporteur *GUS* ou le gène *LUC* sont observés, reflétant l'effet de position de l'insertion des transgènes. Cependant, on remarquera que le rapport entre les activités LUC et GUS dans certaines lignées n'est pas du tout équivalent. Par exemple, les lignées 28E et 26J ont une activité LUC du même ordre alors que leurs activités GUS respectives sont différentes d'un facteur 5. Ceci peut s'expliquer par l'action à distance d'éléments de type enhancer. Nous avons pourtant réalisé la construction double avec les promoteurs en position têtes bêtes afin de maintenir ces deux promoteurs dans un environnement « génique » le plus similaire possible.

Afin de faciliter le travail de criblage, il est important d'utiliser une lignée transgénique homozygote et comportant un seul locus d'insertion d'ADN-T. Nous avons donc testé la ségrégation de notre transgène dans la descendance des lignées transgéniques afin de déterminer si il y a eu un ou plusieurs événements d'insertion. Pour cela, nous avons semé les graines issues d'une autofécondation sur milieu contenant le marqueur de sélection : la kanamycine. Si il y a eu insertion à un seul locus, nous devons obtenir une ségrégation de  $\frac{3}{4}$  de plantules résistantes et  $\frac{1}{4}$  de plantules sensibles à la kanamycine (Figure 38). A la génération suivante pour un individu hétérozygote, on doit retrouver deux types de ségrégation, soit 100% de plantes résistantes, soit une ségrégation de  $\frac{3}{4}$ - $\frac{1}{4}$ . Le Tableau 5 regroupe les ségrégations de quelques lignées transgéniques. Ces résultats indiquent donc que les lignées 26J et 22Q ne présentent qu'une seule insertion.

| Transformant<br>primaire | % plantules<br>kana résistantes | Transformant<br>secondaire | % plantules<br>kana résistantes |
|--------------------------|---------------------------------|----------------------------|---------------------------------|
| 21                       | 73                              | 21a                        |                                 |
| 45                       | 78                              | 45a                        | 100                             |
|                          |                                 | autre 45                   | 83                              |
| 28                       | 80                              | 28e                        | 100                             |
|                          |                                 | autre 28                   | 99                              |
| 26                       | 80                              | 26j                        | 100                             |
|                          |                                 | autre 26                   | 77                              |
| 22                       | 77                              | 22q                        | 100                             |
|                          |                                 | autre 22                   | 75                              |

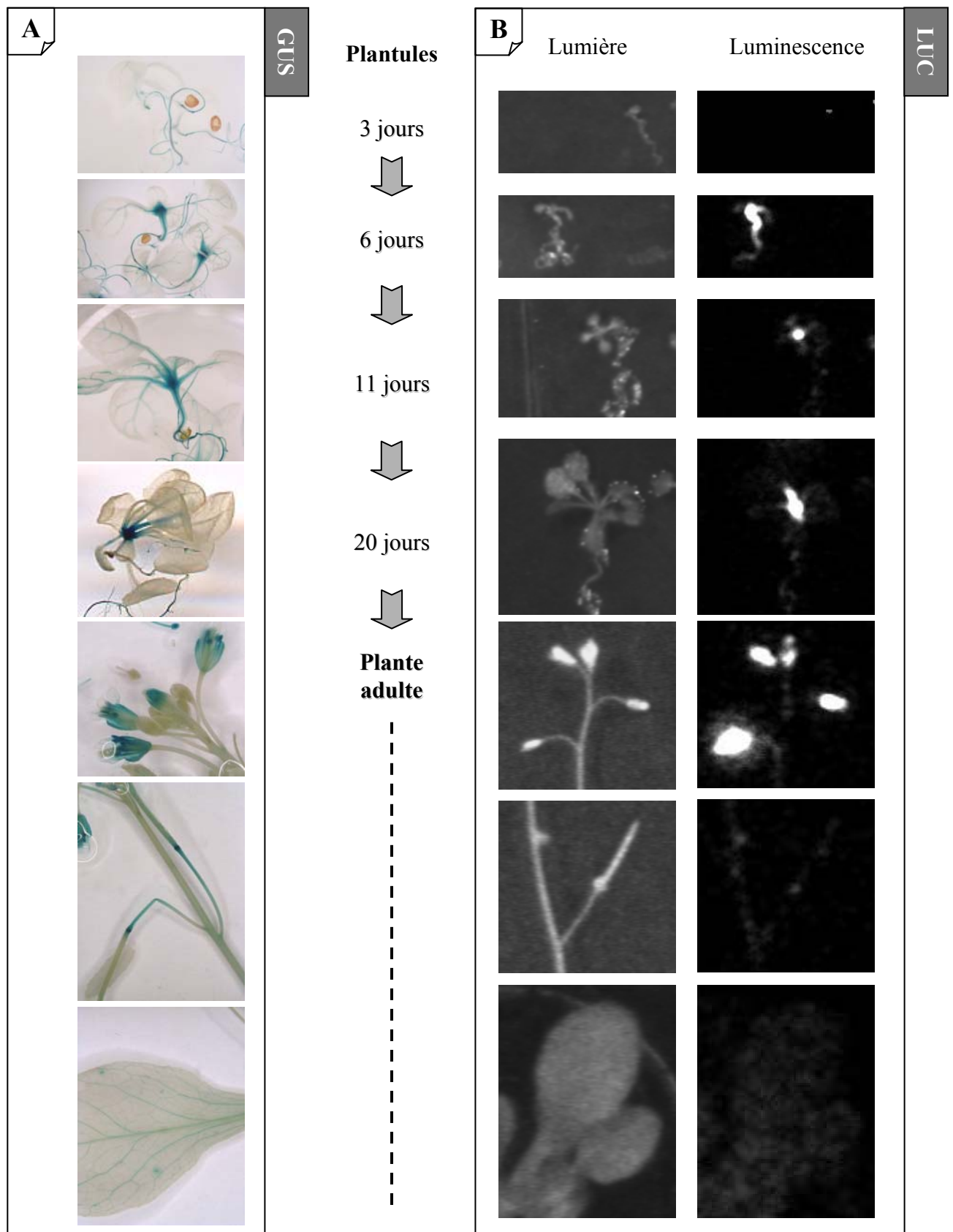
**Tableau 5 :** Ségrégation de lignées indépendantes transformées par *pFIB::GUS* *pFIB::LUC* et de leur descendance selon la résistance à la kanamycine.

D'après l'ensemble de ces résultats, nous avons choisi d'utiliser la lignée 26J pour la suite du projet. Il s'agit en effet d'une lignée montrant une activité moyenne pour chacun des gènes rapporteurs et qui ne comporte qu'une seule insertion de notre construction génique. Nous avons confirmé que la lignée 26J ne présentait qu'une seule insertion par Southern blot avec une sonde spécifique du gène de résistance à la kanamycine. La Figure 39 ne nous montre qu'une seule bande lors de la révélation, que ce soit par la digestion à l'aide de l'enzyme de restriction *EcoRI* qui coupe de chaque côté de la construction insérée, ou que ce soit avec l'enzyme *KpnI* qui ne digère qu'une seule fois dans la partie insérée.



**Figure 39 :** Southern blot de la lignée transgénique 26J d'*Arabidopsis thaliana*.

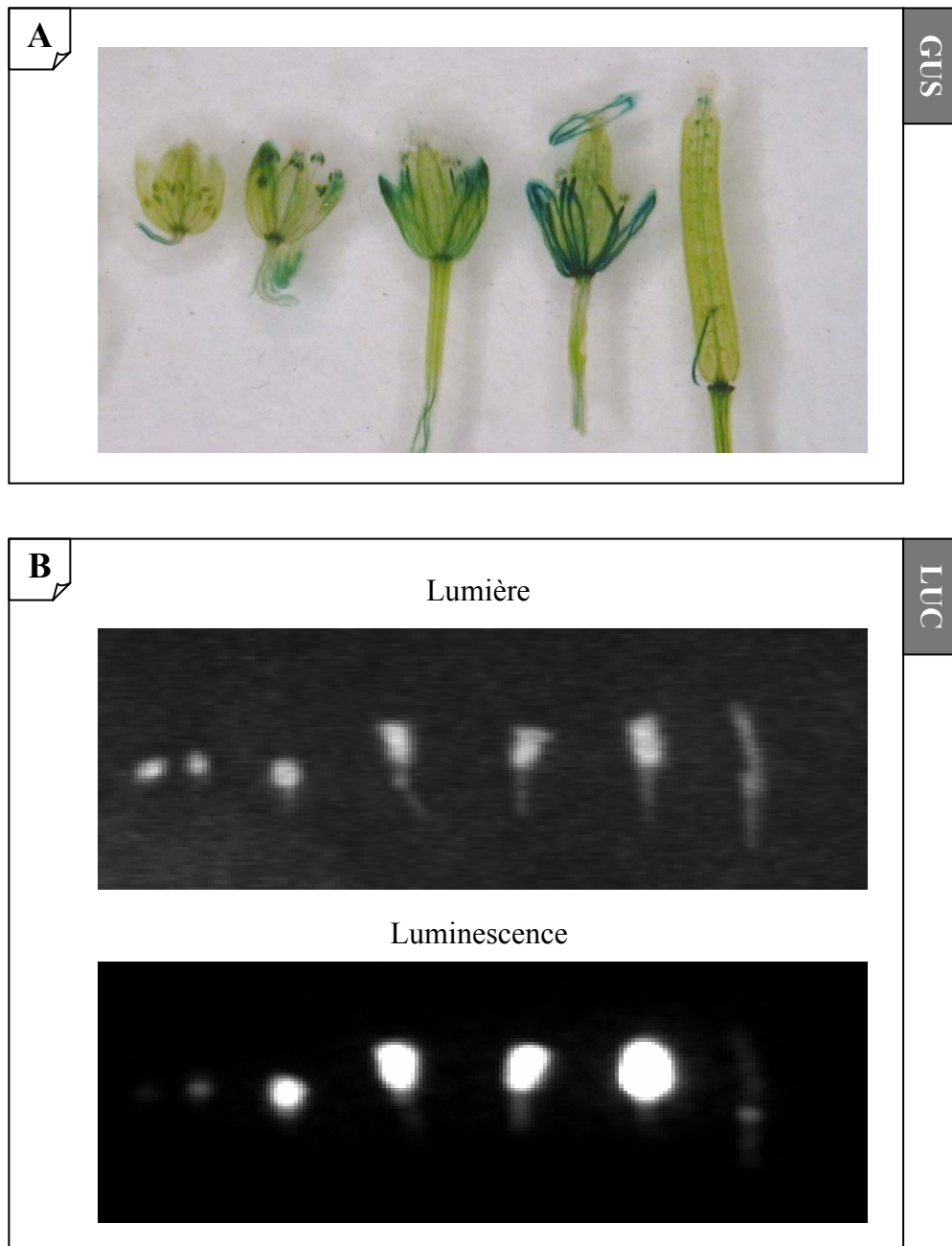
L'ADNg a été digéré soit par l'enzyme *EcoRI*, soit par l'enzyme *KpnI*. La détection du transgène se fait par l'utilisation d'une sonde correspondant à une partie du gène de résistance à la kanamycine *NPTII*. Les marqueurs de taille sont indiqués.



**Figure 40 :** Activité du promoteur *pFIB* de poivron visualisée par coloration histochimique issue de l'activité glucuronidase et par luminescence issue de l'activité luciférase chez le transformant 26J d'*Arabidopsis thaliana* dans les plantules et la plante adulte.

A : GUS : Coloration GUS histochimique.

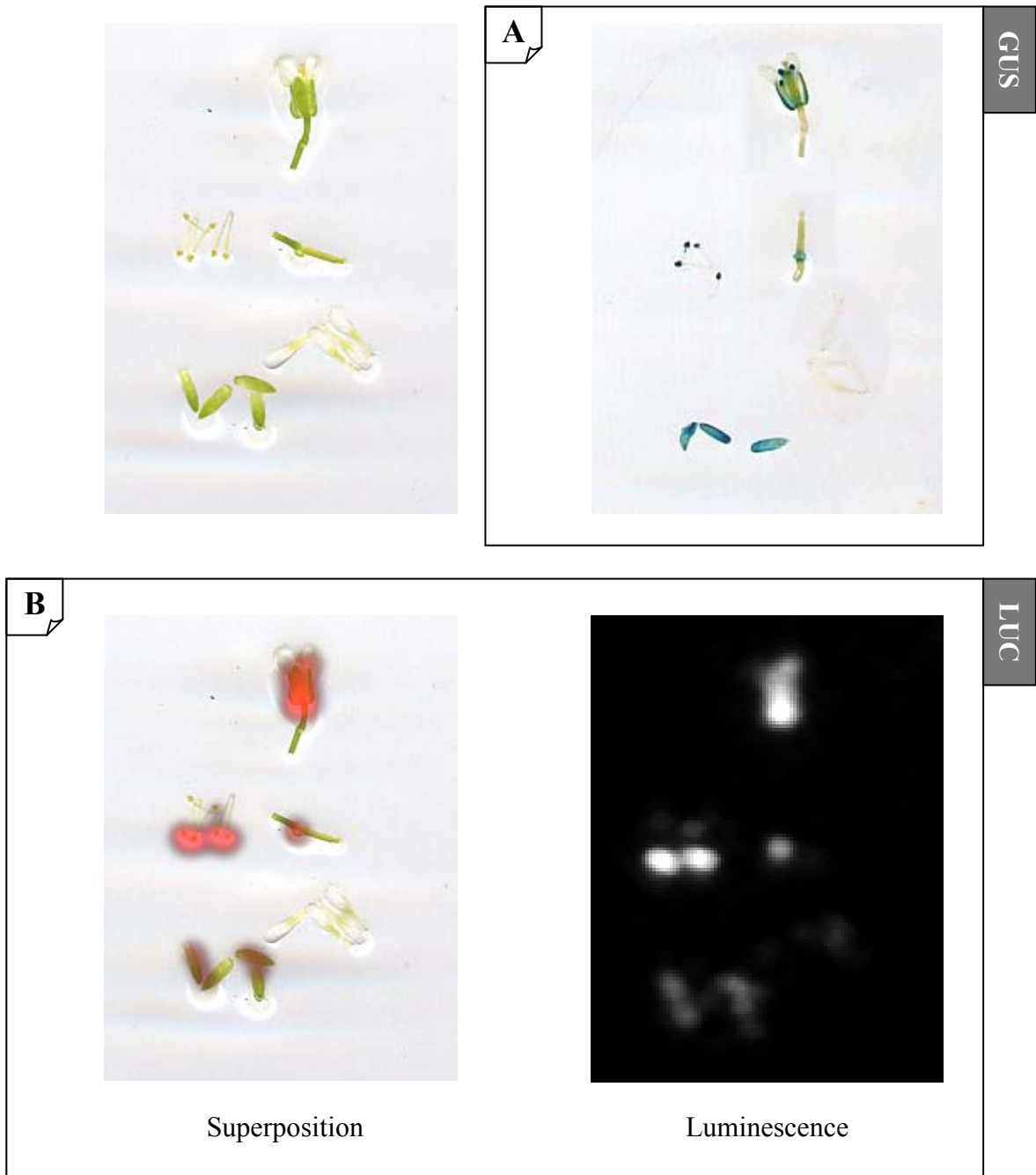
B : LUC : Activité luciférase.



**Figure 41 :** Activité du promoteur *pFIB* de poivron visualisée par coloration histochimique issue de l'activité glucuronidase et par luminescence issue de la luciférase au cours du développement des fleurs de la lignée transgénique 26J d'*Arabidopsis thaliana*.

A : GUS : Coloration GUS histochimique.

B : LUC : Activité luciférase.



**Figure 42 :** Activité du promoteur *pFIB* de poivron visualisée par coloration histochimique issue de l'activité glucuronidase et par luminescence issue de l'activité luciférase dans les différents organes des fleurs de la lignée transgénique 26J d'*Arabidopsis thaliana*.

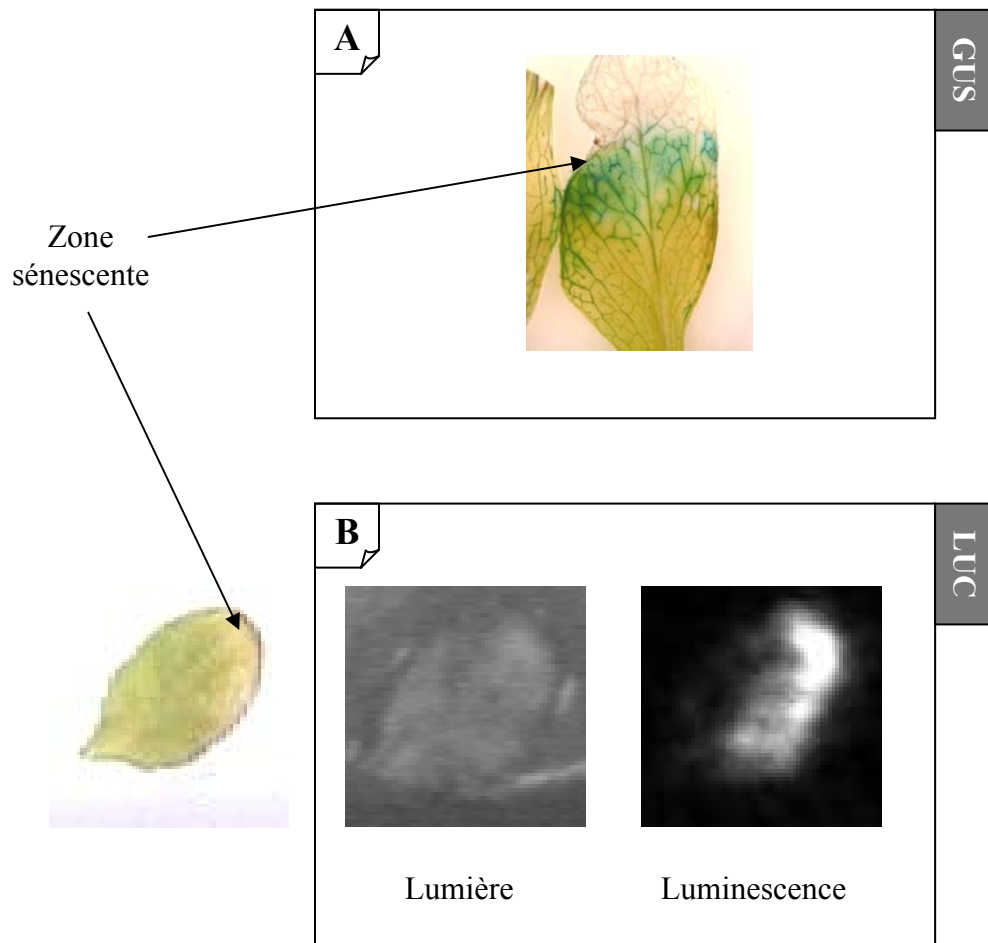
A : GUS : Coloration GUS histochimique.

B : LUC : Activité luciférase.

Nous avons donc étudié plus en détails l'expression des gènes rapporteurs de la lignée 26J. Nous avons ainsi analysé l'activité au cours du développement de la plantule et dans les différents organes de la plante adulte. Des photos représentatives sont exposées dans la figure 40. On remarque une induction du promoteur *pFIB* contrôlant le gène *GUS* au niveau du méristème et des racines des plantules d'*Arabidopsis thaliana* et une augmentation de la coloration correspondant à l'activité  $\beta$ -glucuronidase au cours du développement des plantules. Chez la plante adulte, une forte coloration des fleurs et de la base des siliques est visible. Ces expériences montrent que le promoteur de la fibrilline de poivron est induit dans les fleurs d'*Arabidopsis thaliana*. Des résultats identiques sont obtenus avec le gène rapporteur de la luciférase sous le contrôle du promoteur de la fibrilline de poivron. De la luminescence est émise au niveau du méristème des plantules, et dans les fleurs et à la base de la silique de la plante adulte.

Les deux gènes rapporteurs présentent donc le même type d'activité et montrent que le promoteur de la fibrilline de poivron est constitutivement actif au niveau du méristème apical des plantes et dans les fleurs d'*Arabidopsis thaliana*. Pourtant, les fleurs d'*Arabidopsis thaliana* sont blanches et n'accumulent donc pas de caroténoïdes comme le font les fleurs colorées d'autres plantes comme la tomate.

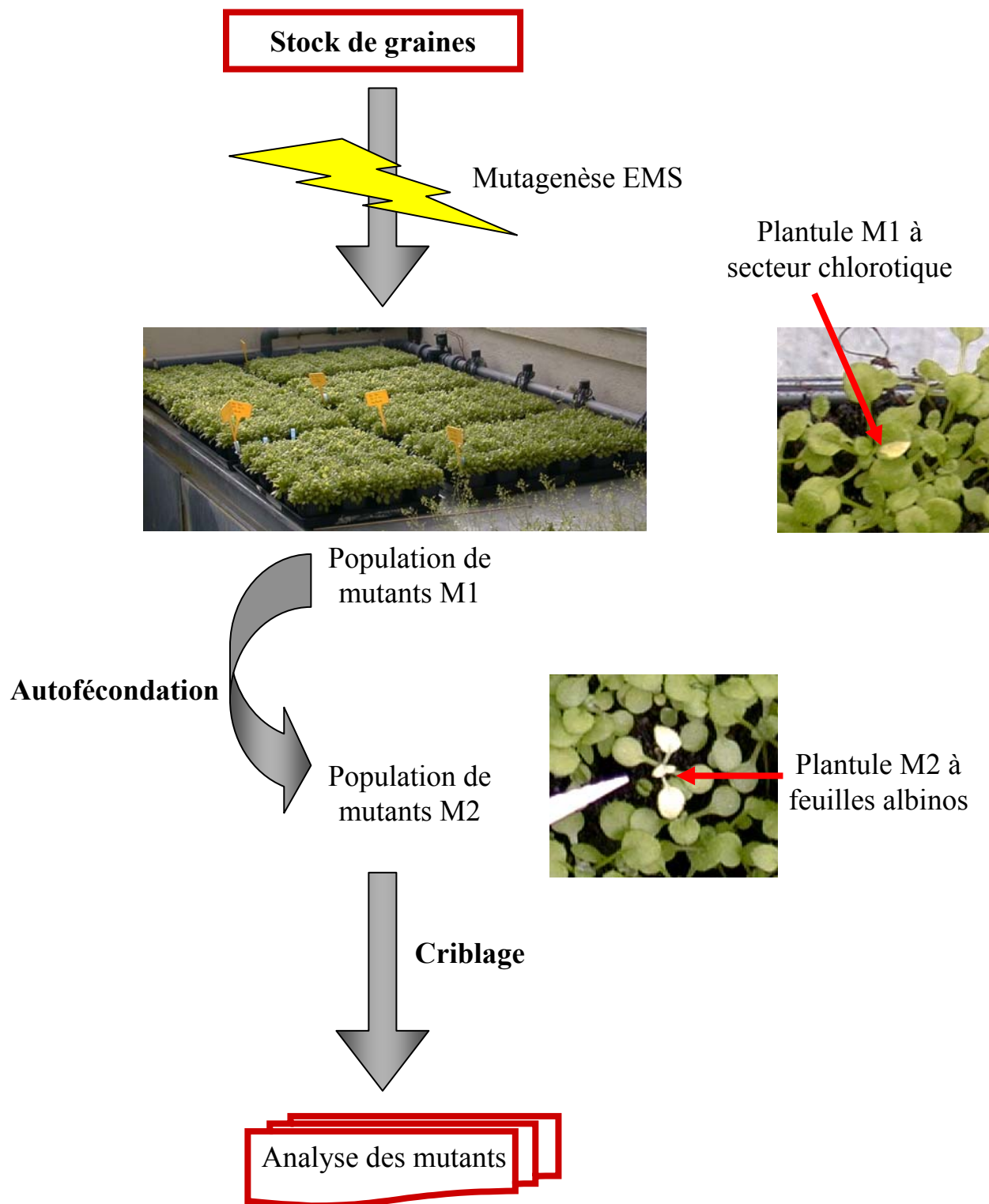
Nous avons alors observé l'activité des gènes rapporteurs au niveau des fleurs pendant leur développement. La figure (Figure 41) montre les activités à différents stades de la maturation de la fleur jusqu'à la formation de la silique dans la lignée 26J. L'activité des deux gènes rapporteurs augmente au cours de la maturation de la fleur et celle-ci ne persiste dans la silique qu'au niveau de la zone « d'ancrage » des pétales, sépales et étamines. L'activité histochimique GUS, par rapport à l'activité luciférase, permet une meilleure appréciation de la localisation de l'induction du promoteur *pFIB* dans les organes floraux. Ce sont en effet principalement les anthères, la pointe des siliques et la zone « d'ancrage » des organes floraux qui sont colorées. Une très légère coloration des pétales, non visible sur les photos montrées, est décelable. Une augmentation de l'activité du promoteur de la fibrilline est donc observable au cours de la maturation de la fleur. Une dissection des organes floraux nous a permis de confirmer la localisation intra-florale de l'activité des deux gènes rapporteurs (Figure 42). L'activité GUS est localisée dans les sépales, les anthères et à la base de la silique. L'activité luciférase montre ici le même type de profil d'expression et on peut même distinguer ici une faible activité au niveau des pétales.



**Figure 43 :** Activité du promoteur *pFIB* de poivron visualisée par coloration histochimique issue de l'activité glucuronidase et par luminescence issue de l'activité luciférase dans des feuilles sénescences de la lignée transgénique 26J d'*Arabidopsis thaliana*.

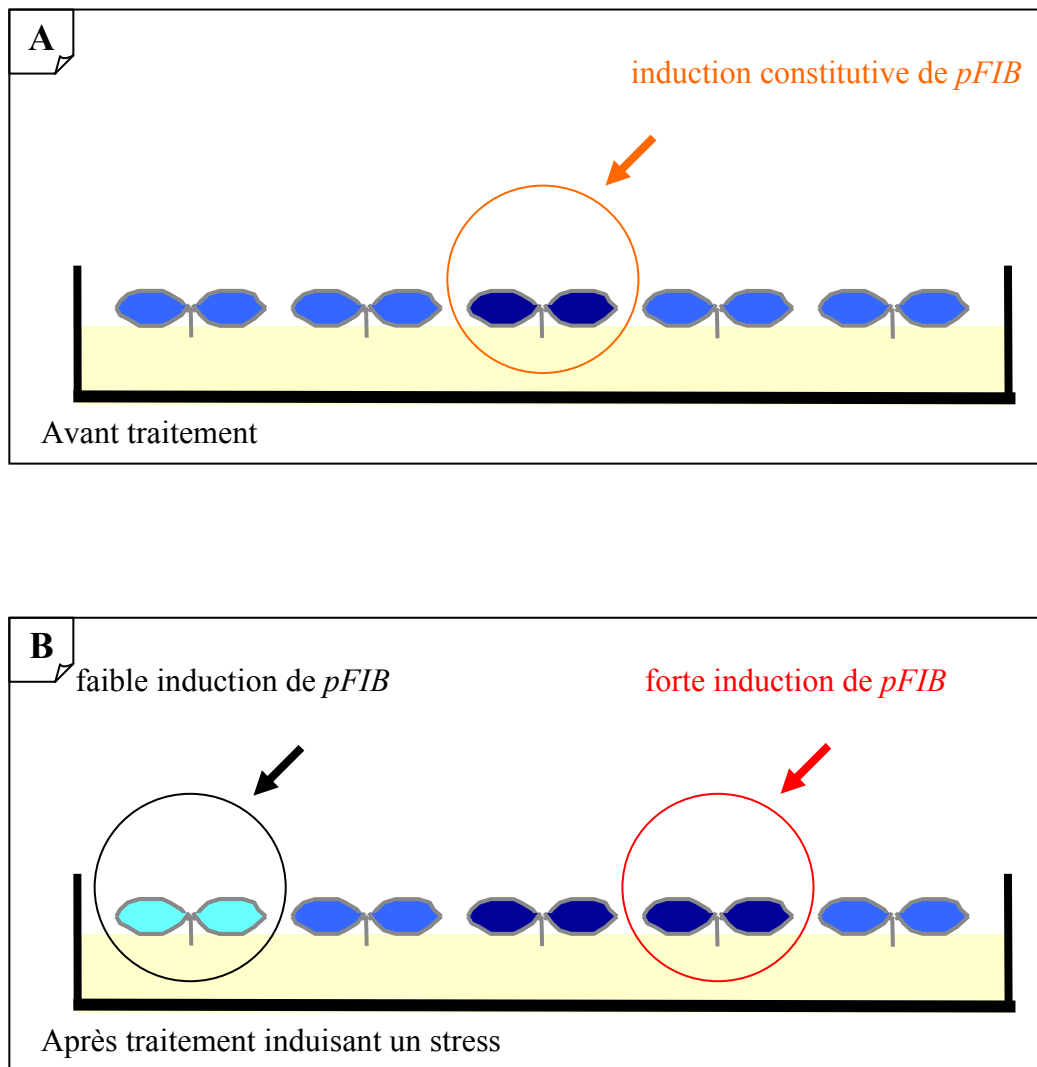
A : GUS : Coloration GUS histochimique.

B : LUC : Activité luciférase.



**Figure 44 :** Schéma de la production de la population de mutants à partir du stock de graines de la lignée transformée 26J.

Des plantes albinos présentes dans les population mutante indiquent le bon déroulement de la mutagenèse.



**Figure 45 : Méthode de criblage de altération de l'activité des gènes rapporteur sous le contrôle du promoteur de la fibrilline de poivron dans les plantules d'*Arabidopsis thaliana*.**

Les mutants recherchés présentant une altération de la régulation de l'activité des gènes rapporteurs sont entourés.

A : Condition standard.

B : Condition de culture induisant un stress.

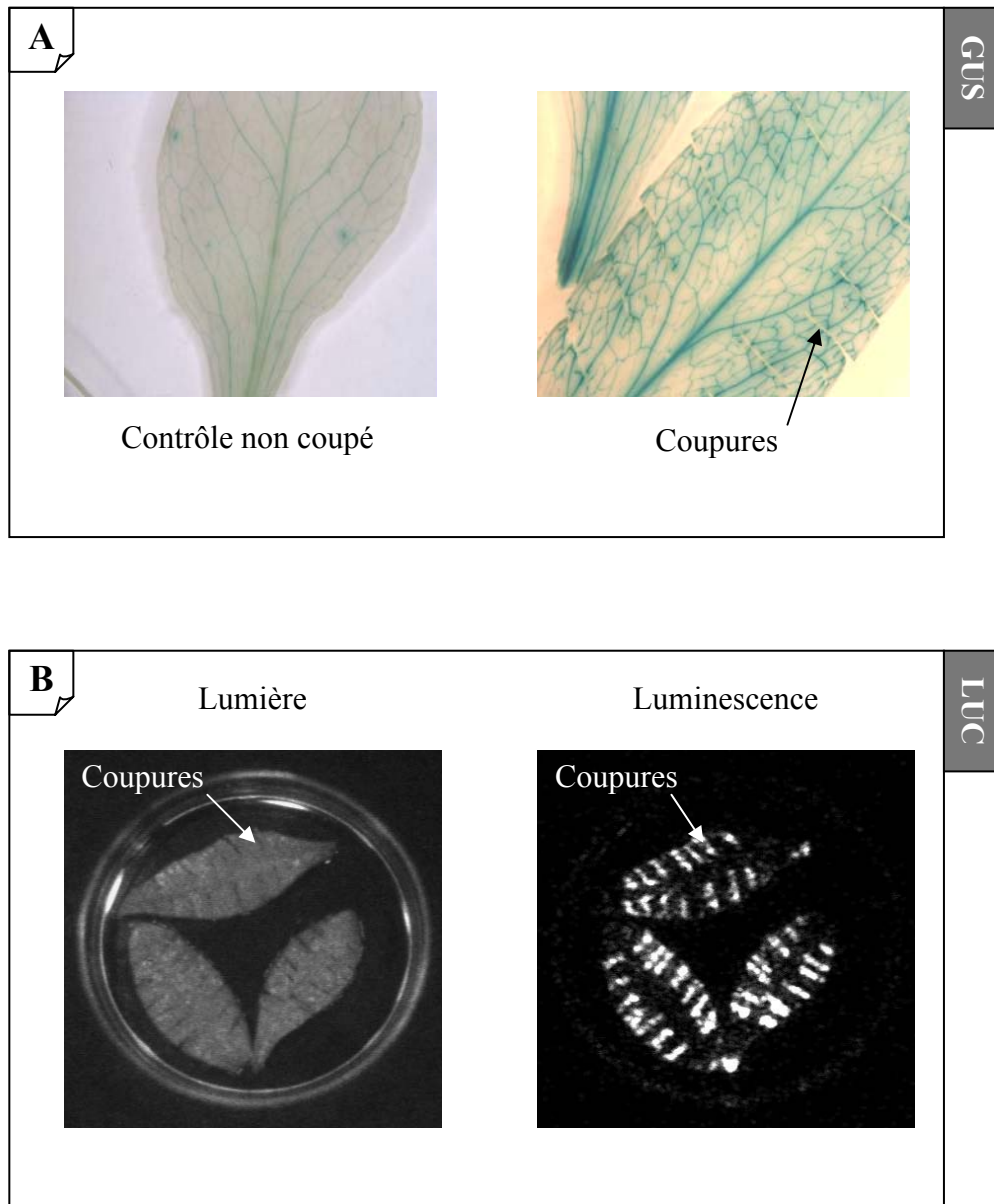
Une induction du promoteur de la fibrilline de poivron a également été caractérisée dans des feuilles sénescentes (Figure 43). La partie blanche de la feuille représente la partie « morte » et la partie verte est la partie encore vivante de celle-ci. L'activité GUS issue de l'induction du promoteur de la fibrilline de poivron est située à la limite entre ces deux parties, région où certainement des cellules sont encore vivantes et peuvent répondre à différents stress survenant durant la progression de la sénescence de la feuille. Une activité luciférase a pu être également mise en évidence dans ces feuilles sénescentes.

Nous disposons donc d'une lignée transgénique d'*Arabidopsis thaliana* où le promoteur *pFIB* de poivron est induit dans les plantules, les fleurs et à la base des siliques. Nous avons donc utilisé cette lignée pour produire un stock de graines à partir d'un parent homozygote (Figure 38). Ce stock de graines a été ensuite traité à l'EMS afin de produire une population de mutants (Matériel et Méthodes § 4). L'efficacité de la mutation a pu être mise en évidence par l'observation sur la population mutante M1 de secteurs chlorotiques sur des feuilles et à la génération suivante (M2), par l'observation de plantules albinos (Figure 44). Les mutations en M1 sont difficiles à évaluer (entre 0,1 et 1% d'après Lightner et Caspar 1998) mais nous avons pu estimer ce taux à 0,5% dans notre cas.

### 4.3 CRIBLAGE

Nous avons défini en parallèle les conditions de criblage pour isoler des mutants de régulation du promoteur de la fibrilline de poivron. Nous envisageons un criblage des plantules sur boîtes de Pétri (Figure 45) afin, dans un premier temps, de trouver des mutants constitutifs d'expression forte du transgène et, dans un deuxième temps, d'isoler des mutants dont l'activité des gènes rapporteurs est plus importante (sur-expresseur) ou moins importante (sous-expresseur) après application d'un stress qui induirait le promoteur *pFIB* de poivron chez *Arabidopsis thaliana*.

Afin de mettre au point les conditions de criblage, nous avons testé plusieurs stress, dont ceux qui provoquaient l'induction du promoteur *pFIB* dans le poivron et la tomate (salin, basse température, déshydratation...), mais aussi des stress de type oxydant induits chimiquement (méthyl viologen (paraquat), norflurazon). Notre première observation a été réalisée sur des feuilles ayant subi un stress de type blessure et nous avons analysé l'activité des gènes rapporteurs 24 heures après le stress (Figure 46). Ce stress produit l'apparition d'une coloration GUS ou d'une fluorescence dans les feuilles coupées par rapport au contrôle. Le promoteur *pFIB* de poivron est donc induit au niveau des coupures, comme chez la tomate

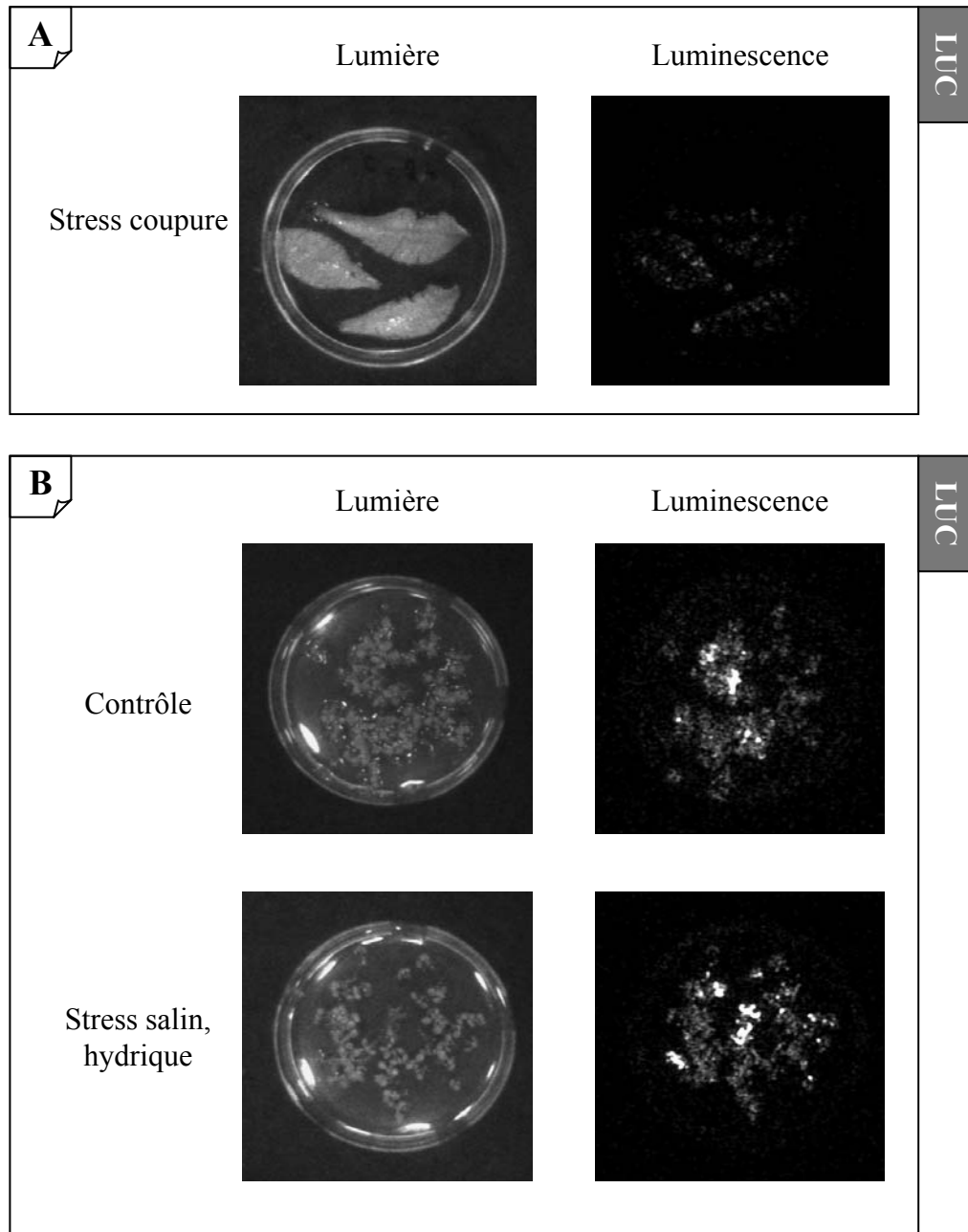


**Figure 46 :** Activité du promoteur *pFIB* de poivron visualisée par coloration histochimique issue de l'activité glucuronidase et luminescence issue de l'activité luciférase 24 heures après un stress de coupure sur feuilles d'*Arabidopsis thaliana* de la lignée 26J.

Les feuilles excisées ont été lacérées et placées en boîte de Pétri sur de l'eau pendant 24 heures.

A : GUS : Coloration GUS histochimique.

B : LUC : Activité luciférase.

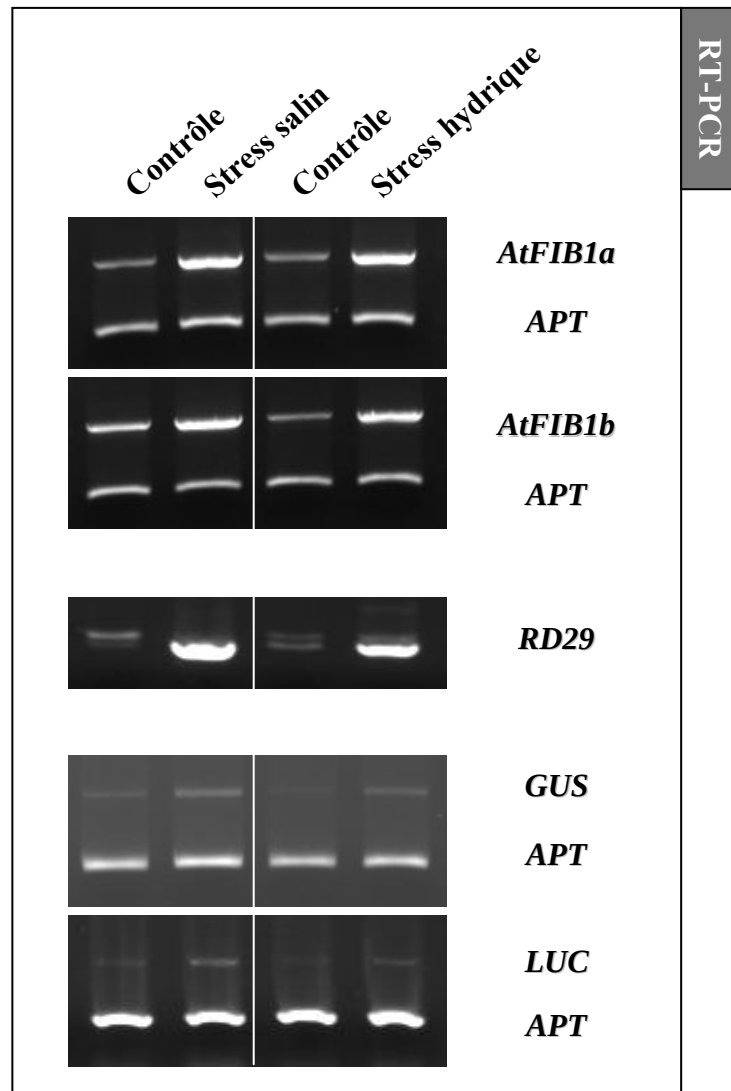


**Figure 47 :** Activité du promoteur *pFIB* de poivron visualisée par luminescence de la luciférase de la lignée transgénique 26J d'*Arabidopsis thaliana* 24 heures après un stress.

A : Coupures sur feuilles (traitement identique à l'expérience de la figure 46).

B : Contrôle ou stress sur plantules de 7 jours.

Différents stress ont été testés et ont donné des résultats similaires. Les plantules sont soumises aux même différents types de stress que ceux effectués sur les feuilles excisées de l'analyse d'expression des figures 19-20.



**Figure 48 :** Induction de l'expression des transgènes par rapport aux gènes fibrillines d'*Arabidopsis thaliana* et au gène *RD29* impliqué dans la réponse au stress chez des plantules de 7 jours ayant subi un stress de déshydratation ou salin pendant 5 heures.

Les plantules ont été mise à flotter sur une solution de NaCl 250mM pour le stress salin en comparaison d'une condition contrôle comprenant de l'eau. Le stress déshydratation est effectué en plaçant la boîte contenant les plantules ouverte sous une hotte à flux laminaire en comparaison du contrôle boîte fermée. Le gène *APT* est utilisé comme contrôle.

(Manac'h et Kuntz 1999). Malheureusement, une telle induction semble dépendre de plusieurs paramètres puisqu'elle est difficilement reproductible. En ce qui concerne les autres types de stress, tous effectués sur plantules en culture *in vitro* dans des conditions compatibles avec un criblage, nous nous sommes heurtés à d'importantes variations de cinétique et d'amplitude d'une plante à l'autre lorsque l'activité du promoteur est analysée via l'expression du gène rapporteur *LUC*. Comme on peut le voir, il semble que l'induction du promoteur *pFIB* de poivron ne soit pas homogène ni dans le temps, ni au sein de la lignée (Figure 47).

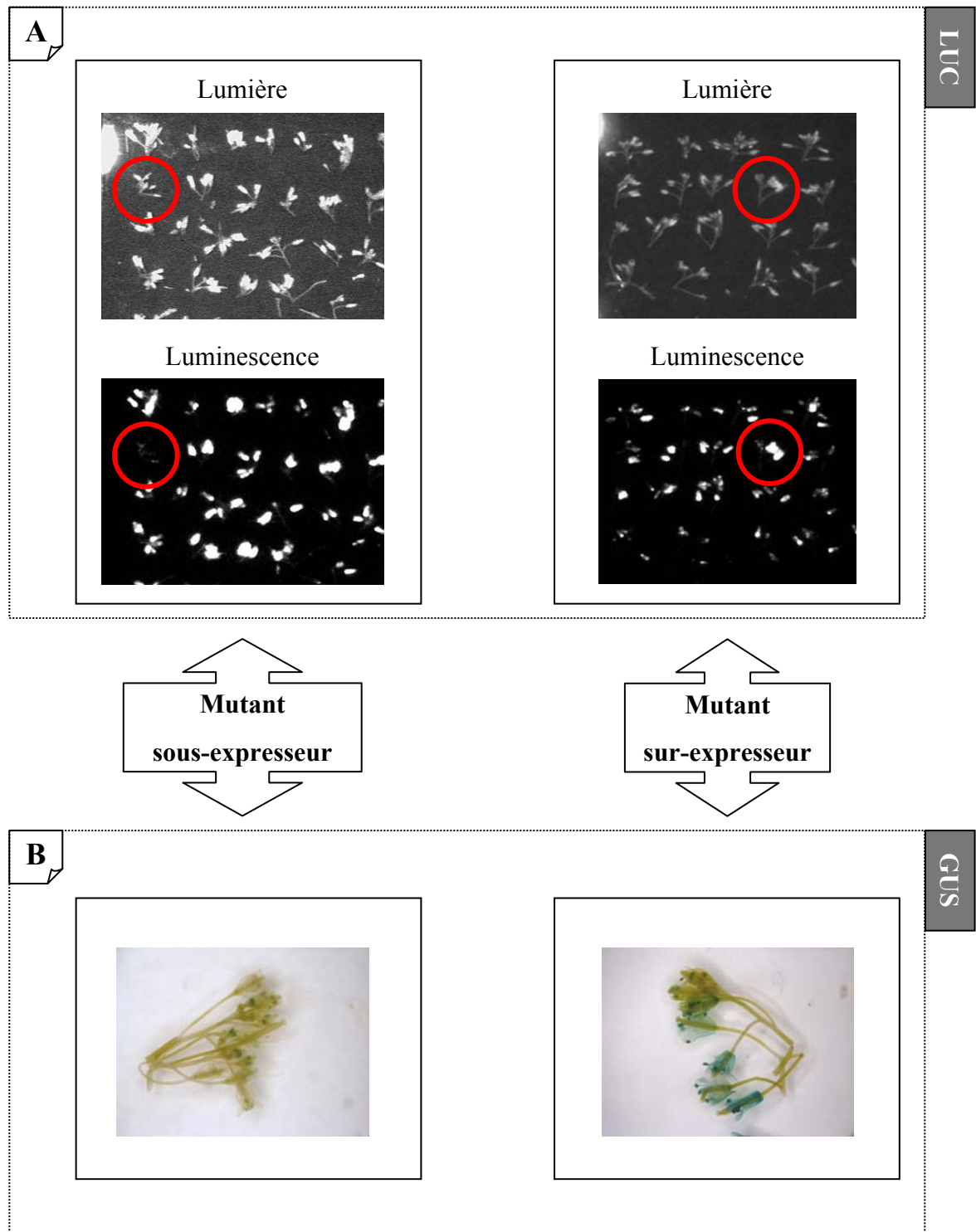
Nous avons testé de manière plus précise cette induction par des essais quantitatifs GUS et *LUC*, en condition de stress salin et en condition de stress de déshydratation (Tableau 6). Dans les deux cas, les activités des gènes rapporteurs ne présentent pas d'augmentation significative après stress.

| Condition de culture                      | Contrôle H <sub>2</sub> O | NaCl 250 mM | Contrôle boîte | Déshydratation |
|-------------------------------------------|---------------------------|-------------|----------------|----------------|
| Activité luciférase<br>RLU/g protéine     | 7 052                     | 8 855       | 12 530         | 13 670         |
| Activité GUS<br>pmole 4MU/min/mg protéine | 1 410                     | 1 980       | 1 900          | 1 950          |

**Tableau 6 :** Essais quantitatifs d'activités glucuronidase et luciférase chez des plantules d'*Arabidopsis* de 7 jours ayant subi un stress de déshydratation ou salin pendant 5 heures.

Nous avons voulu savoir si cette faible induction était due au fait que le stress opéré était inefficace chez *Arabidopsis thaliana* ou si c'était la construction utilisant le promoteur *pFIB* de poivron qui n'était pas induite chez cette plante. Pour répondre à cette question, nous avons testé par RT-PCR semi-quantitative l'accumulation des transcrits des gènes rapporteurs, mais aussi celle de gènes *FIB* endogènes. Les résultats présentés dans la figure 48 montrent que les transcrits *LUC* et *GUS* ne s'accumulent pas lors d'un stress salin ou de déshydratation par rapport à leur contrôle respectif, alors que ceux des gènes *FIB1a*, *FIB1b* et du gène *RD29*, marqueur des stress salin et hydrique (Yamaguchi-Shinozaki et Shinozaki 1993), s'accumulent pendant le stress. Il est donc clair que nous ne pouvons pas baser notre crible sur une modification de la régulation du promoteur de la fibrilline de poivron dans les plantules d'*Arabidopsis thaliana* en conditions de stress puisque l'induction de ce promoteur est peu efficace et peu reproductible. Un tel criblage isolerait un bon nombre de faux mutants de régulation du promoteur *pFIB*.

Nous avons donc orienté notre criblage vers l'utilisation de l'induction du promoteur *pFIB* de poivron observable dans les fleurs d'*Arabidopsis thaliana*, puisque celles-ci présentent une



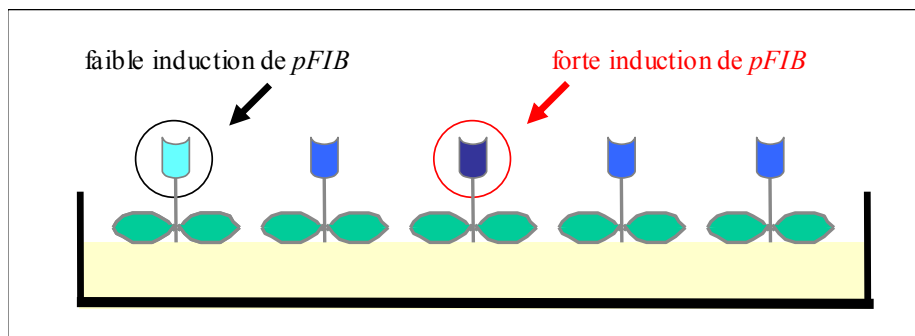
**Figure 50 : Criblage de la population de mutants pour une altération de l'activité des gènes rapporteurs dans les fleurs.**

Des mutants dont l'activité luciférase et l'activité glucuronidase sous le contrôle du promoteur de la fibrilline de poivron sont altérées dans les fleurs ont été entourés. Ctrl : lignée contrôle 26J non mutée.

A : GUS : Coloration GUS histochimique.

B : LUC : Activité luciférase.

forte activité GUS et LUC (Figures, 41 et 42). Le but de ce criblage est d'isoler des mutants qui seront affectés dans la régulation du promoteur *pFIB* dans les fleurs, générant des lignées de type sur-exprimeur ou sous-exprimeur (Figure 49).



**Figure 49 :** Méthode de criblage d'une altération de l'activité des gènes rapporteurs sous le contrôle du promoteur de la fibrilline de poivron dans les fleurs d'*Arabidopsis thaliana*.

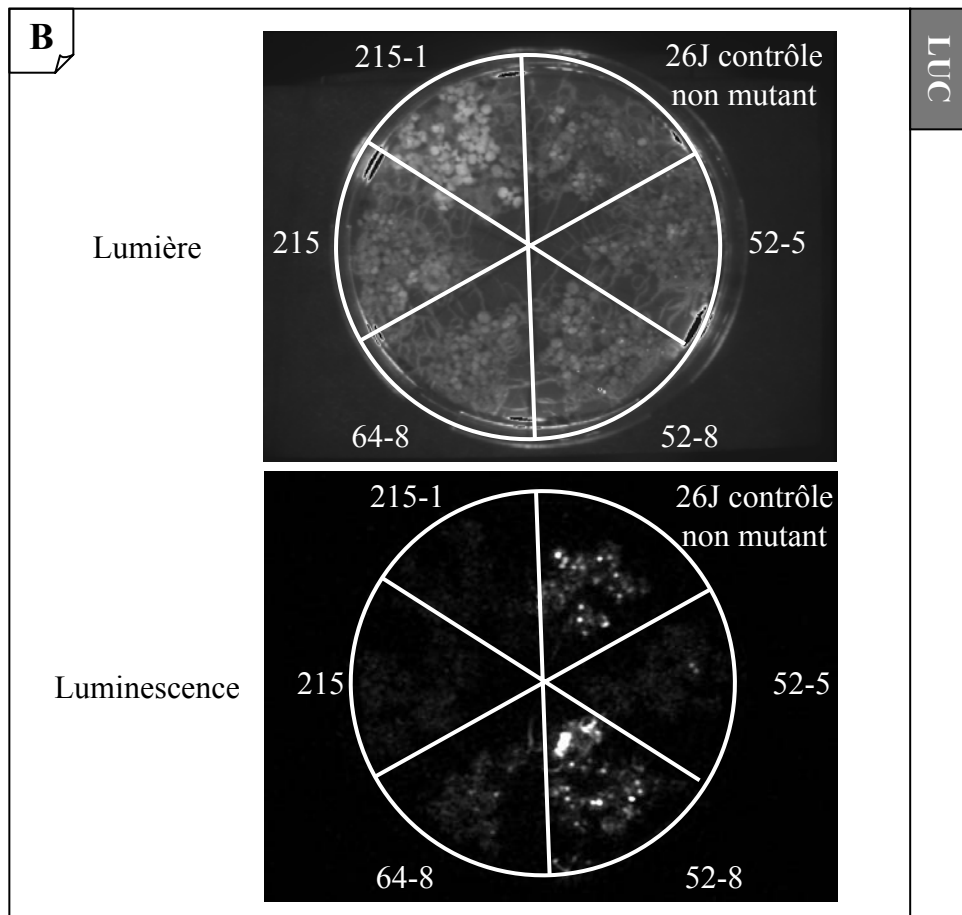
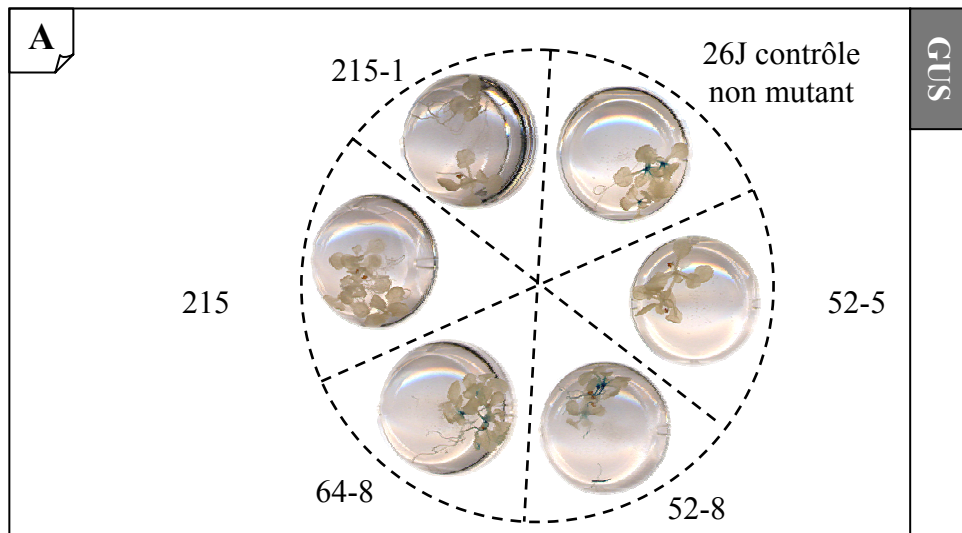
Les mutants recherchés présentant une altération de la régulation de l'activité des gènes rapporteurs sont entourés.

Pour cela, nous avons semé la génération M2 issue de la mutagenèse et nous avons mené à fleurs les plants d'*Arabidopsis thaliana*. Les inflorescences des plantes (25000 environ) ont alors été sectionnées et l'activité luciférase des fleurs a été observée sous caméra. Nous avons pu isoler des plantes dont l'activité luciférase dans les fleurs est soit plus importante, soit moins importante que dans le reste des plantes et par rapport à la lignée transgénique non mutante d'origine (Figure 50). L'altération de l'activité du deuxième gène rapporteur (*GUS*) a également été déterminée chez les lignées sélectionnées par criblage luciférase. Les lignées dont les activités des gènes rapporteurs *GUS* et *LUC* n'étaient pas corrélées ont été par la suite écartées. Les lignées ayant passé ce stade de tri ont été menées à graines.

#### **4.4 ÉTUDE DES MUTANTS**

Par ce criblage basé sur une modification de l'activité des gènes rapporteurs dans les fleurs, nous avons isolé vingt quatre mutants. Seize montrent une activité très faible ou nulle, six ont une activité des gènes rapporteurs moyenne (par rapport à la lignée contrôle 26J non mutante), et deux lignées (dont la 64-8) montrent une surexpression des gènes rapporteurs.

Les activités luciférase et glucuronidase de la descendance de ces mutants ont été ensuite testées au niveau des plantules pour voir si la mutation impliquée dans la dérégulation du promoteur de la fibrilline dans les fleurs, affecte aussi l'expression des gènes rapporteurs dans les organes végétatifs. Comme on peut le voir sur les photos de la figure 51, des activités LUC



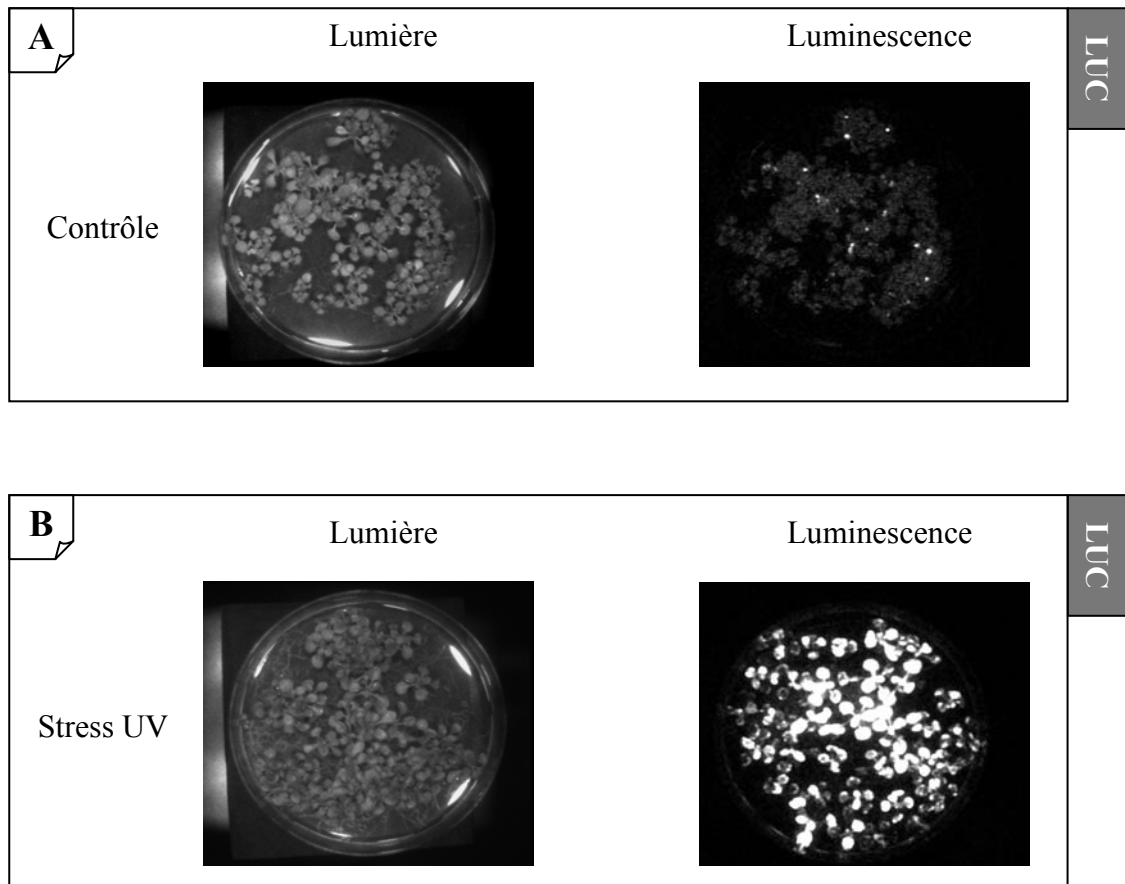
**Figure 51 : Induction du promoteur *pFIB* de poivron chez des plantules de 15 jours de mutants EMS d'*Arabidopsis thaliana* (3 jours après stress).**

26J : lignée contrôle non mutante

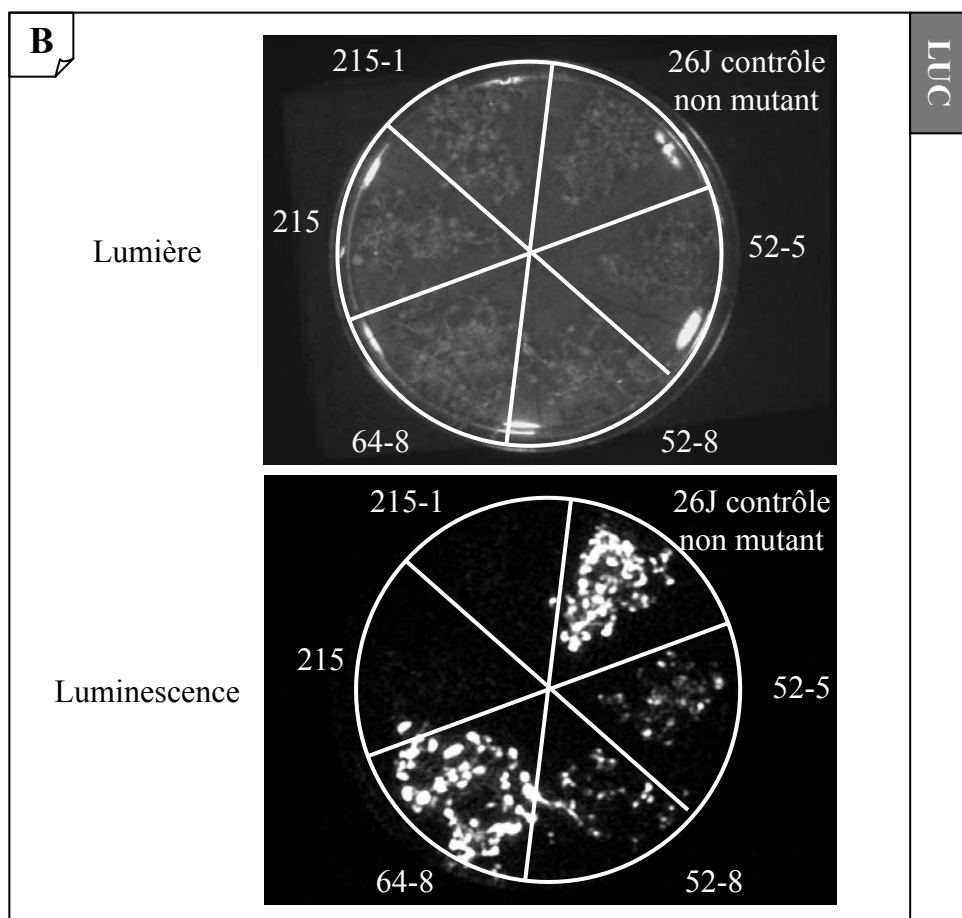
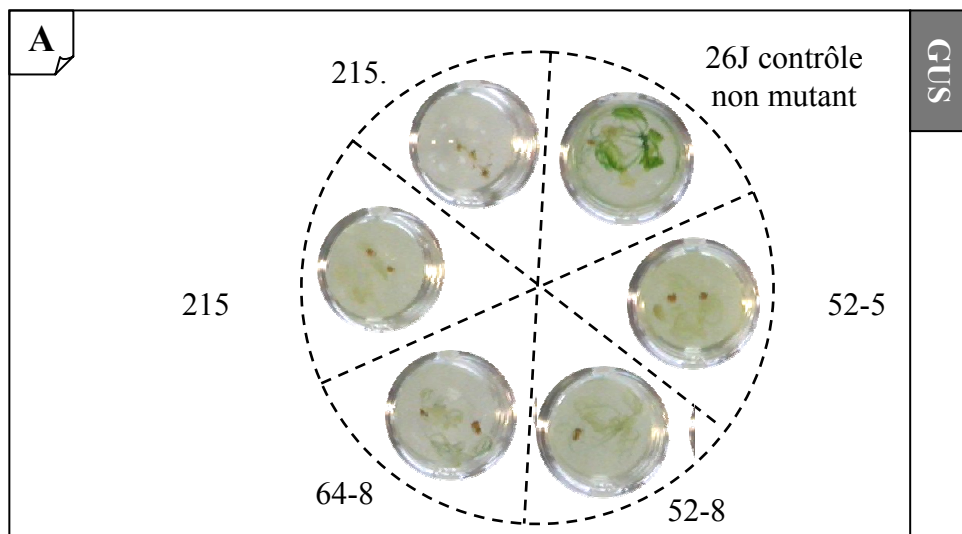
52-5, 52-8, 64-8, 215, 215-1 : mutants isolés à partir du criblage « fleur ».

A : GUS : Coloration GUS histochimique.

B : LUC : Activité luciférase.



**Figure 52 : Induction du promoteur *pFIB* de poivron (activité luciférase) chez la lignée transgénique 26J d'*Arabidopsis thaliana* soumise (B) ou non (A) à un stress d'exposition aux UV d'une heure à 4°C avec une récupération de 3 jours.**



**Figure 53 :** Induction du promoteur *pFIB* de poivron chez des plantules de 15 jours de mutants EMS d'*Arabidopsis thaliana*, 3 jours après un stress d'exposition aux UV d'une heure à 4°C.

26J : lignée contrôle non mutante

52-5, 52-8, 64-8, 215, 215-1 : mutants isolés à partir du criblage « fleur ».

A : GUS : Coloration GUS histochimique.

B : LUC : Activité luciférase.

et GUS sont visibles chez le contrôle 26J dans des conditions de culture standard. Celles-ci sont surtout localisées au niveau des méristèmes. Le mutant 64-8, isolé comme sur-expresser dans les fleurs, montre ici une activité plus faible que celle de la lignée contrôle 26J, du moins pour le gène *LUC*. La lignée 52-8, isolée comme sous-expresser dans les fleurs, présente des activités LUC et GUS équivalentes à celles de la lignée 26J. La mutation de la lignée 52-8 ne semble donc affecter la régulation du promoteur de la fibrilline de poivron qu'au niveau des fleurs, du moins dans les conditions standard de culture. Les autres lignées montrées, à savoir les lignées 215, 215-1 et 52-5 présentent quant à elles une activité très faible (voir nulle) au niveau des plantules, comme ce qui avait été observé dans les fleurs de leurs parents. La mutation, chez ces mutants, affecte donc la régulation du promoteur *pFIB* aussi bien dans les fleurs que dans les plantules.

Un aspect important dans la régulation du promoteur *pFIB* est sa caractéristique de réponse au stress. Or, jusqu'à maintenant, aucun stress ne permettait d'obtenir une induction suffisante ou reproductible du promoteur de la fibrilline de poivron chez *Arabidopsis thaliana*. Nous avons testé une exposition des plantules aux UV. Les plantules poussant *in vitro* dans des boîtes de Pétri sont alors exposées pendant 60 minutes aux UV sur un lit de glace pour diminuer la température et ainsi accentuer le stress. Le couvercle de la boîte est ouvert pour que les UV ne soient pas stoppés par le plastique, induisant aussi une déshydratation des plantules. Les résultats de l'effet sur l'activité des gènes rapporteurs de l'exposition aux UV de la lignée transgénique non mutée 26J sont reportés dans la figure 52. On peut voir que par rapport au contrôle non exposé aux UV, on observe une forte activité luciférase dans le cas où les plantes sont soumises à ces trois stress simultanés. Cette induction du promoteur de la fibrilline de poivron est la plus importante et la plus homogène de toutes les inductions que nous avons observées lors des différentes conditions de stress et que nous avons testées jusqu'à présent (Figure 46). Cette induction est maximale 3 jours après l'exposition aux UV.

Nous avons voulu tester l'induction par ce triple stress du promoteur de la fibrilline de poivron chez les mutants que nous avons isolés par criblage de l'activité dans les fleurs. Un exemple d'activité des gènes rapporteurs de quelques mutants et de la lignée contrôle non mutée 26J est présenté en figure 53. Nous retrouvons ici une forte activité luciférase dans la lignée contrôle 26J. La lignée mutante 64-8 (phénotype sur-expresser dans les fleurs) montre cette fois des activités LUC et GUS équivalentes à celles de la lignée contrôle 26J, mais pas plus importantes (contrairement à ce qui a été observé figure 51 en conditions standard, remarque : le signal n'est pas saturant). Les lignées 215 et 215-1 (ayant un phénotype sous-

expresseur dans les fleurs) ont des activités GUS et LUC non détectables, et les lignées 52-5 et 52-8 montrent des activités faibles par rapport à la lignée 26J. Les mutations impliquées dans la dérégulation du promoteur de la fibrilline de poivron au niveau des fleurs affectent donc également l'expression des gènes rapporteurs au niveau des plantules dans des conditions d'exposition aux UV.

#### **4.5 CONCLUSIONS SUR L'ÉTUDE DES MUTANTS**

Des expériences préliminaires avaient montré que le promoteur de la fibrilline de poivron pouvait être induit dans les feuilles d'*Arabidopsis thaliana*, lors d'un stress blessure provoqué par les expériences de biolistique (Langenkamper *et al.* 2001). Nous avons donc utilisé ce promoteur de la fibrilline de poivron pour contrôler l'expression de gènes rapporteurs dans une construction introduite chez *Arabidopsis thaliana*. Dans les plantes d'*Arabidopsis thaliana* transgéniques, le promoteur de la fibrilline de poivron montre une expression constitutive dans les méristèmes des plantes dès le stade le plus précoce après la germination. Chez la plante adulte, on retrouve également une forte induction de ce promoteur dans les fleurs. Or les gènes de type fibrilline caractérisés jusqu'à maintenant sont pratiquement tous liés à une accumulation de caroténoïdes dans les fruits (comme chez le poivron Deruere *et al.* 1994b-32) ou dans les fleurs (comme chez *Cucumis Sativus* Smirra *et al.* 1993). Pourtant chez *Arabidopsis thaliana* les fleurs sont blanches et ne possèdent pas de caroténoïdes. Nous avons montré aussi que les gènes *FIB 1a* et *1b* d'*Arabidopsis thaliana* qui sont les plus proches parents de la fibrilline de poivron sont aussi exprimés fortement dans les fleurs (Figure 18), on constate donc ici la conservation des mécanismes de régulation de l'expression de la fibrilline dans les fleurs entre les différentes plantes.

Nous avons vu plus précisément que chez les fleurs d'*Arabidopsis thaliana*, ce sont principalement les sépales et les anthères qui présentent une activité des gènes rapporteurs dans nos lignées transgéniques. L'activité des gènes rapporteurs de notre lignée transgénique au niveau des sépales est certainement soumise à une régulation identique à celle que l'on observe dans les feuilles puisque ce sont des organes verts qui comportent donc des chloroplastes exprimant la fibrilline. Les pétales d'*Arabidopsis thaliana*, qui ne sont pas colorés et qui possèdent des leucoplastes, montrent aussi une très faible activité des gènes rapporteurs. Ceci est en accord avec les résultats des études des fibrillines qui montrent que l'accumulation de protéines de type FIB est liée à l'accumulation de caroténoïdes dans les chromoplastes des fleurs (Smirra *et al.* 1993, Vishnevetsky *et al.* 1996). Cependant, lors du développement floral, quelques chloroplastes qui ne se sont pas différenciés en leucoplastes

dans les pétales d'*Arabidopsis thaliana* sont encore présents dans la partie basale des pétales (Pyke et Page 1998). C'est justement dans cette partie des pétales qu'est localisée la faible activité des gènes rapporteurs visualisable. Il semble donc que l'activité des gènes rapporteurs que l'on détecte dans les pétales d'*Arabidopsis thaliana* soit liée à la présence des chloroplastes, comme dans les sépales et les feuilles.

Chez *Brassica campestris*, les cellules du tapis situées dans les anthères accumulent un polypeptide de type fibrilline (Ting *et al.* 1998). Il faut noter que les grains de pollen seront recouverts par le contenu des cellules du tapis après lyse de celles-ci (Piffanelli *et al.* 1998). On peut supposer qu'ici, le promoteur de la fibrilline de poivron est soumis à ce type de régulation chez *Arabidopsis thaliana*. Ceci permet d'expliquer aussi pourquoi dans les fleurs d'*Arabidopsis thaliana* qui n'accumulent pas de caroténoïdes, on retrouve de la fibrilline. Cette dernière serait donc principalement présente au niveau des anthères, associée à des structures lipidiques dans les élaïoplastes et non pas au niveau de chromoplastes que les pétales d'*Arabidopsis thaliana* ne possèdent pas.

L'intensité de coloration GUS plus importante observée au bout des sépales est peut être due au fait que les cellules de cette partie des sépales sont plus soumises aux stress. On peut supposer que cette partie des sépales a subi un mécanisme de « sénescence » plus rapide qui conduirait à l'induction du promoteur de la fibrilline en réponse à ce phénomène. Cette hypothèse est confortée par l'induction de l'expression des gènes rapporteurs dans nos lignées transgéniques (Figure 43), par l'induction de l'expression du gène *FIB1b* d'*Arabidopsis thaliana* (Figure 18) et par l'accumulation de la protéine FIB1b, tous trois au niveau des feuilles sénescences (Figure 23).

Le promoteur de la fibrilline de poivron est également soumis à une régulation développementale conduisant à son induction au cours de la maturation des fleurs d'*Arabidopsis thaliana* (Figure 41). Un même type de régulation développementale a précédemment été montré pour les homologues de la fibrilline de *Cucumis Sativus* (Vishnevetsky *et al.* 1996), cependant, dans ce dernier cas, les fleurs possèdent des chromoplastes.

La lignée transgénique d'*Arabidopsis thaliana* que nous avons générée devait nous permettre de trouver des mutants affectés dans la régulation du promoteur *pFIB* par un criblage de type stress pendant lequel, le promoteur devait être induit dans ces conditions. Nous avons été surpris de constater que le promoteur de la fibrilline de poivron ne répondait pas aussi efficacement à nos conditions d'induction. En effet nos premières expériences montraient une

induction de ce promoteur chez *Arabidopsis thaliana* dans le cas de blessures, mais ces résultats ne sont pas assez reproductibles (Figure 47). Nous avons testé alors différentes conditions correspondant aux stress les plus utilisés et les plus efficaces lors des caractérisations des différentes fibrillines et de leur expression, comme le déficit hydrique, la forte lumière, la blessure ou le traitement par des agents générateurs de ROS ou des herbicides. Tous ces traitements ont donné de faibles inductions du promoteur exogène de la fibrilline de poivron, contrairement aux gènes fibrilline endogènes (Figure 48). Il semble donc que même si certains mécanismes de régulation de l'expression des gènes *FIB* sont conservés chez les plantes, le promoteur *pFIB* de poivron n'est pas efficacement induit chez *Arabidopsis thaliana*, du moins dans les conditions testées. Différentes lignées transgéniques indépendantes que nous avons produites montrent cette même induction de faible amplitude pour le promoteur de poivron (non montré). Ce n'est donc pas un effet de position dans la lignée 26J que nous avons choisi pour la suite de notre étude, mais bien une conséquence de l'expression hétérologue du promoteur de la fibrilline de poivron chez *Arabidopsis thaliana*.

Une approche similaire avait été utilisée avec le promoteur du gène *RD29A* (Ishitani 1997). Ce promoteur montre une forte induction de stress (Yamaguchi-Shinozaki, 1993a), ce que nous avons également observé dans nos plantes transgéniques. Des mutants altérés dans la régulation de ce promoteur ont pu être isolés par cette approche après application d'un stress. Cependant, dans notre cas, l'induction du promoteur de la fibrilline de poivron n'était donc pas assez importante et homogène pour être utilisable dans un criblage basé sur des conditions de stress. Nous nous sommes donc intéressés à la forte induction du promoteur de la fibrilline de poivron que l'on observe dans les fleurs d'*Arabidopsis thaliana* (Figures 40-42). Nous avons alors criblé notre population de mutants selon une altération de l'expression des gènes rapporteurs au niveau des fleurs. Nous avons isolé ainsi une vingtaine de mutants. Ces mutants présentent pour la plupart une diminution, voire une extinction de l'activité des gènes rapporteurs. Étant donné que les deux gènes rapporteurs sont affectés, cela provient vraisemblablement d'une mutation affectant un régulateur du promoteur de la fibrilline de poivron.

L'exposition de plantules au triple stress (UV) nous a permis de définir des conditions induisant le promoteur de la fibrilline de poivron de manière importante chez nos lignées transgéniques d'*Arabidopsis thaliana*. Nous avons pu vérifier que ces conditions d'induction (UV) étaient altérées chez nos mutants. Les mécanismes mis en jeu lors de la régulation développementale seraient donc communs à la régulation relative au stress induits par

l'exposition aux UV. Si un mutant issu du criblage fleur montre une dérégulation du promoteur de fibrilline et que ce même mutant n'est pas affecté lors du traitement aux UV, cela signifie que la mutation affecte un régulateur spécifique de la régulation développementale de la fleur. Or sur notre vingtaine de mutants, aucun n'a montré un tel phénotype. Un nouveau criblage utilisant des conditions d'exposition aux UV permettrait de trouver des mutants de régulation relatifs au stress et si l'activité des gènes rapporteurs dans ces lignées n'est pas modifiée dans les fleurs, ceci signifiera que la mutation affecte un régulateur spécifique de la réponse au stress. Une telle approche permettrait de mettre en évidence les deux voies de régulation, développementale et environnementale, ou encore leurs interconnexions.

# **CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES**

## **CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES**

Dans cette étude, nous avons montré que la fibrilline est présente dans les organismes photosynthétiques depuis les cyanobactéries jusqu'aux plantes supérieures. Ce gène s'est dupliqué au cours de l'évolution en une famille multigénique qui compte 10 membres chez les plantes supérieures analysées. Trois gènes supplémentaires sont apparus récemment dans le génome des *Brassicaceae*. L'accès à de nouveaux génomes séquencés, notamment celui de la tomate, permettra probablement de confirmer la présence de ces 10 membres chez d'autres plantes. Pratiquement toutes les protéines FIB identifiées sont plastidiales. La localisation intracellulaire de FIB5, FIB8 et FIB9 d'*Arabidopsis thaliana* reste cependant à confirmer expérimentalement, par exemple par une approche de microscopie utilisant des constructions de fusion des peptides d'adressage de ces protéines avec une protéine fluorescente. Les données de protéomique de plus en plus nombreuses permettront également de répondre à cette question.

Les gènes *FIB* montrent des expressions différentes selon les organes ou les conditions de culture des plantes. Des profils d'expression de type inductible (*FIB1a*, *1b*) ou de type constitutif (*FIB2*) ont été mis en évidence chez *Arabidopsis thaliana*. On peut en général lier l'induction de l'expression des gènes *FIB* à des conditions provoquant un stress chez la plante (Pruvot *et al* 1996a), ou à des phénomènes de stockages de caroténoïdes (Deruère *et al* 1994b). Chez notre modèle *Arabidopsis thaliana*, nous avons constaté l'expression préférentielle du gène *FIB1b* dans les fleurs, comme celle de son homologue *PAP2* chez *Brassica rapa* (Kim *et al* 2001), ou le gène *CHRC* de *Cucumis sativus* (Smirra *et al* 1993). Cependant, chez *Arabidopsis thaliana*, contrairement à ces deux autres plantes aux pétales colorés où s'accumulent les homologues des fibrillines, ce n'est pas dans les pétales qui sont blancs car ne stockant pas de caroténoïdes que la protéine FIB1b est présente en grande quantité, mais c'est principalement dans les anthères. Le rôle joué par la protéine FIB1b dans ce cas, n'est donc pas lié à une accumulation de caroténoïdes. Cette induction dans les anthères est donc vraisemblablement localisée dans les élaïoplastes, comme cela est observé chez d'autres *Brassica* (Ting *et al* 1998, Hernandez-Pinzon *et al* 1999) et doit être liée aux structures lipidiques relarguées sur les grains de pollen lors de la lyse des cellules du tapis (Pifanelli *et al* 1998). L'étude de l'expression de ce gène dans les anthères d'*Arabidopsis thaliana* pourra confirmer cette hypothèse.

Nous avons montré que la protéine FIB1b s'accumule dans les feuilles sénescentes ; de plus nos plantes transgéniques présentent également une induction du promoteur de la fibrilline de poivron dans les feuilles sénescentes. On peut supposer que dans les plantes cultivées en conditions de carence nutritive, l'accumulation de FIB1b observée pourrait être liée à une accélération de la sénescence dans ces conditions. Il serait donc intéressant de voir si les plantes ARNi que nous avons produites et dont l'expression de la sous-famille *FIB1-2* est fortement diminuée, montrent une entrée en sénescence plus rapide que les plantes sauvages.

Les protéines fibrillines sont liées aux membranes ou à des structures lipidiques, mais la nature des interactions reste obscure. Des études biochimiques sur les fibrillines permettraient de mieux cerner les interactions des fibrilline avec les caroténoïdes ou les lipides, ce qui permettrait de valider le modèle de la structure des fibrilles dans le fruit de poivron et de mieux comprendre le rôle de cette protéine. Un premier pas a été effectué avec les expériences de traitement à la trypsine sur des plastoglobules (Tzen et Huang 1992) qui montrent le rôle de la fibrilline dans le maintien de la structure des plastoglobules dans le milieu aqueux. La modification des caractéristiques et du nombre de plastoglobules dans des plantes sur-exprimant un gène fibrilline semble confirmer cette hypothèse (Simkin 2002, Eymery et Rey 1999). Cependant, la caractérisation des interactions des protéines FIB avec les lipides ou les caroténoïdes reste à élucider pour comprendre ces phénomènes.

Les protéines de type fibrilline seraient impliquées dans le maintien des membranes dans des conditions où elles sont déstabilisées, notamment au niveau des thylacoïdes en cas de stress (Rey *et al* 2000). La multiplication des gènes chez les plantes supérieures, impliquant une possible redondance de fonction, complique l'analyse de la fonction de ces gènes. Nous avons tout de même réussi à montrer que, dans certaines conditions, affecter l'expression d'une partie de cette famille multigénique chez les plantes pouvait provoquer un retard de croissance. Ce retard est à confronter à la croissance favorisée de plants de tabac sur-exprimant la fibrilline de poivron (Rey *et al* 2000). Il sera intéressant d'analyser l'efficacité de la photosynthèse dans nos lignées ARNi pour voir si le retard de croissance observé dans ces plantes peut en être la conséquence.

Le rôle des autres membres de cette famille reste cependant à étudier avec des approches similaires. En effet, il se peut que les différents membres de la famille fibrilline se soient spécialisés et qu'ils n'aient plus le même rôle chez la plante. Une étude plus complète de l'expression des différents gènes et des protéines pour lesquelles ils codent apportera sans doute un début de réponse à cette question. Il sera judicieux d'analyser l'expression de tous

les gènes *FIB* dans les lignées RNAi que nous avons obtenues afin de déceler des régulations communes ou des effets de compensation. Cette compensation pourrait en effet être induite en réponse à la diminution de l'expression des gènes affectés par l'interférence ARN.

Dans cette étude, nous avons développé une approche de recherche de mutants de régulation du promoteur de la fibrilline de poivron chez *Arabidopsis thaliana*, méthode utilisée dans d'autres études pour la recherche de régulateurs d'un promoteur d'un gène (*RD29A*) inductible par un stress (Ishitani *et al* 1997). Cependant, nous n'avons pas pu trouver de conditions suffisantes et adaptées à un criblage pour notre promoteur de la fibrilline de poivron. En effet, celui-ci ne montre pas d'induction suffisante dans les conditions que nous avons testées. L'utilisation du promoteur d'un gène *FIB* endogène aurait peut être pu éviter ce problème. Cependant, la présence d'éléments régulateurs pouvant être situés dans les introns et conduisant au même type de problème d'induction avec ce promoteur endogène doit être prise en compte. Nous avons finalement isolé des mutants criblés d'après une altération de la régulation du promoteur *pFIB* dans les fleurs et ces mutants présentent également une altération de l'induction de ce promoteur provoquée par un stress triple (dont une exposition aux UV). La caractérisation des gènes mutés chez nos mutants permettra de déterminer les facteurs impliqués dans la régulation du promoteur de la fibrilline, et donc de mieux comprendre les phénomènes dans lesquels cette protéine joue un rôle. L'étude de l'expression des gènes *FIB* endogènes permettra également de mieux comprendre les régulations croisées des différentes fibrillines.

# **MATÉRIEL ET MÉTHODES**

# **MATÉRIEL ET MÉTHODES**

## **1 SYSTÈMES BACTÉRIENS**

### **1.1 SOUCHES ET VECTEURS UTILISÉS**

Les différents clonages de cette étude ont été effectués dans les vecteurs pGEM-T easy (system I Promega) ou pBluescript SK (Stratagen) ; tous deux portant le gène de la résistance à l'ampicilline. Les souches bactériennes utilisées sont des TOP10 (*mcrA*, *delta (mrr-hsdRMS-mcrBC)*, *phi 80delta lac delta M15*, *delta lacX74*, *deoR*, *recA1*, *araD139 delta (ara, leu)*, 7697, *galU*, *galK*, *lambda<sup>-</sup>*, *rpsL*, *endA1*, *mupG*) ou des XL1blue (*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F<sup>+</sup>proAB lac<sup>f</sup>ZAM15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)*)).

La surproduction des protéines recombinantes dans *E. coli* est effectuée dans les souches BL21(DE3)pLysS (*F<sup>-</sup> ompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm* (DE3) pLysS (Cm<sup>R</sup>)) à partir d'un vecteur pET23a+ portant le gène de la résistance à l'ampicilline (Novagen).

Les constructions pour la transformation des plantes ont été produites dans des vecteurs binaires dérivés du vecteur pBI121 portant le gène de la résistance à la kanamycine (Clontech). Le transfert génétique chez *Arabidopsis thaliana* est opéré par la souche *Agrobacterium tumefaciens* GV3121.

### **1.2 CLONAGES**

Les clonages des ADNc ou des peptides de transit (séquences d'adressage) des fibrillines d'*Arabidopsis thaliana* ont été effectués par RT-PCR (Matériel et Méthodes § 5.5 et 5.6) avec des oligonucléotides spécifiques (Tableau 7). Afin de réduire le nombre d'erreurs de séquence et assurer une bonne élévation même dans le cas de séquences d'ADN longues, nous avons utilisé l'Elongase Mix (Invitrogen) selon les recommandations du fournisseur. Les fragments PCR amplifiés sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose (TBE 0,5x (45mM Tris-borate, 1mM EDTA), agarose de 0,8% à 1,5% (w/v) suivant la taille du fragment amplifié, bromure d'éthidium 0,5µg/ml de gel) dans du tampon TBE 0,5x sous une tension de 100V. La bande de gel correspondant à l'amplifié est ensuite découpée. L'ADN est extrait de la bande du gel d'agarose en faisant fondre à 55°C le morceau de gel dans solution NaI 6M (200µl/100mg). 15µl de billes de silice (silice Sigma à 100mg/ml équilibrées dans du tampon PBS (NaCl 8g/l, KCl 0,2g/l, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,44g/l, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,24g/l, pH : 7,4)) sont ajoutés, puis le tube est vortexé et placé dans la glace pendant 10 minutes. Le tube est ensuite centrifugé 20

secondes à 12000rpm. Après avoir jeté le surnageant, le culot est rincé deux fois par 500µl d'une solution de lavage (50mM NaCl, 10mM Tris HCl pH : 7,5, 2,5mM EDTA, éthanol 50% (v/v)) avant d'être repris dans 20µl d'eau distillée autoclavée. Après une centrifugation de 20 secondes à 12000rpm, le surnageant contenant l'ADN purifié est transféré dans un tube propre et conservé à -20°C. L'ADN purifié peut être inséré dans un vecteur de clonage pGEM-T easy (Promega) par ligation pendant la nuit à 4°C avec l'enzyme T4 DNA ligase fournie dans le kit. Le mélange de ligation est alors introduit chez *E. coli* Xl1blue par transformation par choc thermique.

### **1.3 CULTURES BACTÉRIENNES**

Les cultures bactériennes sont effectuées dans du milieu LB (Luria Bertani) liquide (NaCl 10g/l, extrait de levure 5g/l, bactotryptone 10g/l), ou en milieux LB gélosé en boîte de Pétri par addition d'agar à 8g/l à du milieu LB liquide. Les cultures d'*E. coli* sont incubées à 37°C et celles d'*Agrobacterium* à 28°C en présence des antibiotiques adéquats (kanamycine 50µg/µl, ampicilline 100µg/µl) et sous agitation (150rpm) dans le cas d'une culture liquide.

### **1.4 CELLULES D'E. COLI COMPÉTENTES**

La transformation bactérienne requiert des cellules « compétentes » obtenues par le traitement suivant sur les souches d'*E. coli*.

Un erlen de 250ml de milieu LB auquel on a rajouté du glucose (0,2% w/v) estensemencé avec 500µl d'une préculture bactérienne et incubé sous agitation à 30°C jusqu'à atteindre une DO<sub>600nm</sub> de 0,5. Les cellules sont alors refroidies dans la glace pendant une heure et demie puis centrifugées 10 minutes à 2500g à 4°C. Le culot bactérien est doucement resuspendu dans 5ml de tampon fraîchement préparé (100mM CaCl<sub>2</sub>, 70mM MnCl<sub>2</sub>, 40mM NaOAc, pH : 5,5 avec de l'acide acétique glacial, stérilisation par filtration 0,22µm), puis diluées jusqu'à un volume de 30ml avec le même tampon. Après une incubation de 45 minutes dans la glace, les cellules sont centrifugées 5 minutes à 1800g à 4°C puis doucement resuspendues dans 5ml de tampon. Finalement, du glycérol est ajouté pour une concentration finale de 15% (v/v) et les cellules sont aliquotées par 200µl et stockées à -80°C. Un tube sera utilisé pour chaque transformation (Sharman D. O'Neil, Environmental Horticulture 1998).

### 1.5 TRANSFORMATION D'E. COLI

L'ADN (résultat d'une ligation, miniprep...) est ajouté aux cellules compétentes décongelées sur glace, et après homogénéisation le tube est replacé dans la glace. Après 30 minutes, un choc thermique à 37°C est effectué pendant une minute puis le tube est laissé à 37°C pendant une heure après addition d'un millilitre de milieu LB liquide. Les bactéries sont alors sédimentées par centrifugation 5 minutes à 4500rpm et étalées sur boîte de Pétri contenant du milieu LB agar auquel on a préalablement ajouté l'antibiotique adéquat. Les colonies issues de cellules transformées sont testées par digestion enzymatique. Une étape de séquençage est éventuellement réalisée afin de vérifier que le fragment PCR cloné ne comporte pas de mutation.

### 1.6 EXTRACTION D'ADN PLASMIDIQUE D'E. coli

L'ADN plasmidique des souches d'*E. coli* est isolé en routine par mini-préparation de la façon suivante.

1,5ml de culture bactérienne sont sédimentés dans un microtube par centrifugation 20 secondes à 12000rpm. Après élimination du surnageant, le culot est repris dans 300µl de tampon TENS (Tris-HCl pH : 8 10mM, EDTA 1mM, NaOH 0,1M, SDS 0,5%), puis 150µl d'acétate de K 3M pH : 4,7 sont ajoutés avant de vortexer le tube. Suite à une centrifugation de 3 minutes à 12000rpm, le surnageant est transféré dans un tube propre complété par 1ml d'éthanol. Après avoir inversé 2-3 fois les tubes pour précipiter l'ADN, celui-ci est sédimenté par centrifugation 3 minutes à 12000rpm à 4°C. Le culot d'ADN est alors rincé à l'éthanol 70% (v/v) et séché à température ambiante. Enfin, il est repris dans 30µl d'eau distillée autoclavée et conservé à -20°C.

Les constructions élaborées à partir de souches d'*E. coli* peuvent ensuite être introduites chez *Agrobacterium tumefaciens* par transformation de cellules compétentes (Adapté de « 10 minutes miniprep », Biotech Net Vol.8, No.2 1990).

### 1.7 CELLULES D'AGROBACTERIUM COMPÉTENTES

Une préculture d'*Agrobacterium tumefaciens* est effectuée dans du milieu LB pendant la nuit à 28°C. Deux millilitres de la préculture sontensemencés dans 50ml de milieu LB liquide et la culture est mise à pousser jusqu'à atteindre une DO<sub>600nm</sub> de 0,5. La culture est alors incubée 10 minutes dans la glace avant d'être centrifugée 5 minutes à 3000g à 4°C. Les cellules sont alors remises en suspension dans 1ml d'une solution de CaCl<sub>2</sub> 20mM, aliquotées par 100µl

puis stockées à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Un tube sera utilisé pour chaque transformation compétentes (Adapté de « Freeze-thaw transformation of *Agrobacterium* », Chen *et al.* 1994 Biotechniques 16 :664-669).

### **1.8 TRANSFORMATION D'AGROBACTERIUM**

5 $\mu\text{l}$  d'ADN plasmidique d'*E.coli* sont ajoutés aux cellules d'*Agrobacterium* compétentes décongelées sur la glace. Après avoir mélangé doucement, le tube est plongé dans l'azote liquide pendant 5 minutes, puis mis à température ambiante une minute. Ensuite le tube est incubé 20 minutes à  $37^{\circ}\text{C}$  et après ajout d'un millilitre de milieu LB liquide, il est placé 2 à 4 heures à  $28^{\circ}\text{C}$  sous agitation à 150rpm. Enfin les bactéries sont sédimentées par centrifugation 3 minutes à 4 500rpm à  $4^{\circ}\text{C}$  et le surnageant est éliminé. Le culot est enfin resuspendu dans le liquide résiduel avant étalement sur boîte de Pétri contenant du milieu LB agar avec les antibiotiques adéquats (Adapté de Freeze-thaw transformation of *Agrobacterium* », Chen *et al.* 1994 Biotechniques 16 :664-669).

### **1.9 VÉRIFICATION DE LA CONSTRUCTION INTRODUITE DANS AGROBACTERIUM**

Pour vérifier que le plasmide a bien été introduit dans la souche d'*Agrobacterium*, on transforme *E. coli* avec l'ADN d'*Agrobacterium* obtenu par mini-préparation et on effectue la vérification de la construction indirectement sur l'ADN plasmidique des cellules d'*E. coli* transformées.

### **1.10 EXTRACTION D'ADN D'AGROBACTERIUM**

1,5ml d'une culture pendant la nuit d'*Agrobacterium* sont sédimentés dans un microtube par centrifugation 20 secondes à 12000rpm. Après avoir éliminé le surnageant, le culot est repris dans 300 $\mu\text{l}$  de tampon TENS (protocole de miniprep d'*E. coli*) et incubé 10 minutes à température ambiante. Puis 30 $\mu\text{l}$  de phénol saturé pH : 8 sont ajoutés avant de vortexer le tube quelques secondes. Après ajout de 150 $\mu\text{l}$  d'acétate de Na 3M pH : 5,2 le tube est agité puis incubé 15 minutes à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Suite à une centrifugation de 3 minutes à 12000rpm à  $4^{\circ}\text{C}$ , le surnageant est transféré dans un tube propre complété avec de l'éthanol 95% (v/v). Après une incubation de 30 minutes à  $-20^{\circ}\text{C}$ , le tube est centrifugé 3 minutes à 12000rpm. Le surnageant éliminé, le culot est resuspendu dans de l'acétate de Na 0,3M pH : 5,2 et le tube est alors complété avec de l'éthanol 95% (v/v). Après une agitation douce et une incubation de 30 minutes à  $-20^{\circ}\text{C}$ , le tube est centrifugé 3 minutes à 12000rpm. Le culot obtenu est lavé

à l'éthanol 70% (v/v) puis séché. Il est enfin repris dans 20 µl d'eau distillée autoclavée et conservé à -20°C.

### **1.11 EXPRESSION DES PROTÉINES RECOMBINANTES**

Pour la production de protéines recombinantes, une étiquette de 6 histidines a été rajoutée en position C-terminale des protéines d'intérêt grâce au vecteur pET23a+ (Novagene).

La surproduction de protéines recombinantes dans une culture bactérienne qui a poussé jusqu'à une  $DO_{600nm}$  de 0,6 est induite par addition d'IPTG 1mM puis culture pendant 3 heures supplémentaires. Les bactéries sont alors culottées par centrifugation une minute à 12000rpm. Le culot est repris dans 50µl d'eau et 50µl de tampon de charge « Laemli » (0.1M Tris pH : 6,8, SDS 5%, glycérol 20%, bleu de bromophénol, et avant utilisation :  $\beta$ -mercaptoéthanol 50µl/ml) avant d'être incubé 5 minutes à 100°C. L'échantillon est alors prêt à être chargé sur un gel dénaturant SDS-PAGE.

## **2 MATÉRIEL VÉGÉTAL ET CONDITIONS DE CULTURE**

### **2.1 LES PLANTES**

Les plants d'*Arabidopsis thaliana* utilisés lors de cette étude sont issus de l'écotype Columbia (Col).

### **2.2 CULTURES EN TERRE**

Le terreau agricole est stérilisé à l'autoclave pendant 3 heures avant utilisation. L'arrosage des plants d'*Arabidopsis thaliana* peut être complété par l'emploi d'un engrais universel pour cultures (NPK 12.12.17).

Dans le cas de semis à la serre, les conditions de cultures sont sujettes à l'ensoleillement de saison. Des lampes halogènes (Mazda 1000w 24000 lumens) permettent de pallier à la diminution de la durée du jour en hiver afin de maintenir une photopériode de 16 heures. La température de la serre est de l'ordre de 24°C.

Pour les semis en chambre de culture, une intensité lumineuse de  $100\mu E.m^{-2}.sec^{-1}$  est assurée par des tubes fluorescents horticoles (Mazda 36w), et des lampes halogènes (Mazda 1000w 24000 lumens) pour obtenir une photopériode de 16 heures, et la température est maintenue autour de 24°C.

### 2.3 CULTURES IN VITRO

Toutes les manipulations de cultures *in vitro* sont effectuées sous une hotte à flux laminaire afin de limiter toute contamination.

Les graines d'*Arabidopsis thaliana* sont stérilisées et semées comme suit : une pastille de javel est dissoute dans 40ml d'eau distillée, puis 4 volumes d'éthanol 100% sont ajoutés à la solution. Les graines d'*Arabidopsis thaliana* sont trempées pendant 5 minutes dans cette solution en agitant de temps en temps, puis elles sont rincées 3 fois à l'éthanol. Finalement, elles sont laissées à sécher sous la hotte pendant la nuit. Les graines sont semées sur milieu MS (2,2g/l Murashige & Skoog basal salt mixture Sigma, 10g/l saccharose, 0,5g/l MES et 8g/l d'agar) avec éventuellement de la kanamycine à 50mg/l pour visualiser la ségrégation du transgène. Les boîtes sont maintenues de 24 à 48 heures à 4°C à l'obscurité avant incubation en chambre de culture de afin de synchroniser la germination.

Les cultures *in vitro* sont effectuées en chambre de culture avec une photopériode de 16 heures assurée par des tubes fluorescents horticoles (Mazda 36w), et la température est stabilisée à 25°C.

### 2.4 TRAITEMENTS ET STRESS APPLIQUÉS AUX PLANTES

Différents traitements et stress ont été appliqués aux plantes durant cette étude.

Les études par northern de l'effet de stress ont été effectuées sur des feuilles matures saines excisées et placées en boîtes de Pétri sur de l'eau distillée pour le contrôle, sans eau pour le stress déshydratation, sur une solution de NaCl 250mM pour le stress salin, et sur de l'eau distillée et à 4°C pour le stress froid. Ces traitements ont été conduits pendant 4, 8, 12, ou 24 heures en chambre de culture (Matériel et Méthodes § 2.3) sauf pour le stress froid où les boîtes sont placées en chambre froide en présence de lumière modérée (environ  $50\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$ ).

Lors de l'analyse de l'effet de stress sur l'activité des gène rapporteurs chez les lignées transgéniques, les traitements ont été réalisés sur des plantules de 7 ou 15 jours après germination. Les boîtes de Pétri de milieu MS gélosé contenant les plantules sont laissées ouvertes sous une hotte à flux laminaire pendant 5 heures pour le stress déshydratation en comparaison avec une boîte contrôle non ouverte. Un stress salin est effectué par transfert des plantules sur une solution de NaCl 250mM pendant 5 heures par rapport à une condition contrôle où pour laquelle les plantules sont mises sur de l'eau distillée. D'autres expériences visant à expérimenter des conditions de stress induites par l'utilisation de produits chimiques

et d'herbicides (paraquat 100µm, norflurazon ....) ont été réalisées de la même façon en transférant les plantules sur une solution aqueuse contenant le produit à tester. Le contrôle est réalisé avec de l'eau distillée. Les stress mécaniques sont effectués sur des feuilles matures saines excisées qui ont été lacérées avec une lame de scalpel et placées en chambre de culture dans une boîte de Pétri contenant de l'eau distillée. Un stress UV a été également appliqué à des plantules de 15 jours ayant poussé sur boîte de milieu MS. Les boîtes sont ouvertes et posées sur de la glace sous une hotte à flux laminaire avec la ventilation au minimum, et la lampe UV (tube UV germicide 90cm 30w G30T8 émission 8,4w à 253,7nm pour 80mw/cm<sup>2</sup> à 1m) de stérilisation de la hotte est alors allumée. Les plantules sont donc exposées aux UV, à une déshydratation et à une baisse de température.

### **3 TRANSGÉNÈSE**

#### **3.1 TRANSFORMATION D'ARABIDOPSIS THALIANA**

Les plants d'*Arabidopsis thaliana* sont transformés de manière classique par « trempage des fleurs » dans une suspension de bactéries *Agrobacterium tumefaciens* contenant notre construction génique.

Avant transformation, afin d'augmenter le nombre de fleurs aptes à la transformation, les premières inflorescences sont coupées afin de stimuler la pousse d'inflorescences supplémentaires. 4 à 6 jours après la coupe, les plantes présentant un maximum de fleurs immatures sans siliques sont prêtes à être « trempées » (Clough et Bent 1998).

Une culture de 250ml de la souche d'*Agrobacterium* comportant la construction d'intérêt est mise à pousser pendant la nuit. Après centrifugation à 4000g à 4°C pendant 10 minutes, le culot est repris dans une solution fraîche de saccharose 5% de manière à obtenir une DO<sub>600nm</sub> de 0,8 à laquelle on ajoute du détergent Silwet (Lehlee Seed (USA)) à 0,05% (v/v). Les inflorescences sont alors plongées dans la suspension bactérienne 2 à 3 secondes et les plantes sont ensuite recouvertes d'un film plastique et placées pendant 2 jours à l'abri d'une lumière excessive. Le film plastique est ensuite enlevé et les plantes sont cultivées normalement et menées à graines.

Les plantes transformées seront alors sélectionnées par germination des graines sur milieu MS (Matériel et Méthodes § 2.3) avec de la kanamycine à 50mg/l, puis étudiées.

### **3.2 PROMOTEURS ET GÈNES RAPPORTEURS**

Différents promoteurs et gènes rapporteurs ont été utilisés lors de cette étude :

Le promoteur de la fibrilline de poivron utilisé dans cette étude provient de la séquence décrite dans l'article de Kuntz *et al.* (1998).

Le promoteur constitutif 35S du virus de la mosaïque du tabac est issu du vecteur pBI221 (Clontech).

Les gènes *YFP* (yellow fluorescent protein) correspond au gène *EYFP* (« enhanced ») décrits dans l'article de Kato *et al.* (2002).

Le gène *GUS* codant la glucuronidase vient du vecteur pBI221 (Clontech).

Le gène de la luciférase provient d'un plasmide issu du vecteur pGL3 (Promega).

### **3.3 CONSTRUCTIONS UTILISÉES POUR LA TRANSFORMATION DES PLANTS D'ARABIDOPSIS THALIANA**

La construction utilisée pour la mutagenèse chez *Arabidopsis thaliana* (Figure 35) est composée de deux promoteurs de la fibrilline de Poivron en position « têtes-bêches », contrôlant chacun l'expression d'un gène rapporteur : la luciférase et la glucuronidase (Matériel et Méthodes § 3.2). Cette construction comprend les terminateurs NOS de la nopaline synthase pour chacun des gènes présents. Le marqueur de sélection présent ici est le gène *NPTII* qui code l'enzyme néomycine phosphotransférase qui confère à la plante transformée la capacité de pousser sur un milieu contenant l'antibiotique kanamycine.

### **3.4 FUSIONS AVEC LA YFP**

Pour déterminer la localisation subcellulaire de certaines fibrillines d'*Arabidopsis thaliana*, la séquence de chaque peptide d'adressage supposé, déterminée par analyse informatique (paragraphe analyse informatique), a été clonée en fusion traductionnelle avec le gène de la *YFP* sous le contrôle du promoteur constitutif 35S. Des plants d'*Arabidopsis thaliana* ont été transformés (Matériel et Méthodes § 3.1) avec ces différentes constructions et la localisation subcellulaire de la protéine chimérique de ces plantes a été analysée par microscopie confocale à fluorescence (LEICA LCS SP2).

### **3.5 CONSTRUCTION ARN INTERFÉRENCE (ARNi)**

Afin de réprimer l'expression des gènes *AtFIB1a*, *1b* et *2* simultanément, une fusion composée du fragment interne XhoI-BglII de 141 pb du gène *AtFIB1a*, suivi du fragment

BglIII-XbaI de 204pb situé en 3' du gène *AtFIB2*, a été introduite de façon répétée inversée de part et d'autre de l'intron du gène *AtTGA1*. Si la séquence provenant de *AtFIB2* est spécifique de ce gène, celle provenant de *AtFIB1a* comporte deux éléments de 29 pb qui sont identiques dans *AtFIB1a* et *AtFIB1b* et qui devraient donc entraîner une répression des deux gènes à la fois (Figure 27). Cette construction a été introduite sous le contrôle du promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur et du terminateur NOS dans un vecteur de type binaire dérivé du pBI101 (Clontech, Zhou *et al.* 2004).

Afin de réprimer l'expression des gènes *AtFIB3a* et b, l'ADNc correspondant à *AtFib4* a été introduit par clonage dans le vecteur donneur de type Gateway® pENTR 2b (Invitrogen) afin d'être utilisé pour effectuer une recombinaison avec le vecteur receveur pH7GW1WG2 (II), (Karimi *et al.* 2002) à l'aide de la clonase LR™ (Invitrogen) selon les recommandations du fournisseur. Le plasmide obtenu a été introduit dans *Agrobacterium* puis utilisé pour transformer *Arabidopsis thaliana*. Les plantes transformées correspondantes sont résistantes à l'hygromycine.

#### **4 MUTAGENÈSE**

Un stock de graines de la lignée transgénique homozygote a été soumis à une mutagenèse chimique classique à l'EMS. Des conditions standard de mutagenèse à l'EMS sont déjà établies, mais elles doivent être affinées (Feldman *et al.* 1994, Lightner et Caspar 1998). Nous nous sommes basés sur les conditions utilisées auparavant dans le laboratoire lors des travaux de thèse de Gallois (2000) qui ont donné des résultats satisfaisants. Environ 25000 graines ont été imbibées dans de l'eau distillée pendant la nuit avec agitation. L'EMS est ajouté aux graines dans l'eau pour une concentration de 0,2% pendant 18h00. Les graines sont ensuite lavées 10 fois 2 minutes dans de l'eau puis une fois 30 minutes. Tous les effluents et la vaisselle sont décontaminés par traitement à la soude 3M pendant une demi heure. Les graines sont ensuite homogénéisées dans un gel d'agar à 0,15% pour faciliter la répartition. Les graines sont semées en terre en pipetant sur les pots l'agar dans lequel elles sont en suspension.

## **5 ANALYSE DES ACIDES NUCLÉIQUES**

### **5.1 EXTRACTION D'ADN GÉNOMIQUE**

Environ 1 cm<sup>2</sup> de feuille est broyé dans un microtube à l'aide d'un piston en présence d'un tampon de lyse (CTAB 1%, Tris HCl 0,2M pH : 7,5, EDTA 50mM, NaCl 1M, et juste avant utilisation  $\beta$ -mercaptoéthanol 1 $\mu$ l/ml). Après avoir ajouté 20 $\mu$ l de N-lauryl-sarcosyl 5% (w/v) et homogénéisé, l'échantillon est incubé 15 minutes à 65°C, puis mis à refroidir 5 minutes à température ambiante. Après extraction par 200 $\mu$ l de chloroforme, l'ADN génomique de la phase aqueuse résultante est précipité par 200 $\mu$ l d'isopropanol froid (-20°C). Le culot d'ADN est lavé à l'éthanol 70% puis 100%, séché à température ambiante et repris dans 30 $\mu$ l d'eau distillée autoclavée avant dosage. Ce protocole est adapté de Doyle et Doyle 1987.

### **5.2 SOUTHERN BLOT**

Les enzymes de restriction utilisées ici sont EcoRI qui coupe de chaque côté du transgène inséré et KpnI qui ne coupe qu'une seule fois au milieu du transgène. Pour chaque digestion, 5 $\mu$ g d'ADN génomique (obtenus avec le protocole § 5.1 sur 2 ou 3 feuilles entières) sont repris dans un volume final de 100 $\mu$ l du tampon de digestion adéquat et placés dans la glace pendant 3-4 heures. Ensuite, 5 unités d'enzyme sont ajoutées et le tube est incubé à 37°C pendant environ 6 heures. 10 unités d'enzyme sont alors rajoutées et le tube est laissé à incuber toute la nuit. Un nouvel ajout de 5 unités est effectué le lendemain et la digestion est encore maintenue 3-4 heures.

L'ADNg digéré est alors purifié par une extraction au chloroforme et précipité depuis la phase aqueuse résultante par 1/10<sup>ème</sup> de volume d'acétate de Na 3M pH : 5,2 et 2 volumes d'éthanol. Après deux lavages à l'éthanol 70%, le culot d'ADNg est repris dans 30 $\mu$ l. Les produits de digestion sont séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose 0,8% (w/v) (Matériel et Méthodes § 1.2) pendant la nuit sous une tension de 30V. Le gel coloré au bromure d'éthidium est ensuite photographié avant d'être traité 30 minutes successivement dans des bains d'HCl 0,25N, d'une solution 0,5M Tris HCl pH : 7, et 1,5M NaCl et de 10xSSC (NaCl 87,65g/l, citrate de Na 44.1g/l, pH : 7) avec un rinçage rapide à l'eau distillée entre chaque solution. Le gel est enfin mis à transférer sur membrane de nitrocellulose dans du tampon 10xSSC toute la nuit. La membrane est ensuite rincée 5 minutes dans du 5xSSC puis incubée à 80°C pendant une demi heure pour fixer l'ADNg. La membrane est ensuite traitée comme indiqué au paragraphe 5.4 du Matériel et Méthodes pour le northern.

### 5.3 EXTRACTION DES ARN TOTAUX D'ARABIDOPSIS THALIANA

Les ARN provenant de tissus d'*Arabidopsis thaliana* ont été extraits soit à l'aide des kits RNeasy de Qiagen ou TriReagent de MRC selon les recommandations du fournisseur, soit d'après le protocole suivant (« Preparation of RNA, Methods in Molecular Biology, Vol 82 : Arabidopsis protocols p.85») :

Les échantillons sont broyés dans de l'azote liquide. Pour environ 500µl de poudre d'échantillon, 550µl de tampon d'extraction (0,2M Tris-HCl pH 9, 0,4M LiCl, 25mM EDTA, 1% SDS) sont ajoutés et le tube est vortexé jusqu'à homogénéisation. 500µl de phénol saturé en eau sont ensuite ajoutés et l'émulsion produite en vortexant est placée à 4°C pendant la préparation des échantillons suivants. Après une centrifugation de 2 minutes à 12000rpm à température ambiante, une deuxième extraction au phénol est effectuée. La phase aqueuse est récupérée dans un nouveau tube et 550µl de chloroforme sont ajoutés, puis le tube est vortexé et centrifugé. La phase aqueuse est de nouveau récupérée dans un tube propre et les ARN sont précipités avec 50µl d'acétate de Na 3M pH : 5,3 et 1ml d'éthanol 5 minutes à -80°C. Après une centrifugation de 5 minutes à 12000rpm à 4°C, le surnageant est éliminé et le culot est solubilisé dans 300µl de LiCl 2M, puis le tube est placé dans la glace 10 à 30 minutes. Suite à une centrifugation de 5 minutes à 12000rpm à 4°C, le surnageant est éliminé et le culot est repris dans 300µl d'eau stérile autoclavée puis reprécipité avec 30µl d'acétate de Na 3M pH : 5,3 et 600µl d'éthanol pendant 5 minutes à -80°C. Après une centrifugation de 5 minutes à 12000rpm à 4°C, le surnageant est éliminé puis le culot est rincé à l'éthanol 70%, séché et repris dans environ 50µl d'eau distillée autoclavée.

Les ARN totaux, analysés par northern blot, ont été extraits grâce à un protocole utilisant un inhibiteur de RNase : l'acide aurin tricarboxylique (ATA). Les échantillons broyés dans de l'azote liquide et 500µl de poudre sont homogénéisés dans 1ml de tampon (Tris HCl pH : 8 50mM, NaCl 300mM, EDTA 5mM, SDS 2%, ATA 2mM, et juste avant utilisation β-mercaptoéthanol 14mM). Après incubation à 4°C dans un bac à glace pendant 10 minutes 140µl de KCl 3M refroidis à 4°C sont ajoutés dans les tubes qui sont remis à 4°C pendant 15 minutes. Suite à une centrifugation de 10 minutes à 12 000rpm, le surnageant est transféré dans un tube propre avec 400µl de LiCl 8M pour une nuit de précipitation à -20°C. Une autre centrifugation de 10 minutes à 12 000rpm permet de sédimenter les ARN qui sont ensuite repris dans 400µl d'une solution d'ATA à 2mM. Après une extraction avec 600µl de phénol, la phase aqueuse subit une précipitation avec 40µl de d'acétate de Na 3M et 800µl d'éthanol.

Le culot obtenu est enfin lavé à l'éthanol 80%, séché puis repris dans 20µl d'une solution d'ATA à 2mM.

## 5.4 NORTHERN BLOT

### 5.4.1 Gel et transfert

Pour chaque échantillon, 5 à 10µg d'ARN sont repris dans un volume de 10µl auquel sont ajoutés 30µl de tampon de charge (5ml formamide déionisée, 1,75ml formaldéhyde, 500µl tampon de migration 10X (voir plus bas), 450µl d'eau, 50µl de bromure d'éthidium à 10mg/ml, 1ml bleu (5ml glycérol, 20µl EDTA 0,5M, bleu de bromophénol)). Après une dénaturation de 3 minutes à 65°C, les échantillons sont refroidis dans la glace avant d'être chargés sur gel d'agarose 1% contenant du tampon de migration 1x (tampon 10X : MOPS 200mM, acétate de Na 50mM, EDTA 2mM, pH : 7) et 2,5% (v/v) de formaldéhyde 37%. Après migration dans du tampon de migration 1X, les ARN sont transférés par capillarité sur membrane de nitrocellulose dans du tampon SSC 10X toute la nuit. La membrane est ensuite rincée 5 minutes dans du 5xSSC, puis incubée à 80°C pendant une demi heure pour fixer les ARN.

### 5.4.2 Marquage radioactif de la sonde par amorçage aléatoire

Une sonde spécifique du gène à étudier est obtenue par marquage radioactif au  $^{32}\text{P}$ -dCTP avec le kit de marquage « Prime a Gene » de chez Promega d'après les recommandations du fournisseur.

### 5.4.3 Purification de la sonde

La sonde est purifiée sur colonne Sephadex G25 Pharmacia-Amersham (préparée dans du tampon TE : Tris 10mM, EDTA 1mM, pH : 7). Pour cela, du bleu dextran est ajouté à la sonde avant dépôt sur la colonne. Lors de l'élution avec du tampon TE, la fraction contenant la sonde marquée migrant avec le bleu est récupérée dans un tube à part. Elle est dénaturée à 100°C pendant 5 minutes et refroidie dans la glace avant d'être utilisée pour l'hybridation.

### 5.4.4 Hybridation et révélation

La membrane humidifiée avec de l'eau distillée autoclavée est insérée dans un tube et mise à préhybrider dans un tampon de préhybridation (6xSSC, 1x Denhardt's (solution 50x : 1% ficoll, 1% PVP, 1% BSA), 0,1% SDS, ADN de sperme de hareng 20mg/100ml Sigma) dans

un four à 65°C (ou 55°C suivant la sonde utilisée) avec agitation pendant une heure. La sonde marquée et purifiée est alors ajoutée au tampon de préhybridation et la membrane est laissée en hybridation toute la nuit. La membrane est ensuite lavée deux fois dix minutes dans un tampon 2xSSC, 0,1% SDS, puis encore deux fois dans un tampon 0,2xSSC, 0,1% SDS, ceci à une température identique à la température d'hybridation. Après emballage dans un film plastique, elle est finalement exposée avec un film autoradiographique Kodak Biomax MR-1 à -80°C dans une cassette contenant deux écrans intensifieurs Kodak (Biomax MS intensifying screen) jusqu'à apparition d'un signal (7 à 48 heures).

### **5.5 TRANSCRIPTION INVERSE**

Les ARN totaux sont utilisés à raison de 1 à 4µg pour les réactions de reverse transcription avec de la MMLV (GibcoBRL) selon les recommandations du fournisseur. Afin de vérifier que les échantillons ne contiennent pas de contamination par de l'ADN génomique, une PCR est réalisée sur une fraction des ARN. Afin de limiter la dégradation des ARN, 40 unités d'inhibiteur de RNase (RNaseOUT Invitrogen) sont ajoutées à la réaction.

### **5.6 PCR (RÉACTION EN CHAÎNE DE LA POLYMÉRASE)**

Environ un nanogramme d'ADNg ou 1 à 4 µl de RT sont utilisés par réaction de PCR de 25µl. Les PCR sont effectuées avec de la Taq polymérase provenant de Invitrogen selon les recommandations du fournisseur. La concentration des amorces oligonucléotidiques est d'environ 10µM chacune et nous utilisons une concentration de MgCl<sub>2</sub> de 2,5mM. La température d'hybridation est généralement de 55°C (adaptée selon le T<sub>m</sub> de l'oligonucléotide) et le nombre de cycles effectués peut varier de 20 à 35 (30 en général).

Un cycle PCR est composé classiquement de :

Dénaturation 45s

Hybridation 30s

Élongation 30s (pour une élongation de 500pb)

## **5.7 DÉTERMINATION DE L'EXTREMITÉ 5' D'UN TRANSCRIT PAR EXTENSION D'AMORCE**

### **5.7.1 Marquage de l'oligonucléotide amorce**

A environ 100 ng d'oligonucléotide, sont ajoutés 5 µL de  $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP, 1 µL de tampon 10x, 1 µL de T4 PNK (Polynucleotide Kinase), soit un volume final de 10 µL. L'ensemble est incubé 1 heure à 37°C. Pour purifier l'oligonucléotide : une colonne de 1 mL (seringue) de billes de Séphadex G-25 ou G-50 (2g de Séphadex dans 150 µL TE, incubé une nuit à température ambiante, puis conservation à 4°C) est utilisée. Pour arrêter la réaction : compléter le volume réactionnel à 200 µL avec du TE (10 mM Tris HCl pH8, 1 mM EDTA) ; ces 200 µL sont déposés sur la colonne (jeter ce qui en sort) et ajouter 300 µL de TE, récupérer le « passage » dans un tube Eppendorf noté 1, ajouter 350 µL de TE et récupérer le « passage » dans un tube Eppendorf noté 2, et enfin, ajouter 350 µL TE, récupérer le « passage » dans un tube Eppendorf noté 3. Il est important d'arrêter avant que la couleur rose du  $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP ne sorte de la colonne. Puis compter les cpm de chacun des 3 tubes et utiliser les plus radioactif.

### **5.7.2 Séquençage manuel**

Le protocole utilisé est celui du kit de séquençage manuel (kit T7 sequencing Kit ; USB). 2 µg d'ADN plasmidique (insert dans le vecteur TOPO PCR 2.1 (Invitrogen)) dilué dans un volume final de 32 µL sont dénaturés pendant 10 min à température ambiante, après ajout de 8 µL de NaOH 2M. Puis l'ADN est précipité par ajout de 7 µL d'acétate de sodium 3M pH 4,8, de 4 µL d'H<sub>2</sub>O et de 120 µL d'éthanol 100 %. Centrifuger 15 minutes à 14000 rpm et à 4°C, laver et sécher le culot. Puis reprendre ce dernier dans 10 µL H<sub>2</sub>O, ajouter 1 µL amorce spécifique, puis 1 µL H<sub>2</sub>O et enfin 2 µL de tampon d'hybridation (14 µL final), agiter au Vortex et centrifuger légèrement et mettre 5 min à 65°C, puis 10 min à 37°C, et au moins 5 minutes à température ambiante, puis faire une petite centrifugation afin de récupérer tout le volume réactionnel. Nommer 4 tubes Eppendorf : A, C, G et T, y mettre 2,5 µL de chacun des « *mix-short* » correspondant. Le marquage se fait ainsi: aux 14 µL, ajouter 3 µL de tampon de marquage dCTP, puis 1 µL de dCTP marqué, 2 µL de tampon de dilution et 0,5 µL T7 DNA Polymerase ; mélanger en pipetant, faire une petite centrifugation et laisser 5 min à température ambiante. Puis mettre les 4 tubes à 37°C pour 1 minute au moins, ajouter 4,5 µL de la réaction dans chacun d'eux et mettre 10 minutes à 37°C. Arrêter la réaction en ajoutant 5µL de solution « Stop » (97,5 % formamide, 10 mM EDTA, 0,3% bleu de bromophénol, 0,3

% xylène cyanol). Déposer 2 µL environ de chaque réaction, après avoir chauffé les quantités nécessaires 2 minutes à 75-80°C. Stocker le reste à -20°C.

### 5.7.3 Extension d'amorce

La quantité d'ARN varie selon le degré d'expression du gène à étudier : il faut que l'amorce marquée soit en excès. Pour les ARN de gènes plastidiaux, 10 µg d'ARN totaux suffisent en général. Prendre 5 µL ARN à 2 µg.µL<sup>-1</sup>, ajouter 2 µL d'oligonucléotides marqués (soit environ 100000 cpm) et de l'H<sub>2</sub>O qsp 14,5 µL. Dénaturer 10 minutes à 65°C, puis 5 minutes dans la glace. Pour l'hybridation placer le tube pendant 20 minutes à T<sub>m</sub>-5°C, puis les placer dans la glace. Pour la transcription inverse : au volume réactionnel de 14,5 µL, ajouter 1 µL de dNTPs 10 mM, 5 µL de tampon « *first strand* » 5x, 1 µL d'inhibiteur de Rnase, 2,5 µL DTT 0,1 M et 0,5 µL de Superscript II (Invitrogen ; 100 U). La réaction a lieu pendant 1 heure à 42°C. Pour l'arrêter, placer les tubes 15 minutes à 70°C. Puis ajouter 1 µL « RNase DNase free » et laisser pendant 30 minutes à 37°C. Ajouter 150 µL TE, puis 200 µL de phénol/chloroforme, agiter au Vortex et centrifuger 5 minutes à 12000 rpm. A la phase aqueuse récupérée, ajouter 20 µL d'acétate de sodium 3M, 400 µL éthanol 100 % et précipiter les ADNc une nuit à -20°C. Centrifuger 15 minutes à 14000 g, laver le culot à l'éthanol 70 % et le sécher. Puis le reprendre dans 3 µL TE, ajouter 5 µL de bleu stop, chauffer 4 min à 85°C et déposer sur le gel.

### 5.7.4 Gel d'électrophorèse de séquences manuel et d'extension d'amorces

Une des deux plaques est traitée avec du dimethyl Dichloro Silane afin d'éviter que le gel colle aux plaques de verre. Pour le matériel utilisé au laboratoire le volume suffisant est de 30 mL, soit 12,6 g d'urée dans un bécher, 3 mL de TBE 10x, 4,5 mL d'acrylamide 19/1 40 % (6 % final), 150 µL APS 10 %, 12 µL TEMED et H<sub>2</sub>O qsp 30 mL. Couler le gel sans bulles entre les plaques à l'aide d'une seringue, et vérifier la polymérisation grâce au reste conservé dans le bécher. L'électrophorèse se déroule sous une puissance de 20W (≈ 2000 V/ 20 mA) dans du TBE-S 1x (45 mM Tris borate, pH 8,3, 0,5 mM EDTA).

## 6 ANALYSE DES PROTÉINES

### 6.1 EXTRACTION DES PROTÉINES

#### 6.1.1 Extraction à partir de feuilles d'*Arabidopsis thaliana*

Les protéines de feuilles d'*Arabidopsis thaliana* sont extraites en présence d'un tampon « Laemli » (0.1M Tris pH : 6,8, SDS 5%, glycérol 20%, bleu de bromophénol, et avant utilisation 50µl/ml de β-mercaptoéthanol). Les échantillons broyés dans de l'azote liquide sont homogénéisés dans 300µl de tampon « Laemli », incubés 5 minutes à 100°C et centrifugés 5 minutes à 12 000rpm. Le tampon contenant les protéines est ensuite transféré dans un tube propre en prenant garde à ne pas pipeter les débris cellulaires sédimentés au fond du tube.

#### 6.1.2 Extraction à partir de chloroplaste d'*Arabidopsis thaliana*

L'équivalent d'une boîte de Pétri de plantules de 15 jours d'*Arabidopsis thaliana* est broyé dans un mixeur 3 fois 5 secondes en présence d'un tampon HB (sorbitol 0,45M, tricine KOH 20mM, EDTA 10mM, NaHCO<sub>3</sub> 10mM, BSA 0,1%, pH : 8,4). Le broyat est filtré sur gaze et toile à bluter puis centrifugé 3 minutes à 5000g. Le culot est alors repris délicatement dans 1ml de tampon RB (sorbitol 0,3M, tricine KOH 20mM, EDTA ,25mM, MgCl<sub>2</sub> 5mM, pH : 7,6). Des aliquotes de 200µl de la suspension sont alors centrifugés sur un coussin de 1ml de Percoll 40% (Percoll dilué à 40% dans du tampon RB 1x final) 5 minutes à 5000g dans un microtube. Les chloroplastes intacts se retrouvent sous le coussin de Percoll. Après aspiration du liquide, le culot est repris délicatement dans 500µl de tampon RB et le tube est centrifugé à nouveau afin d'éliminer le Percoll. Cette étape est répétée une fois, puis les culots sont conservés à -20°C avant utilisation, après solubilisation dans du tampon « Laemli » comme indiqué dans le paragraphe précédent.

### 6.2 GEL ET ÉLECTROPHORÈSE

Le gel de séparation (Tris-HCl pH : 8,8 0,5M, SDS 0,1%, acrylamide-bisacrylamide 13,0%-0,83%, persulfate d'ammonium 0,05% et TEMED 0,05%) est coulé entre les plaques d'un système mini-gel Biorad puis recouvert par un peu d'eau distillée. Une fois la polymérisation accomplie, l'eau distillée est évacuée et le gel de concentration est coulé (Tris-HCl pH6,8 125mM, SDS 0,1%, acrylamide-bisacrylamide 7,5%-0,5%, persulfate d'ammonium 0,06% et

TEMED 0,2%) en présence du peigne. Dans cette étude, des gels de 12,5 et 15% d'acrylamide ont été utilisés.

Les échantillons sont dénaturés à 100°C pendant 5 minutes puis déposés sur le gel de polyacrylamide dénaturant. Un marqueur de taille est déposé dans l'un des puits afin de déterminer la masse moléculaire apparente des protéines. L'électrophorèse est conduite à 30mA par gel sous refroidissement liquide dans un tampon de migration dénaturant 1x (Tris-HCl pH8,6 25mM, glycine 200mM, SDS 0,1%) pendant environ 1h 30 min. Les protéines du gel peuvent être colorées au bleu de Coomassie ou bien transférées sur membrane pour une immunodétection

### **6.3 TRANSFERT SUR MEMBRANE**

Les protéines séparées par SDS-PAGE peuvent être transférées sur membrane de 0,45mm (Millipore; Immobilon-P). Avant transfert, la membrane est trempée dans un bain d'éthanol 100% pendant 15 secondes. Ensuite, la membrane et les papiers Whatman 3MM sont trempés dans un bain de tampon de transfert (Tris-HCl 15mM pH 8,6, glycine 120mM, SDS 0,04%, éthanol 20%) pendant 5 minutes. Un sandwich comprenant papier Whatman, gel, membrane, papier Whatman est inséré dans l'appareil de transfert et recouvert par du tampon de transfert. Le transfert est effectué sous un courant de 200mA pendant 1h15 (selon la concentration du gel) et l'efficacité du transfert est déterminée en traitant la membrane par la solution Ponceau-S 0,5%, acide acétique 1%.

### **6.4 TRAITEMENT DE LA MEMBRANE**

La membrane est saturée dans du TBS (Tris 20mM, NaCl pH 7,4 50mM)-Tween 0,1% additionné de lait écrémé en poudre à 5% pendant la nuit à 4°C sous agitation afin de bloquer les sites non spécifiques de reconnaissance par les anticorps. Après rinçage dans du TBS-Tween 0,1%, la membrane est incubée dans du TBS-Tween 0,1% + lait écrémé 5% contenant l'anticorps primaire à la dilution désirée (1/3000<sup>ème</sup> pour l'anti HIS-Tag, 1/250<sup>ème</sup> pour les anticorps purifiés anti-FIB1b et anti-FIB3b). La membrane est incubée sous agitation à température ambiante pendant 4 heures. Après 6 lavages de 5 minutes dans du TBS-Tween 0,1%, la membrane est incubée dans une solution contenant l'anticorps secondaire (anti-souris ou anti-lapin selon l'organisme dont provient l'anticorps primaire) couplé à la peroxydase de Raifort (HRP, BioRad), dilué dans du TBS-Tween 0,1% + lait écrémé 5%, (1/3000<sup>ème</sup>)

pendant une heure sous agitation et à température ambiante. Ensuite la membrane est lavée 6 fois 5 minutes dans du TBS-Tween 0,1%.

### **6.5 DÉTECTION ECL**

L'anticorps secondaire est couplé à la peroxydase de Raifort (HRP). La réaction chimique consiste en l'oxydation du luminol par le peroxyde d'hydrogène, catalysé par la HRP, en condition alcaline. La luminescence est réalisée en présence de phénols qui amplifient la luminosité (environ 1000 fois). La lumière produite par cette réaction de chimioluminescence arrive à son apogée après 5 à 20 minutes et décline par la suite avec une demi-vie de 60 minutes. La lumière est émise à la longueur d'onde de 428nm et est détectée par exposition d'un film autoradiographique sensible à la lumière bleue (Kodak Biomax MR-1). La détection du signal est effectuée selon les indications du fabricant du système de détection ECL (Amersham Biosciences).

### **6.6 DOSAGE DES PROTÉINES**

La quantité de protéines des échantillons est estimée sur gel SDS PAGE en conditions dénaturantes et coloration au bleu de Coomassie, ou par dosage des protéines. Dans ce dernier cas, le tampon « Laemli » utilisé ne contient pas bleu de bromophénol.

Les protéines sont dosées selon la méthode de Lowry et al. (1951) en utilisant les systèmes Protein Assay ou DC Protein Assay (compatibles avec les détergents) de Biorad selon les recommandations du fournisseur pour les micro-essais. Une gamme standard est réalisée à l'aide d'une solution de sérum albumine bovine (BioRad) contenant entre 0.2 à 1.5mg/ml de protéine. L'absorbance est mesurée à 595nm sur un spectrophotomètre Hitachi U-1100.

## **7 ANTICORPS**

Dans cette étude, nous avons utilisé un anticorps commercial anti-His-Tag provenant de chez Amersham qui permet de détecter les étiquettes de 6 histidines (« His-Tag ») ajoutées en position C-terminale des protéines lors des clonages. Cet anticorps est utilisé en routine à une dilution de 1/3000<sup>ème</sup>.

Nous avons également utilisé deux anticorps que nous avons fait produire par la firme Eurogentec par immunisation de lapins.

Le premier anticorps « anti FIB1b » est dirigé contre la protéine recombinante tronquée en N-terminal (protéine partielle des acides aminés 89 à 311 de la fibrilline 1b ; positions 140 à la fin sur la figure 6).

Le second « anti FIB3b » a été réalisé contre deux peptides provenant de la séquence de FIB3b. Ces deux peptides ont été choisis en fonction de leur caractère immunogène potentiel et de leur spécificité de séquence pour la sous-famille FIB3a,b.

Peptide FIB3b-1 : -KLLSIRKGDRERLRI- (positions 25 à 39 sur la figure 6).

Peptide FIB3b-2 : -PLERGATASPDDQL- (positions 148 à 166 sur la figure 6).

## **7.1 PURIFICATION DES ANTICORPS**

Les anticorps dirigés contre les fibrillines 1b et 3b ont été purifiés contre leurs protéines recombinantes respectives car plusieurs bandes non spécifiques sont détectées chez les plantes avec le sérum total, ce qui rend l'interprétation des résultats délicate.

Les anticorps sont purifiés sur colonne Affi-Gel (Bio-Rad) par affinité. La colonne fixe les groupements amines primaires des protéines. Les anticorps sont ensuite purifiés par affinité pour la protéine fixée.

### **7.1.1 Préparation de la colonne**

Un mg de protéine est mis en présence de 1ml de résine Affi-Gel (Affi-Gel 10 si le  $6,5 < pI$  protéine  $< 11$ , Affi-Gel 15 si le  $pI$  protéine  $< 6,5$ ) préalablement lavée dans de l'HEPES 20mM pH : 8 pendant la nuit à 4°C (pour un volume final  $< 2,5$ ml). Les sites réactifs n'ayant pas fixé la protéine antigène (Ag) sont bloqués pendant 1 à 2 heures par du Tris 1M pH : 8. La colonne est ensuite lavée par 2 volumes de tampon BC500 (200mM Tris pH : 7,2, 20% (v/v) glycérol, 0,2mM EDTA, 10mM  $\beta$ -mercaptoéthanol, 50mM NaCl), puis équilibrée dans du tampon PBS (Matériel et Méthodes § 1.2).

### **7.1.2 Préparation du sérum**

15ml de sérum sont centrifugés 30 minutes à 15000g après avoir inactivé le complément par une incubation 30 minutes à 56°C.

### **7.1.3 Purification**

Le sérum clarifié est passé 3 fois sur la colonne. Cette dernière est lavée avec 20 volumes de tampon BC500, puis avec 1 volume de tampon PBS.

L'élution de l'anticorps est effectuée par 5 à 6 fractions de 900µl d'une solution de glycine 0,1M pH : 2,5 que l'on récolte dans un tube contenant 100µl d'une solution de Tris 1M pH : 8. Les fractions sont ensuite testées par dosage des protéines (Matériel et Méthodes § 6.6).

Les anticorps purifiés sont utilisés au 1/250<sup>ème</sup>.

## **8 DOSAGE QUANTITATIF DE L'ACTIVITÉ LUCIFÉrase**

Principe : l'enzyme luciférase hydrolyse son substrat : la luciférine, en produisant une émission de lumière avec un pic à 562nm. La lumière émise peut être quantifiée à l'aide d'un luminomètre.

Les échantillons sont broyés dans de l'azote liquide et homogénéisés dans un tampon CCLR (100mM phosphate de K pH : 7,8, 1mM EDTA pH : 8, 1% Triton X100, 10% glycérol, β-mercaptoéthanol). Après centrifugation 8 minutes à 12 000rpm, le surnageant est transféré dans un tube propre et utilisé pour les mesures quantitatives des activités luciférase et glucuronidase.

Le dosage des protéines est réalisé avec le système DC Protein Assay de Biorad (compatible avec les détergents) selon les recommandations du fournisseur.

Les mesures de l'activité luciférase de 10µl d'échantillon ajoutés à 100µl de mélange réactionnel Promega sont réalisées à l'aide d'un luminomètre (C Delta Life Prodermat). Les mesures sont effectuées 3 fois pendant 10 secondes avec un intervalle de 5 secondes entre chaque mesure.

Les résultats sont ramenés à la concentration en protéine des échantillons et exprimés en RLU/mg protéine (unités de lumière relative).

Une cinétique « standard » a été effectuée avec de la luciférase recombinante (Promega) afin de vérifier la linéarité des mesures sur la gamme de valeur utilisée.

## **9 DOSAGE QUANTITATIF DE L'ACTIVITÉ β-GLUCURONIDASE**

Principe : le substrat 4-méthylumbelliferyl β-D glucuronide (MUG, GibCoBRL) est hydrolysé par la glucuronidase (codée par le gène *GUS*) à 37°C en un composé fluorescent, le 4-méthylumbelliférone (4-MU, GibCoBRL).

Des tubes contenant 400µl de tampon GUS (Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1M pH : 7 50mM, EDTA pH : 8 10mM, 1% triton x100, pH : 7, β-mercaptoéthanol 10mM) additionnés de 100µl de MUG 5mM sont préchauffés à 37°C. 10µl d'extrait de protéines (paragraphe précédent) sont ajoutés

et le tube est vortexé. Des prélèvements de 100µl sont transférés chacun dans un tube contenant 1,9ml de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> afin de stopper la réaction enzymatique, ceci pour les temps 0, 15, 30 et 45 minutes.

## **10 COLORATION GUS HISTOCHIMIQUE**

Principe : la glucuronidase hydrolyse le X-GLUC à 37°C et donne un composé bleu aisément observable.

Les colorations GUS histochimiques sont réalisées avec un tampon de composition suivante : phosphate de Na pH : 7 100mM, EDTA pH : 8 10mM, Triton X100 0,1%, ferricyanide de K 1mM, ferrocyanide de K 1mM, X-GLUC (Euromedex) 0,5mg/ml. Les échantillons baignant dans le tampon de coloration subissent une infiltration sous vide pendant 5 minutes et sont ensuite incubés à 37°C pendant 8 à 14 heures. La coloration bleue est ensuite fixée pendant une demi-heure avec agitation dans une solution de fixation (formaldéhyde 1,5% (v/v), acide acétique 4% (v/v), éthanol 28,5% (v/v), eau). La décoloration est ensuite réalisée par incubation dans des bains d'éthanol successifs.

## **11 LUMINESCENCE LUCIFÉRASE *IN VIVO***

Principe : l'enzyme luciférase hydrolyse son substrat : la luciférine, en produisant une émission de lumière avec un pic à 562nm.

L'activité de la luciférase est mesurée *in vivo* grâce à la caméra ICCD (Intensified Charged Coupled Device ou dispositif de coulage de charge intensifié) d'un système Dual MCP ISIS III de Photonics Science.

Une solution aqueuse de luciférine (sel de potassium, Promega) à 0,5mM avec du Triton X100 (0,00005 % (v/v)) est pulvérisée sur l'échantillon et après 5 minutes de pénétration du substrat, l'échantillon est placé dans la boîte noire de la caméra. Une photo en lumière visible (images 8 bits) de l'échantillon est prise, puis la lumière de la boîte noire est éteinte et une photo de l'activité de la luciférase de l'échantillon (images 16 bits dont chaque pixel peut prendre une valeur comprise entre 0 et 65535 selon l'intensité lumineuse enregistrée) est prise. L'image générée lors de la mesure de la luminescence de la luciférase correspond à la superposition de 1000 images afin d'obtenir un signal suffisamment important pour être visualisé.

## **12 ANALYSE DES PIGMENTS PAR HPLC**

50 à 100mg de feuilles d'*Arabidopsis thaliana* sont lyophilisées. Les échantillons sont ensuite incubés à l'obscurité et à 4°C dans du diméthylformamide (DMF) (Carlo-Erba) qualité HPLC (200µl/50mg de poids frais) pendant 2 à 3 jours. Le tube est ensuite centrifugé 15 minutes à 12000rpm et le surnageant est transféré dans un nouveau tube. L'échantillon subit alors une deuxième centrifugation pour bien éliminer les débris et le surnageant est transféré dans un petit flacon pour HPLC. La composition en pigments de 50µl d'échantillon est analysée par HPLC (Varian ProStar 240) sur colonne C18 avec une phase mobile initiale contenant 15 % d'eau et 85 % de solvant organique (acétonitrile 75 % / méthanol 25 %). L'élution est réalisée par un gradient où le solvant organique atteint 100%. Les analyses de chacune des lignées ont été réalisées en duplicats.

## **13 ANALYSE INFORMATIQUE**

Les prédictions de localisation subcellulaire des fibrillines ont été effectuées grâce aux logiciels TargetP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>). D'autres logiciels ont été consultés : Predotar (<http://genoplante-info.infobiogen.fr/predotar/>), ChloroP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>) Psort (<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/form.html>) et MitoProt (<http://ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html>).

Toutes les manipulations de séquences ont été réalisées grâce au logiciel Bioedit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). Les alignements générés ont été produits par le logiciel ClustalW intégré à BioEdit. Les calculs des arbres phylogénétiques avec bootstrap présentés ici ont été aussi réalisés par ClustalW intégré à BioEdit. Le même type d'étude a été réalisé grâce au package de phylogénie Phylip (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/phylogeny/phylip-fr.html>) afin d'utiliser différentes méthodes. Le graphique de l'arbre est quand à lui dessiné à partir de PhyloDendron disponible à l'adresse suivante : <http://iubio.bio.indiana.edu/treeapp/treeprint-form.html>.

Les données d'analyses microarray proviennent de deux sites :

<https://www.genevestigator.ethz.ch>

<http://rarge.gsc.riken.jp/>

## 14 OLIGONUCLÉOTIDES

|                         | Gène         | Amorce | Séquence 5'----->3'                 |
|-------------------------|--------------|--------|-------------------------------------|
| Peptide de transit      | <i>fib1a</i> | Dir    | GAATTCGGATCC ATGGCGACGGTACCATTGTTC  |
|                         |              | Rev    | AGATCTCTTTTCGCCTCTCCGTCTC           |
|                         | <i>fib1b</i> | Dir    | GAATTCGGATCC ATGGCGACGGTACAATTGTC   |
|                         |              | Rev    | AGATCTCTTTTCGCCTCTCCGTCTC           |
|                         | <i>fib2</i>  | Dir    | GAATTCGGATCC ATGGCTACGCTCTTCACCGTCG |
|                         |              | Rev    | AGATCTTTTCAGCTCCCAAGTCGG            |
|                         | <i>fib3a</i> | Dir    | ATGGCTTTACCTTCGTGC                  |
|                         |              | Rev    | AGATCTTTTGAGCTGTTTCTGTTTCTCAGC      |
| ADNc codant la protéine | <i>fib1a</i> | Dir    | GAATTCGGATCCATGGCGACGGTACCATTGTTC   |
|                         |              | Rev    | GTCGACTCTAGACTAGTAAACATAGACAGATGGG  |
|                         | <i>fib1b</i> | Dir    | GAATTCGGATCCATGGCGACGGTACAATTGTC    |
|                         |              | Rev    | GTCGACGAGCTCAACACAACGACAAGAGAGAGAC  |
|                         | <i>fib2</i>  | Dir    | GAATTCGGATCCATGGCTACGCTCTTCACCGTCG  |
|                         |              | Rev    | CTCGAGGTCGACCGGTTTTTACATGAAGCCTGC   |
|                         | <i>fib3a</i> | Dir    | ATGGCTTTACCTTCGTGC                  |
|                         |              | Rev    | CTCGAGGTCGACTATGATGGATGGCTCGGTACC   |
| ADNc partiel            | <i>fib1b</i> | Dir    | TAAGCATGC CGTTCGCTCGTGGATTGTTG      |
|                         |              | Rev    | TAAGTGCAG TCAAGGATTCAAGAGAGGGCT     |
|                         | <i>apt</i>   | Dir    | TCCCAGAATCGCTAAGATTGCC              |
|                         |              | Rev    | CCTTCCCTTAAGCTCTG                   |

**Tableau 7 : Amorces oligonucléotidiques utilisés dans cette étude.**





## pET-23a-d(+) Vectors

TB051 12/98

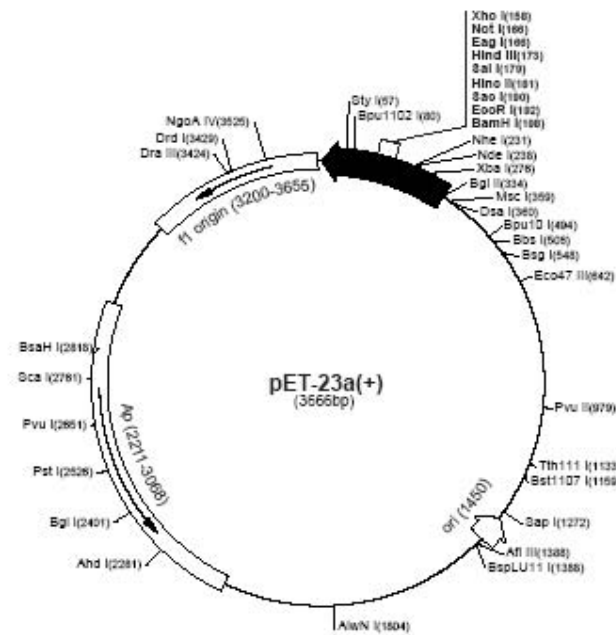
|             | Cat. No. |
|-------------|----------|
| pET-23a DNA | 69745-3  |
| pET-23b DNA | 69746-3  |
| pET-23c DNA | 69747-3  |
| pET-23d DNA | 69748-3  |

The pET-23a-d(+) vectors carry an N-terminal T7\*Tag<sup>®</sup> sequence plus an optional C-terminal His\*Tag<sup>®</sup> sequence. These vectors differ from pET-21a-d(+) by the "plain" T7 promoter instead of the T7lac promoter and by the absence of the *lacI* gene. Unique sites are shown on the circle map. Note that the sequence is numbered by the pBR322 convention, so the T7 expression region is reversed on the circular map. The cloning/expression region of the coding strand transcribed by T7 RNA polymerase is shown below. The f1 origin is oriented so that infection with helper phage will produce virions containing single-stranded DNA that corresponds to the coding strand. Therefore, single-stranded sequencing should be performed using the T7 terminator primer (Cat. No. 69337-3).

### pET-23a(d) sequence landmarks

|                                                           |           |
|-----------------------------------------------------------|-----------|
| T7 promoter                                               | 303-319   |
| T7 transcription start                                    | 302       |
| T7*Tag coding sequence                                    | 207-239   |
| Multiple cloning sites<br>( <i>Bam</i> HI - <i>Xho</i> I) | 158-203   |
| His*Tag coding sequence                                   | 140-157   |
| T7 terminator                                             | 26-72     |
| pBR322 origin                                             | 1450      |
| <i>Δla</i> coding sequence                                | 2211-3068 |
| f1 origin                                                 | 3200-3655 |

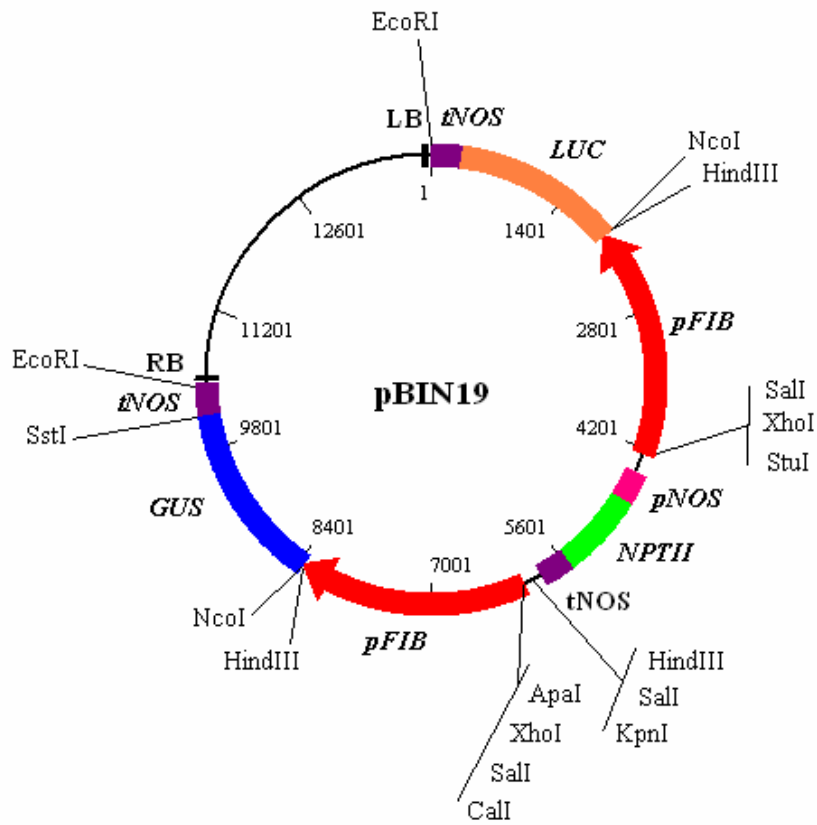
The maps for pET-23b(+), pET-23c(+), and pET-23d(+) are the same as pET-23a(+), (shown) with the following exceptions:  
pET-23b(+) is a 3665bp plasmid; subtract 1bp from each site beyond *Bam*HI at 198.  
pET-23c(+) is a 3664bp plasmid; subtract 2bp from each site beyond *Bam*HI at 198.  
pET-23d(+) is a 3663bp plasmid; the *Bam*HI site is in the same reading frame as in pET-23c(+). An *Nco*I site is substituted for the *Nhe*I site with a net 1bp deletion at position 238 of pET-23c(+). As a result, *Nco*I cuts pET-23d(+) at 234, and *Nhe*I cuts at 229. For the rest of the sites, subtract 3bp from each site beyond position 239 in pET-23a(+). *Nhe*I does not cut pET-23d(+). Note also that *Sty*I is not unique in pET-23d(+).



Novagen • ORDERING 800-526-7319 • TECHNICAL SUPPORT 800-207-0144

## Carte du vecteur pET-23a(+)

*pFIB::GUS pFIB::LUC*



Carte du vecteur de transformation binaire dérivé d'un vecteur pBIN19, utilisé pour produire les plantes transgéniques *pFIB::GUS pFIB::LUC* d'*Arabidopsis thaliana* utilisée lors de la mutagenèse

# **LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX**

## **LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX**

- Figure 1 :** Le chloroplaste. (p.12)
- Figure 2 :** Interconvertibilité des plastes. (p.14)
- Figure 3 :** Voie de biosynthèse des caroténoïdes. (p.18)
- Figure 4 :** Fibrilles de chromoplaste de poivron. (p.24)
- Figure 5 :** Arbre phylogénique des protéines de la famille de la fibrilline (d'après Kim *et al.*, 2001). (p.26)
- Figure 6 :** Alignement des séquences polypeptidiques des fibrillines d'*Arabidopsis thaliana*. (p.37)
- Figure 7 :** Arbre phylogénétique consensus des protéines FIB d'*Arabidopsis thaliana* (At), de riz (Os), de tomate (Le) et de différentes cyanobactéries (cy). (p.38)
- Figure 8 :** Profil d'hydrophobicité de la protéine AtFIB1a (Kyte & Doolittle). (p.38)
- Figure 9 :** Schéma de la structure exons/introns des gènes fibrillines d'*Arabidopsis thaliana*. (p.40)
- Figure 10 :** Apparition du gène *FIB* et de ses sous-familles au cours de l'évolution du plaste et des cyanobactéries. (p.42)
- Figure 11 :** Présence d'une répétition du motif protéique DEWG dans les fibrillines de différentes plantes. (p.44)
- Figure 12 :** Localisation subcellulaire de polypeptides FIB d'*Arabidopsis thaliana*. (p.45)
- Figure 13 :** Schéma de l'organisation des gènes *AtFIB 3a*, *3b* et du gène amont *PRXQ* sur le chromosome 3 d'*Arabidopsis thaliana*. (p.45)
- Figure 14 :** Extension d'amorce en 5' du gène *AtFIB3b* et sa séquence génomique. (p.46)
- Figure 15 :** Détection d'un transcrit long épissé du gène *AtFIB3b* par RT-PCR. (p.46)
- Figure 16 :** Schéma des constructions des peptides d'adressage fusionnés à la YFP pour les gènes *AtFIB3a* et *AtFIB3b* utilisées lors des observations de la localisation subcellulaire au microscope confocal. (p.47)
- Figure 17 :** Niveaux d'expression des gènes fibrilline d'*Arabidopsis thaliana* dans les différents organes de la plante. (p.50)

- Figure 18 :** Profil d'expression des gènes fibrillines 1-2 dans les différents organes d'*Arabidopsis thaliana* par northern blot. (p.51)
- Figure 19 :** Profil d'expression des gènes fibrillines 1-2 dans les feuilles d'*Arabidopsis thaliana* en conditions de stress par northern blot. (p.52)
- Figure 20 :** Profil d'expression des gènes fibrillines 1-2 dans les feuilles d'*Arabidopsis thaliana* en conditions de stress par northern blot (cinétique courte). (p.53)
- Figure 21 :** Profil d'expression de fibrillines dans les feuilles d'*Arabidopsis thaliana* en conditions de stress par RT-PCR. (p.53)
- Figure 22 :** Production et détection de protéines fibrillines recombinantes d'*Arabidopsis thaliana* chez *E. coli*. (p.54)
- Figure 23 :** Accumulation des protéines AtFIB1b et AtFIB3b dans les différents organes d'*Arabidopsis thaliana* (Coomassie et western blot). (p.55)
- Figure 24 :** Accumulation de la protéine FIB1b dans des feuilles excisées d'*Arabidopsis thaliana* en conditions de stress (western blot). (p.56)
- Figure 25 :** Accumulation de la protéine FIB1b dans les feuilles d'*Arabidopsis thaliana* en conditions de déficit nutritif (Coomassie et western blot). (p.56)
- Figure 26 :** Schéma du mécanisme de « l'ARN interférence » (ARNi) d'après Waterhouse *et al.* 2003. (p.62)
- Figure 27 :** Schéma de la construction génique ARNi introduite chez *Arabidopsis thaliana*. (p.62)
- Figure 28 :** Profil d'expression des fibrillines *AtFIB1a*, *1b* et *2* dans des lignées ARNi *FIB1-2* d'*Arabidopsis thaliana*. (p.63)
- Figure 29 :** Détection de la protéine FIB1b par western blot dans les feuilles de plantes sauvages et de lignées ARNi *FIB1-2* d'*Arabidopsis thaliana* (Coomassie et western blot). (p.63)
- Figure 30 :** Accumulation de la protéine FIB1b dans les différents organes des lignées ARNi *FIB1-2* d'*Arabidopsis thaliana* (Coomassie et western blot). (p.64)
- Figure 31 :** Phénotype de plants d'*Arabidopsis thaliana* de 3 lignées ARNi *FIB1-2*. (p.65)
- Figure 32 :** Analyse par HPLC du contenu en pigments de feuilles d'*Arabidopsis thaliana* de lignées sauvages et ARNi *FIB1-2*. (p.65)

- Figure 33 :** Induction du promoteur *pFIB* de poivron contrôlant l'expression du gène rapporteur *GUS*, visualisée par coloration histochimique de feuilles de différentes plantes lors de transformations par biolistique (G. Langenkämper *et al.* 2001). (p.69)
- Figure 34 :** Schéma de l'approche génétique de recherche de mutants de régulation du promoteur de la fibrilline. (p.70)
- Figure 35 :** Schéma de la construction génique introduite chez *Arabidopsis thaliana*. (p.70)
- Figure 36 :** Activités glucuronidase et luciférase de plantules d'*Arabidopsis thaliana* de 7 jours sauvages (wt) et de transformants indépendants *pFIB::GUS pFIB::LUC* (21A, 45A, 26J, 22Q). (p.71)
- Figure 37 :** Essais quantitatifs d'activités glucuronidase et luciférase de lignées transgéniques indépendantes *pFIB::GUS pFIB::LUC* de plantules d'*Arabidopsis thaliana* de 15 jours. (p.71)
- Figure 38 :** Schéma du principe la recherche d'une lignée homozygote d'*Arabidopsis thaliana* ne contenant qu'un seul événement d'insertion d'ADN-T pour la production du stock de graines à mutageniser. (p.72)
- Figure 39 :** Southern blot de la lignée transgénique 26J d'*Arabidopsis thaliana*. (p.73)
- Figure 40 :** Activité du promoteur *pFIB* de poivron visualisée par coloration histochimique issue de l'activité glucuronidase et par luminescence issue de l'activité luciférase chez le transformant 26j d'*Arabidopsis thaliana* dans les plantules et la plante adulte. (p.74)
- Figure 41 :** Activité du promoteur *pFIB* de poivron visualisée par coloration histochimique issue de l'activité glucuronidase et par luminescence issue de l'activité luciférase au cours du développement des fleurs de la lignée transgénique 26j d'*Arabidopsis thaliana*. (p.74)
- Figure 42 :** Activité du promoteur *pFIB* de poivron visualisée par coloration histochimique issue de l'activité glucuronidase et luminescence issue de l'activité luciférase dans les différents organes des fleurs de la lignée transgénique 26j d'*Arabidopsis thaliana*. (p.74)
- Figure 43 :** Activité du promoteur *pFIB* de poivron visualisée par coloration histochimique issue de l'activité glucuronidase et luminescence issue de l'activité luciférase

dans des feuilles sénescentes de la lignée transgénique 26j d'*Arabidopsis thaliana*. (p.75)

**Figure 44 :** Schéma de la production de la population de mutants à partir du stock de graines de la lignée transformée 26J. (p.75)

**Figure 45 :** Méthode de criblage de altération de l'activité des gènes rapporteur sous le contrôle du promoteur de la fibrilline de poivron dans les plantules d'*Arabidopsis thaliana*. (p.75)

**Figure 46 :** Activité du promoteur *pFIB* de poivron visualisée par coloration histochimique issue de l'activité glucuronidase et luminescence issue de l'activité luciférase 24 heures après un stress de coupure sur feuilles d'*Arabidopsis thaliana* de la lignée 26J. (p.76)

**Figure 47 :** Activité du promoteur *pFIB* de poivron visualisée par luminescence de la luciférase de plantules de la lignée transgénique 26J d'*Arabidopsis thaliana* 24 heures après un stress. (p.76)

**Figure 48 :** Induction de l'expression des transgènes par rapport aux gènes fibrillines d'*Arabidopsis thaliana* et au gène *RD29* impliqué dans la réponse au stress chez des plantules de 7 jours ayant subi un stress de déshydratation ou salin pendant 5 heures. (p.76)

**Figure 49 :** Méthode de criblage d'une altération de l'activité des gènes rapporteurs sous le contrôle du promoteur de la fibrilline de poivron dans les fleurs d'*Arabidopsis thaliana*. (p.77)

**Figure 50 :** Criblage de la population de mutants pour une altération de l'activité des gènes rapporteurs dans les fleurs. (p.77)

**Figure 51 :** Induction du promoteur *pFIB* de poivron chez des plantules de 15 jours de mutants EMS d'*Arabidopsis thaliana* (3 jours après stress). (p.78)

**Figure 52 :** Induction du promoteur *pFIB* de poivron (activité luciférase) chez la lignée transgénique 26J d'*Arabidopsis thaliana* soumise (B) ou non (A) à un stress d'exposition aux UV (et déshydratation) d'une heure à 4°C avec une période de récupération de 3 jours. (p.78)

**Figure 53 :** Induction du promoteur *pFIB* de poivron chez des plantules de 15 jours de mutants EMS d'*Arabidopsis thaliana*, 3 jours après un stress d'exposition aux UV d'une heure à 4°C. (p.78)

**Tableau 1 :** Principales caractéristiques des protéines de type fibrillines d'*Arabidopsis thaliana*. (p.36)

**Tableau 2 :** Orthologues des gènes fibrillines d'*Arabidopsis thaliana* chez le riz et chez différentes cyanobactéries. (p.39)

**Tableau 3 :** Taux de similarité entre les protéines FIB de plantes et les protéines de la sous-famille 1-2 d'*Arabidopsis thaliana*. (p.43)

**Tableau 4 :** Analyse de la variation d'expression de gènes *FIB* en conditions de stress par puce à ADN. (p.52)

**Tableau 5 :** Ségrégation de lignées indépendantes transformées par *pFIB::GUS* *pFIB::LUC* et de leur descendance selon la résistance à la kanamycine. (p.72)

**Tableau 6 :** Essais quantitatifs d'activités glucuronidase et luciférase chez des plantules d'*Arabidopsis thaliana* de 7 jours ayant subi un stress de déshydratation ou salin pendant 5 heures. (p.76)

**Tableau 7 :** Amorces oligonucléotidiques utilisées dans cette étude. (p.110)

## **NOMS COMMUNS DES PLANTES CITÉES**

|                                |                    |               |
|--------------------------------|--------------------|---------------|
| <i>Arabidopsis thaliana</i>    | Arabette des dames | ( <i>At</i> ) |
| <i>Brassica napus</i>          | Colza              |               |
| <i>Brassica rapa</i>           | Choux rave         | ( <i>Br</i> ) |
| <i>Capsicum annum</i>          | Poivron            | ( <i>Ca</i> ) |
| <i>Citrus unshiu</i>           | Mandarine          | ( <i>Cu</i> ) |
| <i>Cucumis sativus</i>         | Concombre          | ( <i>Cs</i> ) |
| <i>Hordeum vulgare</i>         | Orge               |               |
| <i>Lycopersicon esculentum</i> | Tomate             | ( <i>Le</i> ) |
| <i>Nicotiana tabacum</i>       | Tabac              |               |
| <i>Oryza sativa</i>            | Riz                | ( <i>Os</i> ) |
| <i>Pisum sativum</i>           | Pois               | ( <i>Ps</i> ) |
| <i>Solanum tuberosum</i>       | Pomme de terre     |               |
| <i>Zea maïs</i>                | Maïs               |               |

# **RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

## **RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

- Aggelis, A., I. John, Z. Karvouni et D. Grierson** (1997). "Characterization of two cDNA clones for mRNAs expressed during ripening of melon (*Cucumis melo* L.) fruits." Plant Mol Biol **33**(2): 313-22.
- Agius, F., I. Amaya, M. A. Botella et V. Valpuesta** (2005). "Functional analysis of homologous and heterologous promoters in strawberry fruits using transient expression." J. Exp. Bot. **56**(409): 37-46.
- Al-Babili, S., J. von Lintig, H. Haubruck et P. Beyer** (1996). "A novel, soluble form of phytoene desaturase from *Narcissus pseudonarcissus* chromoplasts is Hsp70-complexed and competent for flavinylation, membrane association and enzymatic activation." Plant J **9**(5): 601-12.
- Badger, M. R. et G. D. Price** (2003). "CO<sub>2</sub> concentrating mechanisms in cyanobacteria: molecular components, their diversity and evolution." J. Exp. Bot. **54**(383): 609-622.
- Baudouin, M. et C. Nam-Hai** (1996). "Improvement of *Arabidopsis* mutant screens based on luciferase imaging in planta." Plant molecular Biology Reporter **14**(4): 320-329.
- Bouvier, F., R. A. Backhaus et B. Camara** (1998). "Induction and control of chromoplast-specific carotenoid genes by oxidative stress." J Biol Chem **273**(46): 30651-9.
- Bramley, P., C. R. Bird et W. Schuch** (1993). "Carotenoid biosynthesis and manipulation." Biosynthesis and Manipulation of Plant Products Chap.4: 139-177.
- Bramley, P. M.** (1997). "The regulation and genetic manipulation of carotenoid biosynthesis in tomato fruit." Pure and Applied Chemistry **69**(10): 2159.
- Britton, G.** (1995). "Structure and properties of carotenoids in relation to function." FASEB J. **9**(15): 1551-1558.
- Broin, M., S. Cuine, G. Peltier et P. Rey** (2000). "Involvement of CDSP 32, a drought-induced thioredoxin, in the response to oxidative stress in potato plants." FEBS Letters **467**(2-3): 245.
- Bruce, B. D.** (2000). "Chloroplast transit peptides: structure, function and evolution." Trends in Cell Biology **10**(10): 440.
- Camara, B., P. Hugueney, F. Bouvier, M. Kuntz et R. Moneger** (1995). "Biochemistry and molecular biology of chromoplast development." International Review of Cytology **163**: 175-247.
- Carol, P., D. Stevenson, C. Bisanz, J. Breitenbach, G. Sandmann, R. Mache, G. Coupland et M. Kuntz** (1999). "Mutations in the *Arabidopsis* Gene *IMMUTANS* Cause a Variegated Phenotype by Inactivating a Chloroplast Terminal Oxidase Associated with Phytoene Desaturation." Plant Cell **11**(1): 57-68.
- Chen, H.-C., A. Klein, M. Xiang, R. A. Backhaus et M. Kuntz** (1998). "Drought- and wound-induced expression in leaves of a gene encoding a chromoplast carotenoid-associated protein." Plant J **14**(3): 317-326.
- Chen, H., R. S. Nelson et J. L. Sherwood** (1994). "Enhanced recovery of transformants of *Agrobacterium tumefaciens* after freeze-thaw transformation and drug selection." Biotechniques **16**(4): 664-8, 670.
- Chernys, J. T. et J. A. Zeevaart** (2000). "Characterization of the 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene family and the regulation of abscisic acid biosynthesis in avocado." Plant Physiol **124**(1): 343-53.

- Clough, S. J. et A. F. Bent** (1998). "Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*." Plant J **16**(6): 735-743.
- Corona, V., B. Aracri, G. Kosturkova, G. E. Bartley, L. Pitto, L. Giorgetti, P. A. Scolnik et G. Giuliano** (1996). "Regulation of a carotenoid biosynthesis gene promoter during plant development." Plant J **9**(4): 505-12.
- Cowling, R. J., Y. Kamiya, H. Seto et N. P. Harberd** (1998). "Gibberellin Dose-Response Regulation of GA4 Gene Transcript Levels in *Arabidopsis*." Plant Physiol. **117**(4): 1195-1203.
- Cunningham, F. X. et E. Gantt** (1998). "Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants." Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol **49**: 557-583.
- Cunningham, F. X.** (2002). "Regulation of carotenoid synthesis and accumulation in plants." Pure and Applied Chemistry **74**(8): 1409-1417.
- Davison, P. A., C. N. Hunter et P. Horton** (2002). "Overexpression of beta-carotene hydroxylase enhances stress tolerance in *Arabidopsis*." Nature **418**(6894): 203-6.
- Dekker, J. P. and E. J. Boekema** (2005). "Supramolecular organization of thylakoid membrane proteins in green plants." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics **1706**(1-2): 12.
- Demmig-Adams, B. et W. W. Adams Iii** (1996). "The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis." Trends in Plant Science **1**(1): 21.
- Demmig-Adams, B., A. M. Gilmore et W. W. Adams, 3rd** (1996). "Carotenoids 3: in vivo function of carotenoids in higher plants." FASEB J **10**(4): 403-12.
- Deruere, J., F. Bouvier, J. Steppuhn, A. Klein, B. Camara et M. Kuntz** (1994a). "Structure and Expression of Two Plant Genes Encoding Chromoplast-Specific Proteins: Occurrence of Partially Spliced Transcripts." Biochemical and Biophysical Research Communications **199**(3): 1144.
- Deruere, J., S. Romer, A. d'Harlingue, R. A. Backhaus, M. Kuntz et B. Camara** (1994b). "Fibril Assembly and Carotenoid Overaccumulation in Chromoplasts: A Model for Supramolecular Lipoprotein Structures." Plant Cell **6**(1): 119-133.
- Dietz, K.-J.** (2003). "Plant Peroxiredoxins." Annual Review of Plant Biology **54**: 93-107.
- Doyle, J. et J. Doyle** (1987). "A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue." Phytochem Bull **1**: 11-15.
- Dufresne, A., M. Salanoubat, F. Partensky, F. Artiguenave, I. M. Axmann, V. Barbe, S. Duprat, M. Y. Galperin, E. V. Koonin, F. Le Gall, K. S. Makarova, M. Ostrowski, S. Oztas, C. Robert, I. B. Rogozin, D. J. Scanlan, N. T. de Marsac, J. Weissenbach, P. Wincker, Y. I. Wolf et W. R. Hess** (2003). "From the Cover: Genome sequence of the cyanobacterium *Prochlorococcus marinus* SS120, a nearly minimal oxyphototrophic genome." PNAS **100**(17): 10020-10025.
- Dyall, S. D., M. T. Brown et P. J. Johnson** (2004). "Ancient Invasions: From Endosymbionts to Organelles." Science **304**(5668): 253-257.
- Emter, O., H. Falk et P. Sitte** (1990). "Specific carotenoids and proteins as prerequisites for chromoplast tubule formation." Protoplasma **157**: 128-135.
- Eymery, F. et P. Rey** (1999). "Immunocytolocalization of CDSP 32 and CDSP 34, two chloroplastic drought-induced stress proteins in *Solanum tuberosum* plants." Plant Physiology and Biochemistry **37**(4): 305.
- Feldman, K., R. Malmberg et C. Dean** (1994). "Mutagenesis in *Arabidopsis*." In: Meyerowitz EM, Somerville CR, editors; Meyerowitz EM, Somerville CR, editors. Arabidopsis. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press: 137-172.

- Ferro, M., D. Salvi, S. Brugiere, S. Miras, S. Kowalski, M. Louwagie, J. Garin, J. Joyard et N. Rolland** (2003). "Proteomics of the Chloroplast Envelope Membranes from *Arabidopsis thaliana*." *Mol Cell Proteomics* **2**(5): 325-345.
- Frandsen, G. I., J. Mundy et J. T. C. Tzen** (2001). "Oil bodies and their associated proteins, oleosin and caleosin." *Physiol Plant* **112**(3): 301-307.
- Fraser, P. D., M. R. Truesdale, C. R. Bird, W. Schuch et P. M. Bramley** (1994). "Carotenoid Biosynthesis during Tomato Fruit Development (Evidence for Tissue-Specific Gene Expression)." *Plant Physiol* **105**(1): 405-413.
- Fraser, P. D., J. W. Kiano, M. R. Truesdale, W. Schuch et P. M. Bramley** (1999). "Phytoene synthase-2 enzyme activity in tomato does not contribute to carotenoid synthesis in ripening fruit." *Plant Mol Biol* **40**(4): 687-98.
- Friso, G., L. Giacomelli, A. J. Ytterberg, J.-B. Peltier, A. Rudella, Q. Sun et K. J. v. Wijk** (2004). "In-Depth Analysis of the Thylakoid Membrane Proteome of *Arabidopsis thaliana* Chloroplasts: New Proteins, New Functions, and a Plastid Proteome Database." *Plant Cell* **16**(2): 478-499.
- Gallois, J.-L.** (2000). Recherches méthodologiques en vue de l'isolement de mutants d'expression du gène nucléaire RPL21. Grenoble, Joseph Fourier.
- Ghosh, S., K. A. Hudak, E. B. Dumbroff et J. E. Thompson** (1994). "Release of Photosynthetic Protein Catabolites by Blebbing from Thylakoids." *Plant Physiol* **106**(4): 1547-1553.
- Gillet, B., A. Beyly, G. Peltier et P. Rey** (1998). "Molecular characterization of CDSP 34, a chloroplastic protein induced by water deficit in *Solanum tuberosum* plants, and regulation of CDSP 34 expression by ABA and high illumination." *Plant J* **16**(2): 257-262.
- Giuliano, G., G. E. Bartley et P. A. Scolnik** (1993). "Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato development." *Plant Cell* **5**(4): 379-87.
- Goff, S. A., D. Rieke, T.-H. Lan, G. Presting, R. Wang, M. Dunn, J. Glazebrook, A. Sessions, P. Oeller, H. Varma, D. Hadley, D. Hutchison, C. Martin, F. Katagiri, B. M. Lange, T. Moughamer, Y. Xia, P. Budworth, J. Zhong, T. Miguel, U. Paszkowski, S. Zhang, M. Colbert, W.-I. Sun, L. Chen, B. Cooper, S. Park, T. C. Wood, L. Mao, P. Quail, R. Wing, R. Dean, Y. Yu, A. Zharkikh, R. Shen, S. Sahasrabudhe, A. Thomas, R. Cannings, A. Gutin, D. Pruss, J. Reid, S. Tavtigian, J. Mitchell, G. Eldredge, T. Scholl, R. M. Miller, S. Bhatnagar, N. Adey, T. Rubano, N. Tusneem, R. Robinson, J. Feldhaus, T. Macalma, A. Oliphant et S. Briggs** (2002). "A Draft Sequence of the Rice Genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*)." *Science* **296**(5565): 92-100.
- Hannon, G. J.** (2002). "RNA interference." *Nature* **418**(6894): 244-51.
- Havaux, M.** (1998). "Carotenoids as membrane stabilizers in chloroplasts." *Trends in Plant Science* **3**(4): 147.
- Heazlewood, J. L., J. S. Tonti-Filippini, A. M. Gout, D. A. Day, J. Whelan et A. H. Millar** (2004). "Experimental Analysis of the *Arabidopsis* Mitochondrial Proteome Highlights Signaling and Regulatory Components, Provides Assessment of Targeting Prediction Programs, and Indicates Plant-Specific Mitochondrial Proteins." *Plant Cell* **16**(1): 241-256.
- Heins, L., I. Collinson et J. Soll** (1998). "The protein translocation apparatus of the chloroplast envelopes." *Elsevier Science* **3**(2): 56-61.
- Hernandez-Pinzon, I., J. H. E. Ross, K. A. Barnes, A. P. Damant et D. J. Murphy** (1999). "Composition and role of tapetal lipid bodies in the biogenesis of the pollen coat of *Brassica napus*." *Planta* **208**(4): 588.

- Hirschberg, J.** (2001). "Carotenoid biosynthesis in flowering plants." Curr Opin Plant Biol **4**(3): 210-8.
- Horling, F., P. Lamkemeyer, J. Konig, I. Finkemeier, A. Kandlbinder, M. Baier et K.-J. Dietz** (2003). "Divergent Light-, Ascorbate-, and Oxidative Stress-Dependent Regulation of Expression of the Peroxiredoxin Gene Family in Arabidopsis." Plant Physiol. **131**(1): 317-325.
- Huang, A. H. C.** (1996). "Oleosins and Oil Bodies in Seeds and Other Organs." Plant Physiol. **110**(4): 1055-1061.
- Hugueney, P., F. Bouvier, A. Badillo, J. Quennemet, A. d'Harlingue et B. Camara** (1996). "Developmental and Stress Regulation of Gene Expression for Plastid and Cytosolic Isoprenoid Pathways in Pepper Fruits." Plant Physiol. **111**(2): 619-626.
- Hunter, C. et R. S. Poethig** (2003). "miSSING LINKS: miRNAs and plant development." Current Opinion in Genetics & Development **13**(4): 372.
- Ikoma, Y., A. Komatsu, M. Kita, K. Ogawa, M. Omura, M. Yano et T. Moriguchi** (2001). "Expression of a phytoene synthase gene and characteristic carotenoid accumulation during citrus fruit development." Physiol Plant **111**(2): 232-238.
- Ishitani M., L. Xiong, B. Stevenson and J. K. Zhu.** "Genetic Analysis of Osmotic and Cold Stress Signal Transduction in *Arabidopsis*: Interactions and Convergence of Abscissic Acid-Dependent and Abscissic Acid-Independent Pathways." The Plant Cell, Vol **9**, Issue 11 1935-1949
- Johnson, E. J.** (2002). "The Role of Carotenoids in Human Health." Nutr Clinical Care **5**(2): 56-65.
- Josse, E.-M., A. J. Simkin, J. Gaffe, A.-M. Laboure, M. Kuntz et P. Carol** (2000). "A Plastid Terminal Oxidase Associated with Carotenoid Desaturation during Chromoplast Differentiation." Plant Physiol. **123**(4): 1427-1436.
- Kaneko, T., S. Sato, H. Kotani, A. Tanaka, E. Asamizu, Y. Nakamura, N. Miyajima, M. Hirose, M. Sugiura, S. Sasamoto, T. Kimura, T. Hosouchi, A. Matsuno, A. Muraki, N. Nakazaki, K. Naruo, S. Okumura, S. Shimpo, C. Takeuchi, T. Wada, A. Watanabe, M. Yamada, M. Yasuda et S. Tabata** (1996). "Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions." DNA Res **3**(3): 109-36.
- Kaneko, T., Y. Nakamura, C. P. Wolk, T. Kuritz, S. Sasamoto, A. Watanabe, M. Iriguchi, A. Ishikawa, K. Kawashima, T. Kimura, Y. Kishida, M. Kohara, M. Matsumoto, A. Matsuno, A. Muraki, N. Nakazaki, S. Shimpo, M. Sugimoto, M. Takazawa, M. Yamada, M. Yasuda et S. Tabata** (2001). "Complete genomic sequence of the filamentous nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120." DNA Res **8**(5): 205-13; 227-53.
- Karimi, M., D. Inze et A. Depicker** (2002). "GATEWAY(TM) vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation." Trends in Plant Science **7**(5): 193.
- Kato, N., D. Pontier et E. Lam** (2002). "Spectral Profiling for the Simultaneous Observation of Four Distinct Fluorescent Proteins and Detection of Protein-Protein Interaction via Fluorescence Resonance Energy Transfer in Tobacco Leaf Nuclei." Plant Physiol. **129**(3): 931-942.
- Katz, A., C. Jimenez et U. Pick** (1995). "Isolation and Characterization of a Protein Associated with Carotene Globules in the Alga *Dunaliella bardawil*." Plant Physiol **108**(4): 1657-1664.

- Kessler, F., D. Schnell et G. Blobel** (1999). "Identification of proteins associated with plastoglobules isolated from pea (*Pisum sativum* L.) chloroplasts." *Planta* **208**(1): 107.
- Kidner, C. A. et R. A. Martienssen** (2003). "Macro effects of microRNAs in plants." *Trends Genet* **19**(1): 13-6.
- Kim, H. U., S. S. H. Wu, C. Ratnayake et A. H. C. Huang** (2001). "*Brassica rapa* Has Three Genes That Encode Proteins Associated with Different Neutral Lipids in Plastids of Specific Tissues." *Plant Physiol.* **126**(1): 330-341.
- Kleffmann, T., D. Russenberger, A. von Zychlinski, W. Christopher, K. Sjolander, W. Gruissem et S. Baginsky** (2004). "The *Arabidopsis thaliana* Chloroplast Proteome Reveals Pathway Abundance and Novel Protein Functions." *Current Biology* **14**(5): 354.
- Kuntz, Chen, Simkin, Romer, Shipton, Drake, Schuch et Bramley** (1998). "Upregulation of two ripening related genes from a non climacteric plant (pepper) in a transgenic climacteric plant (tomato)." *Plant J* **13**(3): 351-361.
- Kuntz, M., S. Romer, C. Suire, P. Hugueney, J. H. Weil, R. Schantz et B. Camara** (1992). "Identification of a cDNA for the plastid-located geranylgeranyl pyrophosphate synthase from *Capsicum annuum*: correlative increase in enzyme activity and transcript level during fruit ripening." *Plant J* **2**(1): 25-34.
- Langenkamper, G., N. Manac'h, M. Broin, S. Cuine, N. Becuwe, M. Kuntz et P. Rey** (2001). "Accumulation of plastid lipid-associated proteins (fibrillin/CDSP34) upon oxidative stress, ageing and biotic stress in *Solanaceae* and in response to drought in other species." *J. Exp. Bot.* **52**(360): 1545-1554.
- Libal-Weksler, Y., M. Vishnevetsky, M. Ovadis et A. Vainstein** (1997). "Isolation and regulation of accumulation of a minor chromoplast-specific protein from cucumber corollas." *Plant Physiol* **113**(1): 59-63.
- Lichtenthaler, H. K.** (1999). "The 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Pathway Of Isoprenoid Biosynthesis In Plants." *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **50**: 47-65.
- Lightner, J. et T. Caspar** (1998). "Seed mutagenesis of *Arabidopsis*." *Methods Mol Biol* **82**: 91-103.
- Mache, R. et S. Lerbs-Mache** (2001). "Chloroplast genetic system of higher plants:Chromosome replication, chloroplast division and elements of the transcriptional apparatus." *Current Science* **80**(2): 217-224.
- Manac'h, N. et M. Kuntz** (1999). "Stress induction of a nuclear gene encoding for a plastid protein is mediated by photo-oxidative events." *Plant Physiology and Biochemistry* **37**(11): 859.
- Manac'h, N.** (2000). Identification de signaux impliqués dans l'induction du gène de la fibrilline lors du développement et de la réponse aux stress chez la tomate: implication de molécules d'oxygène réactif. Grenoble, Université Joseph Fourier. **Thèse**.
- Marchler-Bauer, A., J. B. Anderson, P. F. Cherukuri, C. DeWeese-Scott, L. Y. Geer, M. Gwadz, S. He, D. I. Hurwitz, J. D. Jackson, Z. Ke, C. J. Lanczycki, C. A. Liebert, C. Liu, F. Lu, G. H. Marchler, M. Mullokandov, B. A. Shoemaker, V. Simonyan, J. S. Song, P. A. Thiessen, R. A. Yamashita, J. J. Yin, D. Zhang et S. H. Bryant** (2005). "CDD: a Conserved Domain Database for protein classification." *Nucl. Acids Res.* **33**(suppl\_1): D192-196.
- Martin, W. et R. G. Herrmann** (1998). "Gene Transfer from Organelles to the Nucleus: How Much, What Happens, and Why?" *Plant Physiol.* **118**(1): 9-17.
- Matsuzaki, M., O. Misumi, T. Shin-i, S. Maruyama, M. Takahara, S.-y. Miyagishima, T. Mori, K. Nishida, F. Yagisawa, K. Nishida, Y. Yoshida, Y. Nishimura, S. Nakao, T.**

- Kobayashi, Y. Momoyama, T. Higashiyama, A. Minoda, M. Sano, H. Nomoto, K. Oishi, H. Hayashi, F. Ohta, S. Nishizaka, S. Haga, S. Miura, T. Morishita, Y. Kabeya, K. Terasawa, Y. Suzuki, Y. Ishii, S. Asakawa, H. Takano, N. Ohta, H. Kuroiwa, K. Tanaka, N. Shimizu, S. Sugano, N. Sato, H. Nozaki, N. Ogasawara, Y. Kohara et T. Kuroiwa (2004). "Genome sequence of the ultrasmall unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae* 10D." *Nature* **428**(6983): 653.
- McFadden, G. I. (2001). "Chloroplast Origin and Integration." *Plant Physiol.* **125**(1): 50-53.
- Monte, E., D. Ludevid et S. Prat (1999). "Leaf C40.4: a carotenoid-associated protein involved in the modulation of photosynthetic efficiency?" *Plant J* **19**(4): 399-410.
- Moriguchi, T., M. Kita, T. Endo-Inagaki, Y. Ikoma et M. Omura (1998). "Characterization of a cDNA homologous to carotenoid-associated protein in citrus fruits." *Biochim Biophys Acta* **1442**(2-3): 334-8.
- Morita, M. T. et M. Tasaka (2004). "Gravity sensing and signaling." *Current Opinion in Plant Biology* **7**(6): 712.
- Murphy, D. J. (1993). "Structure, function and biogenesis of storage lipid bodies and oleosins in plants." *Prog Lipid Res* **32**(3): 247-80.
- Murphy, D. J. et J. H. Ross (1998). "Biosynthesis, targeting and processing of oleosin-like proteins, which are major pollen coat components in *Brassica napus*." *Plant J* **13**(1): 1-16.
- Murphy, D. J. et J. Vance (1999). "Mechanisms of lipid-body formation." *Trends Biochem Sci* **24**(3): 109-15.
- Nakamura, Y., T. Kaneko, S. Sato, M. Ikeuchi, H. Katoh, S. Sasamoto, A. Watanabe, M. Iriguchi, K. Kawashima, T. Kimura, Y. Kishida, C. Kiyokawa, M. Kohara, M. Matsumoto, A. Matsuno, N. Nakazaki, S. Shimpo, M. Sugimoto, C. Takeuchi, M. Yamada et S. Tabata (2002). "Complete genome structure of the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* BP-1." *DNA Res* **9**(4): 123-30.
- Nakamura, Y., T. Kaneko, S. Sato, M. Mimuro, H. Miyashita, T. Tsuchiya, S. Sasamoto, A. Watanabe, K. Kawashima, Y. Kishida, C. Kiyokawa, M. Kohara, M. Matsumoto, A. Matsuno, N. Nakazaki, S. Shimpo, C. Takeuchi, M. Yamada et S. Tabata (2003). "Complete genome structure of *Gloeobacter violaceus* PCC 7421, a cyanobacterium that lacks thylakoids." *DNA Res* **10**(4): 137-45.
- Nelissen, B., Y. Van de Peer, A. Wilmotte et R. De Wachter (1995). "An early origin of plastids within the cyanobacterial divergence is suggested by evolutionary trees based on complete 16S rRNA sequences." *Mol Biol Evol* **12**(6): 1166-1173.
- Neuhaus, H. E. et M. J. Emes (2000). "Nonphotosynthetic metabolism in plastids." *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **51**: 111-140.
- Niyogi, K. K. (2000). "Safety valves for photosynthesis." *Curr Opin Plant Biol* **3**(6): 455-60.
- Orea, A., P. Pajuelo, E. Pajuelo, A. J. Marquez et J. M. Romero (2001). "Characterisation and expression studies of a root cDNA encoding for ferredoxin-nitrite reductase from *Lotus japonicus*." *Physiol Plant* **113**(2): 193-202.
- Osteryoung, K. W. et R. S. McAndrew (2001). "The plastid division machine." *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **52**: 315-333.
- Palenik, B., B. Brahamsha, F. W. Larimer, M. Land, L. Hauser, P. Chain, J. Lamerdin, W. Regala, E. E. Allen, J. McCarren, I. Paulsen, A. Dufresne, F. Partensky, E. A. Webb et J. Waterbury (2003). "The genome of a motile marine *Synechococcus*." *Nature* **424**(6952): 1037.
- Palmer, J. D. (2003). "The Symbiotic Birth And Spread Of Plastids: How Many Times And Whodunit?" *J Phycol* **39**(1): 4-12.

- Pecker, I., D. Chamovitz, H. Linden, G. Sandmann et J. Hirschberg** (1992). "A single polypeptide catalyzing the conversion of phytoene to zeta-carotene is transcriptionally regulated during tomato fruit ripening." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(11): 4962-6.
- Pecker, I., R. Gabbay, F. X. Cunningham, Jr. et J. Hirschberg** (1996). "Cloning and characterization of the cDNA for lycopene beta-cyclase from tomato reveals decrease in its expression during fruit ripening." *Plant Mol Biol* **30**(4): 807-19.
- Pickford, A. S. et C. Cogoni** (2003). "RNA-mediated gene silencing." *Cell Mol Life Sci* **60**(5): 871-82.
- Piffanelli, P., J. Ross, H. E et D. J. Murphy** (1998). "Biogenesis and function of the lipidic structures of pollen grains." *Sexual Plant Reproduction* **11**(2): 65.
- Pogson, B., K. A. McDonald, M. Truong, G. Britton et D. DellaPenna** (1996). "*Arabidopsis* carotenoid mutants demonstrate that lutein is not essential for photosynthesis in higher plants." *Plant Cell* **8**(9): 1627-39.
- Pozueta-Romero, J., F. Rafia, G. Houlne, C. Cheniclet, J. P. Carde, M. L. Schantz et R. Schantz** (1997). "A Ubiquitous Plant Housekeeping Gene, PAP, Encodes a Major Protein Component of Bell Pepper Chromoplasts." *Plant Physiol.* **115**(3): 1185-1194.
- Pozueta-Romero, J., G. Houlne et R. Schantz** (1998). "Identification of a short interspersed repetitive element in partially spliced transcripts of the bell pepper (*Capsicum annuum*) PAP gene: new evolutionary and regulatory aspects on plant tRNA-related SINEs." *Gene* **214**(1-2): 51.
- Pruvot, G., S. Cuine, G. Peltier et P. Rey** (1996a). "Characterization of a novel drought-induced 34-kDa protein located in the thylakoids of *Solanum tuberosum* L. plants." *Planta* **198**(3): 471-9.
- Pruvot, G., J. Massimino, G. Peltier et P. Rey** (1996b). "Effects of low temperature, high salinity and exogenous ABA on the synthesis of two chloroplastic drought-induced proteins in *Solanum tuberosum*." *Physiol Plant* **97**: 123-131.
- Pyke, K. A. et A. M. Page** (1998). "Plastid Ontogeny during Petal Development in *Arabidopsis*." *Plant Physiol.* **116**(2): 797-803.
- Quesada Víctor, María Rosa Poncea et José Luis Micola**. "Genetic Analysis of Salt-Tolerant Mutants in *Arabidopsis thaliana*." *Genetics*, Vol. **154**, 421-436, January 2000.
- Reinbothe, C., N. Lebedev, K. Apel et S. Reinbothe** (1997). "Regulation of chloroplast protein import through a protochlorophyllide-responsive transit peptide." *PNAS* **94**(16): 8890-8894.
- Reinbothe, S., F. Quigley, J. Gray, A. Schemenewitz et C. Reinbothe** (2004a). "Identification of plastid envelope proteins required for import of protochlorophyllide oxidoreductase A into the chloroplast of barley." *PNAS* **101**(7): 2197-2202.
- Reinbothe, S., F. Quigley, A. Springer, A. Schemenewitz et C. Reinbothe** (2004b). "The outer plastid envelope protein Oep16: Role as precursor translocase in import of protochlorophyllide oxidoreductase A." *PNAS* **101**(7): 2203-2208.
- Rey, P., G. Pruvot, N. Becuwe, F. Eymery, D. Rumeau et G. Peltier** (1998). "A novel thioredoxin-like protein located in the chloroplast is induced by water deficit in *Solanum tuberosum* L. plants." *Plant J* **13**(1): 97-107.
- Rey, P., B. Gillet, S. Romer, F. Eymery, J. Massimino, G. Peltier et M. Kuntz** (2000). "Over-expression of a pepper plastid lipid-associated protein in tobacco leads to changes in plastid ultrastructure and plant development upon stress." *Plant J* **21**(5): 483-494.

- Rey, P., S. Cuine, F. Eymery, J. Garin, M. Court, J. P. Jacquot, N. Rouhier et M. Broin** (2005). "Analysis of the proteins targeted by CDSP32, a plastidic thioredoxin participating in oxidative stress responses." Plant J **41**(1): 31-42.
- Rocap, G., F. W. Larimer, J. Lamerdin, S. Malfatti, P. Chain, N. A. Ahlgren, A. Arellano, M. Coleman, L. Hauser, W. R. Hess, Z. I. Johnson, M. Land, D. Lindell, A. F. Post, W. Regala, M. Shah, S. L. Shaw, C. Steglich, M. B. Sullivan, C. S. Ting, A. Tolonen, E. A. Webb, E. R. Zinser et S. W. Chisholm** (2003). "Genome divergence in two *Prochlorococcus* ecotypes reflects oceanic niche differentiation." Nature **424**(6952): 1042.
- Rock, C. D. et J. A. Zeevaart** (1991). "The aba mutant of *Arabidopsis thaliana* is impaired in epoxy-carotenoid biosynthesis." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(17): 7496-9.
- Romer, S., P. Hugueney, F. Bouvier, B. Camara et M. Kuntz** (1993). "Expression of the genes encoding the early carotenoid biosynthetic enzymes in *Capsicum annuum*." Biochem Biophys Res Commun **196**(3): 1414-21.
- Romer, S., P. D. Fraser, J. W. Kiano, C. A. Shipton, N. Misawa, W. Schuch et P. M. Bramley** (2000). "Elevation of the provitamin A content of transgenic tomato plants." Nat Biotechnol **18**(6): 666-9.
- Ronen, G., M. Cohen, D. Zamir et J. Hirschberg** (1999). "Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: expression of the gene for lycopene epsilon-cyclase is down-regulated during ripening and is elevated in the mutant Delta." Plant J **17**(4): 341-51.
- Ronen, G., L. Carmel-Goren, D. Zamir et J. Hirschberg** (2000). "An alternative pathway to beta -carotene formation in plant chromoplasts discovered by map-based cloning of beta and old-gold color mutations in tomato." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(20): 11102-7.
- Sandmann, G.** (2001). "Genetic manipulation of carotenoid biosynthesis: strategies, problems and achievements." Trends Plant Sci **6**(1): 14-7.
- Schatz, G. et B. Dobberstein** (1996). "Common Principles of Protein Translocation Across Membranes." Science **271**(5255): 1519-1526.
- Schledz, M., S. Al-Babili, J. v. Lintig, H. Haubruck, S. Rabbani, H. Kleinig et P. Beyer** (1996). "Phytoene synthase from *Narcissus pseudonarcissus*: functional expression, galactolipid requirement, topological distribution in chromoplasts and induction during flowering." Plant J **10**(5): 781-792.
- Shewmaker, C. K., J. A. Sheehy, M. Daley, S. Colburn et D. Y. Ke** (1999). "Seed-specific overexpression of phytoene synthase: increase in carotenoids and other metabolic effects." Plant J **20**(4): 401-412.
- Simkin, A. J., J. Breitenbach, M. Kuntz et G. Sandmann** (2000). "In vitro and in situ inhibition of carotenoid biosynthesis in *Capsicum annuum* by bleaching herbicides." J Agric Food Chem **48**(10): 4676-80.
- Simkin, A. J.** (2002). Etude de l'expression des gènes de la biosynthèse des caroténoïdes et la sur-expression hétérologue d'une protéine de structure chez la tomate. Grenoble, Université Joseph Fourier. **Thèse**.
- Simkin, A. J., A. M. Laboure, M. Kuntz et G. Sandmann** (2003a). "Comparison of carotenoid content, gene expression and enzyme levels in tomato (*Lycopersicon esculentum*) leaves." Z Naturforsch [C] **58**(5-6): 371-80.
- Simkin, A. J., C. Zhu, M. Kuntz et G. Sandmann** (2003b). "Light-dark regulation of carotenoid biosynthesis in pepper (*Capsicum annuum*) leaves." J Plant Physiol **160**(5): 439-43.

- Simkin, A. J., Y. h. Laizet et M. Kuntz** (2004). "Plastid lipid associated proteins of the plant fibrillin family: structure, localisation, functions and gene expression." Recent Res. Devel. Biochem., Research Signpost **5**: 307-316.
- Smirra, I., A. H. Halevy et A. Vainstein** (1993). "Isolation and Characterization of a Chromoplast-Specific Carotenoid-Associated Protein from *Cucumis sativus* Corollas." Plant Physiol. **102**(2): 491-496.
- Smith, M. D., S. Ghosh, E. B. Dumbroff et J. E. Thompson** (1997). "Characterization of Thylakoid-Derived Lipid-Protein Particles Bearing the Large Subunit of Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase." Plant Physiol. **115**(3): 1073-1082.
- Smith, M. D., D. D. Licatalosi et J. E. Thompson** (2000). "Co-Association of Cytochrome f Catabolites and Plastid-Lipid-Associated Protein with Chloroplast Lipid Particles." Plant Physiol. **124**(1): 211-222.
- Snowden, K. C., A. J. Simkin, B. J. Janssen, K. R. Templeton, H. M. Loucas, J. L. Simons, S. Karunairetnam, A. P. Gleave, D. G. Clark et H. J. Klee** (2005). "The Decreased apical dominance1/*Petunia hybrida* CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASE8 Gene Affects Branch Production and Plays a Role in Leaf Senescence, Root Growth, and Flower Development." Plant Cell **10**: 10.
- Steinmüller, D. et M. Tevini** (1985). "Composition and function of plastoglobuli: II. Lipid composition of leaves and plastoglobuli during beech leaf senescence." Planta **163**: 91-96.
- Stern, D. B., D. C. Higgs et J. Yang** (1997). "Transcription and translation in chloroplasts." Trends in Plant Science **2**(8): 308.
- Sugiura, M.** (1992). "The chloroplast genome." Plant Mol Biol **19**(1): 149-68.
- Thelander, M., J. Narita et W. Gruissem** (1986). "Plastid differentiation and pigment biosynthesis during tomato fruit ripening." Current Topics in Plant Biochemistry and Plant Physiology **5**: 128-141.
- Thomson, W. W. et J. M. Whatley** (1980). "Development of Nongreen Plastids." Annual Review of Plant Physiology **31**: 375-394.
- Tijsterman, M., R. F. Ketting et R. H. Plasterk** (2002). "The genetics of RNA silencing." Annu Rev Genet **36**: 489-519.
- Ting, J. T. L., S. S. H. Wu, C. Ratnayake et A. H. C. Huang** (1998). "Constituents of the tapetosomes and elaioplasts in *Brassica campestris* tapetum and their degradation and retention during microsporogenesis." Plant J **16**(5): 541-551.
- Tzen, J. T. et A. H. Huang** (1992). "Surface structure and properties of plant seed oil bodies." J Cell Biol **117**(2): 327-35.
- Vishnevetsky, M., M. Ovadis, H. Itzhaki, M. Levy, Y. Libal-Weksler, Z. Adam et A. Vainstein** (1996). "Molecular cloning of a carotenoid-associated protein from *Cucumis sativus* corollas: homologous genes involved in carotenoid sequestration in chromoplasts." Plant J **10**(6): 1111-1118.
- Vishnevetsky, M., M. Ovadis, H. Itzhaki et A. Vainstein** (1997). "CHRC, encoding a chromoplast-specific carotenoid-associated protein, is an early gibberellic acid-responsive gene." J Biol Chem **272**(40): 24747-50.
- Vishnevetsky, M., M. Ovadis, A. Zuker et A. Vainstein** (1999). "Molecular mechanisms underlying carotenogenesis in the chromoplast: multilevel regulation of carotenoid-associated genes." Plant J **20**(4): 423-431.
- Von Lintig, J., R. Welsch, M. Bonk, G. Giuliano, A. Batschauer et H. Kleinig** (1997). "Light-dependent regulation of carotenoid biosynthesis occurs at the level of phytoene

- synthase expression and is mediated by phytochrome in *Sinapis alba* and *Arabidopsis thaliana* seedlings." *Plant J* **12**(3): 625-34.
- Vothknecht, U. C. and P. Westhoff** (2001). "Biogenesis and origin of thylakoid membranes." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1541**(1-2): 91.
- Waterhouse, P. M., M. B. Wang et T. Lough** (2001). "Gene silencing as an adaptive defence against viruses." *Nature* **411**(6839): 834-42.
- Waterhouse, P. M. et C. A. Helliwell** (2003). "Exploring Plant Genomes By RNA-Induced Gene Silencing." *Nature Reviews Genetics* **4**(1): 29.
- Wesley, S. V., C. A. Helliwell, N. A. Smith, M. B. Wang, D. T. Rouse, Q. Liu, P. S. Gooding, S. P. Singh, D. Abbott, P. A. Stoutjesdijk, S. P. Robinson, A. P. Gleave, A. G. Green et P. M. Waterhouse** (2001). "Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants." *Plant J* **27**(6): 581-90.
- Wetzel, C. M. et S. R. Rodermel** (1998). "Regulation of phytoene desaturase expression is independent of leaf pigment content in *Arabidopsis thaliana*." *Plant Mol Biol* **37**(6): 1045-53.
- Yamaguchi-Shinozaki, K. et K. Shinozaki** (1993). "Characterization of the expression of a desiccation-responsive RD29 gene of *Arabidopsis thaliana* and analysis of its promoter in transgenic plants." *Mol Gen Genet* **236**(2-3): 331-40.
- Ye, X., S. Al-Babili, Kl, ouml, A. ti, J. Zhang, P. Lucca, P. Beyer et I. Potrykus** (2000). "Engineering the Provitamin A (-Carotene) Biosynthetic Pathway into (Carotenoid-Free) Rice Endosperm." *Science* **287**(5451): 303-305.
- Yu, J., S. Hu, J. Wang, G. K.-S. Wong, S. Li, B. Liu, Y. Deng, L. Dai, Y. Zhou, X. Zhang, M. Cao, J. Liu, J. Sun, J. Tang, Y. Chen, X. Huang, W. Lin, C. Ye, W. Tong, L. Cong, J. Geng, Y. Han, L. Li, W. Li, G. Hu, X. Huang, W. Li, J. Li, Z. Liu, L. Li, J. Liu, Q. Qi, J. Liu, L. Li, T. Li, X. Wang, H. Lu, T. Wu, M. Zhu, P. Ni, H. Han, W. Dong, X. Ren, X. Feng, P. Cui, X. Li, H. Wang, X. Xu, W. Zhai, Z. Xu, J. Zhang, S. He, J. Zhang, J. Xu, K. Zhang, X. Zheng, J. Dong, W. Zeng, L. Tao, J. Ye, J. Tan, X. Ren, X. Chen, J. He, D. Liu, W. Tian, C. Tian, H. Xia, Q. Bao, G. Li, H. Gao, T. Cao, J. Wang, W. Zhao, P. Li, W. Chen, X. Wang, Y. Zhang, J. Hu, J. Wang, S. Liu, J. Yang, G. Zhang, Y. Xiong, Z. Li, L. Mao, C. Zhou, Z. Zhu, R. Chen, B. Hao, W. Zheng, S. Chen, W. Guo, G. Li, S. Liu, M. Tao, J. Wang, L. Zhu, L. Yuan et H. Yang** (2002). "A Draft Sequence of the Rice Genome (*Oryza sativa* L. ssp. indica)." *Science* **296**(5565): 79-92.
- Zhou, Y., J. H. Chan, A. Y. Chan, R. K. F. Chak, E. Y. L. Wong, M.-L. Chye, J. S. M. Peiris, L. L. M. Poon et E. Lam** (2004). "Transgenic plant-derived siRNAs can suppress propagation of influenza virus in mammalian cells." *FEBS Letters* **577**(3): 345.
- Zimmermann, P., M. Hirsch-Hoffmann, L. Hennig et W. Gruissem** (2004). "GENEVESTIGATOR. *Arabidopsis* Microarray Database and Analysis Toolbox." *Plant Physiol.* **136**(1): 2621-2632.

# **PUBLICATIONS ASSOCIÉES AU TRAVAIL DE THÈSE**

## **PUBLICATIONS ASSOCIÉES AU TRAVAIL DE** **THÈSE**

### Liste des publications :

Yec'han Laizet, Dominique Pontier, Régis Mache, and Marcel Kuntz (2004) **Subfamily Organization and Phylogenetic Origin of Genes Encoding Plastid Lipid-Associated Proteins of the Fibrillin Type** *Journal of Genome Science and Technology Volume 3, Number 1 (Mars 2004)*.

Andrew Simkin, Yec'han Laizet, Marcel Kuntz (2004) **Plastid lipid associated proteins of the plant fibrillin family : structure, localisation, functions and gene expression**. *Recent Res. Devel. Biochem. 5, pp.307-316. Research Signpost, Trivandrum, India*.



# Subfamily Organization and Phylogenetic Origin of Genes Encoding Plastid Lipid-Associated Proteins of the Fibrillin Type

Yec'han Laizet, Dominique Pontier, Régis Mache, and Marcel Kuntz\*

*Laboratoire Plastides et Différenciation Cellulaire, Université Joseph Fourier and CNRS, BP53, 38041 Grenoble, France*

(Received: 16 March 2004; accepted: 30 July 2004)

**ABSTRACT:** Plastid lipid-associated proteins of the fibrillin type have been found in a number of plants, but beyond their structural role in carotenoid-storing fibrils in chromoplasts, their functions remain poorly understood. We have identified 13 genes encoding members of this family in *Arabidopsis*. Some genes can be grouped in subfamilies of closer sequence similarity. Fibrillin polypeptides share typical signatures and potential functional domains, but appear quite diverse when other parameters are considered, namely their molecular weight, pI, or hydrophobic profiles. Most of these genes show differential expression when stress- or organ-related expression is examined. An evolutionary scheme for fibrillin-related genes can be proposed. Three *Arabidopsis* fibrillin genes originate from relatively recent duplications, and are not found in the rice genome, which has ten orthologues. Four genes are found in a red alga. A diverse situation is found in cyanobacteria.  $\beta$ -cyanobacteria have one orthologue of one plant gene and, in some species, a second gene (without plant orthologue).  $\alpha$ -Cyanobacteria have either one or two members of a third gene subfamily (without plant orthologue) or no such gene at all (in species adapted to low light). This suggests that plants multiplied their fibrillin genes from an ancestral gene that still has a relative in some cyanobacteria.

**Keywords:** *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, Cyanobacterium, Stress, Evolution, Multigene Family.

## 1. INTRODUCTION

The name *fibrillin* was originally proposed for a plant protein identified in ripening *Capsicum annuum* fruit [1]. Its demonstrated function is the storage of excess carotenoid pigments in specific lipoprotein structures (fibrils) within chromoplasts. In these structures, fibrillin is in contact with polar lipids/carotenoids and allows these structures to remain in suspension in an aqueous environment. A second postulated function for this protein is related to stress. Fibrillin accumulates in leaves under photo-oxidative stress [2, 3]. Upon associating with thylakoids, these proteins may contribute to the tolerance of the photosynthetic apparatus to stress conditions. However, fibrillin homologues have also been found in association with plastid lipid structures in numerous cases that are not

obviously related to stress [4–7]. In addition, overexpression of *C. annuum* fibrillin influences tobacco development under mild environmental conditions [8].

The plastid lipid-associated proteins of the fibrillin type may have originally been involved in the stabilization of lipid structures. Evolution may have selected them as contributors for protection against various stresses in many higher plants [9], and later in a few plants for carotenoid storage in chromoplastic lipoprotein structures (for a review, see [10]). However, this view is currently clouded for a number of reasons. First, a number of related polypeptides have been identified in various species, but have been given different names (see above-mentioned references). Second, several more or less related polypeptides/genes can be found within a species [11]. Therefore, it is necessary to organize the available genomic data on related fibrillin sequences. Our aim is to shed light on the subcellular location and the redundancy/specificity of

\* Author to whom correspondence should be addressed.

the encoded polypeptides, and to identify the genes that have been conserved through evolution (because they have essential functions) and those that arose later (possibly because they may have specialized functions).

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. *In Silico* Analysis

Homology searches were run at [www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST). Predictions for chloroplast transit peptides and their cleavage sites were based on ChloroP [12] run at [www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP](http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP), or TargetP [13] run at [www.cbs.dtu.dk/services/TargetP](http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP). Multisequence alignments and phylogenetic trees were calculated with the use of ClustalW1.8 integrated in Bioedit ([www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html](http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html)) and drawn with Phylodendron (<http://iubio.bio.indiana.edu/treeapp/treeprint-sample1.html>). Phylogenetic trees were also inferred with the use of the Phylip package (<http://kun.homelinux.com/Pise/5.a/phylip.html>), by both the parsimony and neighbor joining methods. Bootstrap values indicate (in %) the number of times a branch was detected out of 1000 replicates. Gene expression data were extracted from [www.arabidopsis.org/tools/bulk/microarray/index.jsp](http://www.arabidopsis.org/tools/bulk/microarray/index.jsp) (organs) and [http://large.gsc.riken.go.jp/microarray/microarray\\_data.pl](http://large.gsc.riken.go.jp/microarray/microarray_data.pl) (stress). The references [14–16] describe the methodology used to produce the raw data and their statistical analysis. Data relevant to fibrillin genes were compiled manually.

### 2.2. Plant Cultures and Treatments

*Arabidopsis thaliana* (ecotype Columbia) was grown in a growth chamber at 24 °C under a 16-h light–8-h dark photoperiod. For gene expression experiments, organs of adult plants and from detached leaves incubated on water at 24 °C, 4 °C, 24 °C + wounding of the leaf blade, and at 24 °C without water (drought).

### 2.3. Molecular Methods

*Arabidopsis* genomic DNA was extracted with the cetyltrimethylammonium bromide method. Polymerase chain reaction (PCR) assays were run with Taq pol (Invitrogen) as recommended by the supplier, in the presence of 0.4  $\mu$ M of each oligonucleotide and 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>. The cycle number was routinely 30 and the hybridization temperature was 55 °C.

RNA was extracted with the TriReagent kit (MRC). Total RNA (2–4  $\mu$ g) was used in a reverse transcription (RT) reaction catalyzed by Moloney murine leukemia virus (Gibco-BRL) as recommended by the supplier. Approximately 1/20th of the RT reaction was used for PCR amplification. The following oligonucleotides were used for amplification of “long” FIB3b cDNA (see Section 3.4):

F: GGATCCATGTCTCATGTCTGGTTCCATGACCT-TTCTACATTG  
R: CAAGCGATTTTAAGTATGTATGATAGCTCG

The following oligonucleotides were used for amplification of a genomic DNA segment encompassing the 3' end of FIB3a and the 5' end of FIB3b:

F: CCCACTTATCGAATCCCTCTT  
R: TTCAAGAGGCTCAATGGCTTC (in Columbia and WS)  
R: TCTAGATTTGAGCTGTTTCCGCTTCTCGGC (in Columbia and Landsberg erecta)

RNA gel blots were produced after electrophoretic separation on formaldehyde–1% agarose gels of 15  $\mu$ g total RNA and transfer onto nitrocellulose. Blots were hybridized at 55 °C to PCR-amplified probes radiolabeled in the presence of [ $\alpha$ -32P]dCTP (Promega Prime-a-gene kit). The following oligonucleotides were used:

FIB1a, F: GGAAGCTCTCTCTTAAACCC  
FIB1a, R: CAAACCCATAACTGGCCTGTTC  
FIB1b, F: GCCCTCTCTTGAATCCTTGAACCTTG  
FIB1b, R: GACACATTTTCATAGGCCATAGACG  
FIB2, F: ATGGCTACGCTCTTCACCGTCG  
FIB2, R: AGATCTGAGCTCAAGCAGAGAGCTTCC.

The FIB1a and FIB1b probes correspond mainly to the 3' end untranslated region of the genes.

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

### 3.1. Properties of Plastid Lipid-Associated Proteins of the Fibrillin Type in *Arabidopsis*

*Arabidopsis* [17] possesses 13 genes showing sequence homology to fibrillin genes (Table 1). All encoded FIB precursor polypeptides are predicted to possess an N-terminal transit peptide for targeting to the plastid. This prediction is confirmed by the identification of seven of them in the chloroplast proteome [18]. None of them were found in the mitochondrial proteome [19]. However, the chloroplastic location of FIB9 appears less certain, inasmuch as its transit peptide is unusually short (Table 1). In addition, nine FIB polypeptides have been found in the thylakoid membrane of *Arabidopsis* [20]. None of them were found in the plastid envelope [21].

Table 1 compiles data indicating diversity among FIB polypeptides, raising the question of the specificity of each of them. The calculated molecular mass of the mature polypeptides (assuming cleavage of a targeting signal peptide) or experimentally determined molecular mass (when available; [20]) range from 21 to 42 kDa. The highest determined molecular masses appear to be slightly overestimated, as already observed for the fibrillin polypeptide from *C. annuum* [1]. Table 1 also presents predicted or experimentally determined (when available; [20]) pI values, which distinguish three classes (pI around 5, 7, or 9).

Despite these disparities, multisequence alignment of the *Arabidopsis* FIB polypeptides (Fig. 1) confirms that they all belong to a family, inasmuch as they share three blocks of homology in the mature polypeptides, with typical

**Table 1.** Compilation of the main features of Arabidopsis plastid lipid-associated proteins of the fibrillin type.

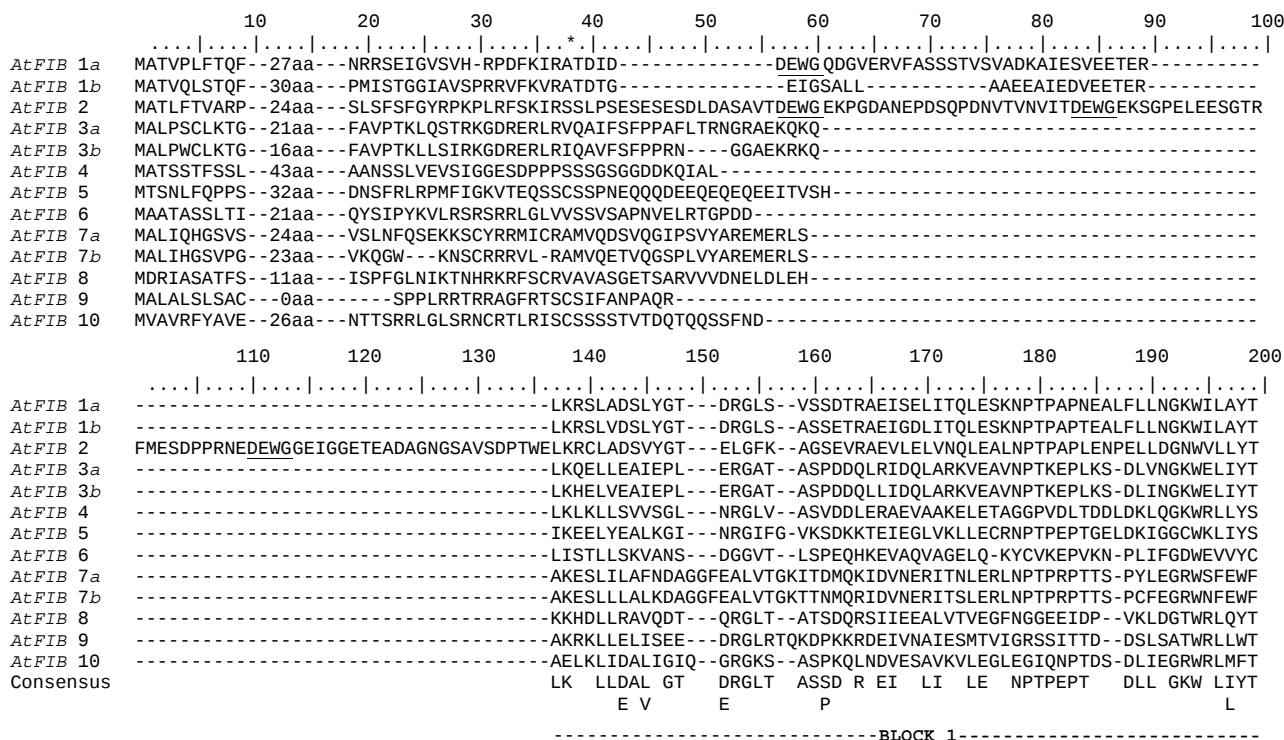
| Name  | Locus     | EST       | Proteome  | Length of TP | Predicted molecular mass (precursor) (kDa) | Predicted molecular mass (mature) (kDa) | Determined molecular mass (mature) (kDa) | Det. or (Pred.) pI |
|-------|-----------|-----------|-----------|--------------|--------------------------------------------|-----------------------------------------|------------------------------------------|--------------------|
| FIB1a | At4g04020 | NM_116640 | cp + thyl | 55           | 34.9                                       | 28.8                                    | 23.9–30.6                                | 4.6–4.9            |
| FIB1b | At4g22240 | NM_118350 | cp + thyl | 59           | 36.7                                       | 27.2                                    | 23.9–28.5                                | 4.7–4.9            |
| FIB2  | At2g35490 | NM_129101 | cp + thyl | 53           | 40.5                                       | 36.6                                    | 34.9–42.0                                | 4.1–4.3            |
| FIB3a | At3g26070 | NM_113511 | cp + thyl | 50           | 27.2                                       | 21.8                                    |                                          | (9.36)             |
| FIB3b | At3g26080 | NM_113512 | thyl      | 45           | 29.7                                       | 24.8                                    |                                          | (9.06)             |
| FIB4  | At3g23400 | NM_113243 | cp + thyl | 72           | 30.5                                       | 22.9                                    | 25.4–27.3                                | 4.89–5.4           |
| FIB5  | At5g09820 | NM_121019 |           | 61           | 30.5                                       | 23.9                                    |                                          | (4.96)             |
| FIB6  | At5g19940 | NM_122001 | cp        | 50           | 26.5                                       | 20.9                                    |                                          | (7.87)             |
| FIB7a | At3g58010 | NM_115663 | thyl      | 53           | 34.1                                       | 28.4                                    | 28.2                                     | 4.9                |
| FIB7b | At2g42130 | NM_201938 | thyl      | 48           | 32.9                                       | 27.7                                    | 28.2                                     | 4.9                |
| FIB8  | At2g46910 | NM_130259 |           | 40           | 31.6                                       | 27.1                                    |                                          | (5.23)             |
| FIB9  | At4g00030 | NM_116220 |           | 25           | 24.1                                       | 21.4                                    |                                          | (7.25)             |
| FIB10 | At1g51110 | NM_103989 | cp + thyl | 55           | 45.8                                       | 39.6                                    |                                          | (5.42)             |

Highly related sequences (see Figs. 1 and 2) have been given names differing only by the lettering a or b. NM 121019/At5g09820 was translated from a previous version in the databases, which takes into account splicing of an additional intron, to produce a FIB5 polypeptide with higher similarity to other FIB polypeptides (join 8932 to 9020 in At5g09820). Length of transit peptide is predicted by the ChloroP program. Determined molecular mass, pI, and proteomic data are from [18, 20]. The predicted pI of mature polypeptides are given (brackets) when determined values are not available.

signatures. However, some of these signatures are partially lost in some polypeptides. FIB7a, 7b, and 10, for example, have an incomplete block 2. The end of the long C-terminal extension of FIB10 is similar to block 3 (and termed block 3'). This extension is acidic (without it, the pI value of FIB10 would be 9.3). The predicted cleavage sites for FIB1a, 1b, and 2 are confirmed by comparison with the known cleavage site for *C. annuum*

fibrillin. The N-terminus of the various mature proteins is immediately followed by a number of negatively charged amino acids, with the exception of FIB3a, 3b, and 9. In the latter cases, predicted cleavage sites appear to be uncertain.

Phylogenetic analysis (Fig. 2) shows that the Arabidopsis FIB1a, 1b, and 2; FIB3a and 3b; and FIB7a and 7b form three subfamilies. All of the other polypeptides appear



**Figure 1.** Sequence alignment of the Arabidopsis FIB polypeptides. The ClustalW program was used. Gaps were introduced to maximize sequence homology. Potential transit peptide cleavage sites are also aligned (\*). Conserved positions are shown in black (identical amino acids) or gray (similar amino acids) boxes. The fibrillin signatures within three blocks of homology are shown in the consensus line. A short motif in FIB1a, repeated in FIB2, is underlined.

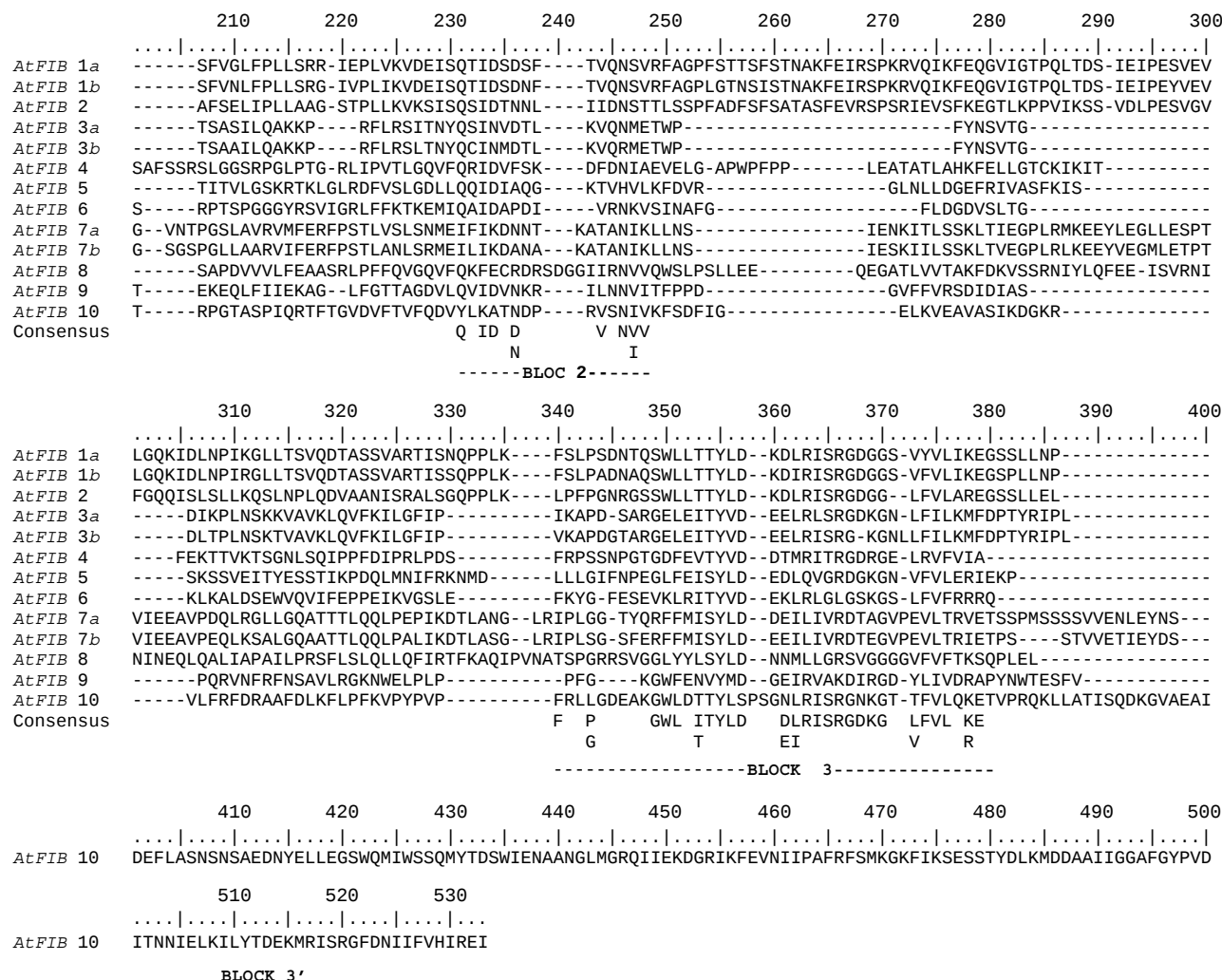


Figure 1. continued.

to be more distantly related to these three subfamilies and to each other. This includes the two polypeptides (FIB6 and FIB9) showing neutral pI values and close molecular masses, but which are not grouped in this tree. High bootstrap values were obtained only for the branches bearing FIB4, FIB8, and FIB9, which, however, were not classified as a subfamily.

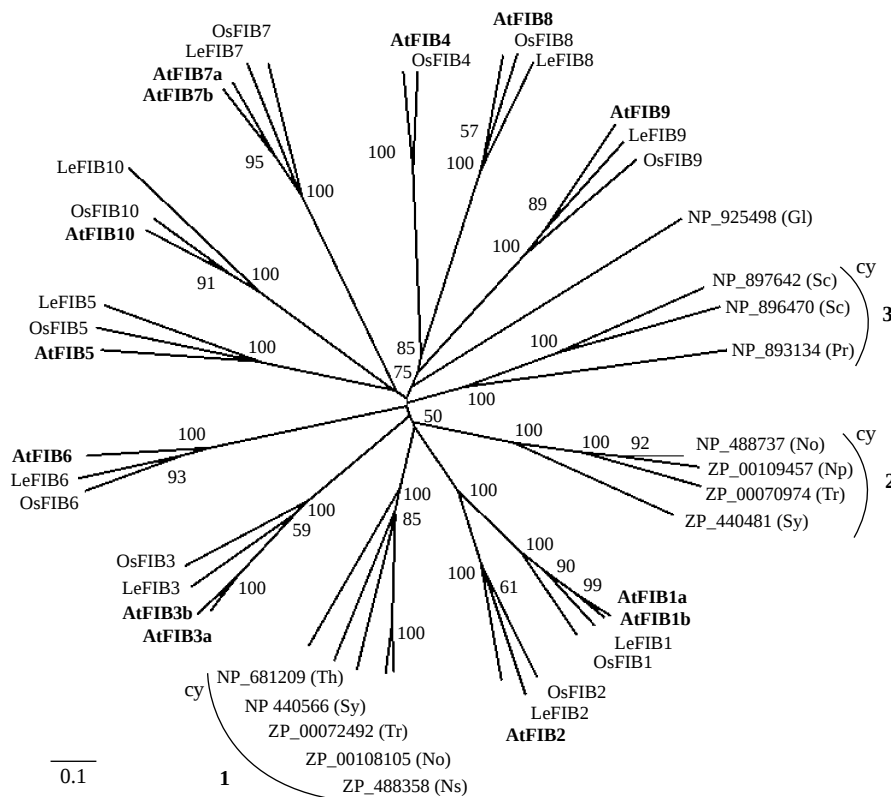
It can be mentioned that hydropathy plot analysis (not shown) also highlights the nonredundant features of FIB polypeptides. For example, FIB1a, 1b, and 2 have a hydrophobic region between homology block 1 and 2, which may define the membrane-anchoring part of the protein. However, others show different profiles, with a prominent hydrophobic region between block 2 and block 3 or overlapping with block 3 (FIB3a, 3b, 6, and 18), or multiple hydrophobic regions (FIB4, 5, 7a, 7b, 9, and 10).

### 3.2. Comparison of Fibrillin-like Genes in Arabidopsis and Other Organisms

The above data point to the existence of three subfamilies and the nonredundant nature of all other genes. The

exon/intron organizations of *FIB* genes in Arabidopsis are consistent with these findings. *FIB*1a, 1b, and 2 each contain two introns in identical positions. *FIB*7a and 7b contain six introns in identical positions. *FIB*3a and 3b also have an identical exon/intron structure (see below). However, the other fibrillin genes all have a different exon/intron structure, with the number of introns ranging from two (*FIB*9) to ten (*FIB*10).

The recent availability of the fully sequenced genome of a monocot plant, rice [22, 23], allows a comparison of gene families from the dicot Arabidopsis. Interestingly, ten fibrillin-like genes were found in rice. Each of them corresponds to an orthologue from Arabidopsis (Table 2, Fig. 2), suggesting that these ten genes appeared before the separation of monocots and dicots. The three additional *FIB* genes from Arabidopsis (absent in rice) all arose from recent duplication events, either on chromosome 4, giving the two paralogues *FIB*1a and *FIB*1b; or on chromosome 3, producing the two paralogues *FIB*3a and *FIB*3b; or between chromosome 3 and chromosome 2, producing the two paralogues *FIB*7a and *FIB*7b. For tomato,



**Figure 2.** Phylogenetic unrooted consensus tree of FIB polypeptides from *Arabidopsis* (At), rice (Os), tomato (Le), and various cyanobacteria (cy). The ClustalW program (the Saitou and Nei's neighbor joining method) was used. Bootstrap values are given (as a percentage) only when they are greater than 50. The tree is based on the largest common segment (178 amino acids) obtained after excision of large gaps and divergent blocks in the FIB polypeptide alignment. The scale bar indicates 0.1 amino acid substitution per site. For the cyanobacterial genes, accession numbers and species names are given: Gl: *Gloeobacter violaceus* [25]; No: *Nostoc* sp. PCC 7120 [26]; Np: *Nostoc punctiforme*; Pr: *Prochlorococcus marinus* subsp. *pastoralis* CCMP1986 [27]; Sy: *Synechocystis* PCC 6803 [28]; Sc: *Synechococcus* sp. WH8102 [29]; Th: *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 [30]; Tr: *Trichodesmium erythraeum* (<http://genome.ornl.gov/microbial/tery/>). Tomato FIB polypeptides were deduced from the following accession number in the TIGR (<http://www.tigr.org/>) tomato cDNA database. LeFIB1: TC116052, LeFIB2: TC124967+AW09494; LeFIB3: TC11292; LeFIB5: BI929643; LeFIB6: TC118055; LeFIB7: TC119061; LeFIB8: TC126867; LeFIB9: TC130337; LeFIB10: AW617522. Note that LeFIB4 (BG626357) was not included in the tree since its cDNA consists of only a short sequence.

another dicot, expressed sequence tags (ESTs) have been identified (to date) only for orthologues of the ten genes identified in rice (Fig. 2). It is interesting to note that the fully sequenced genome of the red alga *Cyanidioschyzon merolae* [24] contains four *FIB* genes, whose closest plant relatives are *FIB1a*, *FIB3a*, *FIB5*, and *FIB9*, respectively (<http://merolae.biol.s.u-tokyo.ac.jp>; loci CMS090C, CMP332C, CMK306C, and CMT081C).

Since FIB proteins are mainly, if not all, located in plastids, it is interesting to examine a possible origin of their gene from cyanobacteria, the plastid ancestors. Homologous genes were found in the fully sequenced genomes from cyanobacteria, but not in other bacterial groups. One gene showing scores for the best homology to *FIB1a* and *FIB1b* (Table 2) is found in the following  $\beta$ -cyanobacteria (characterized by a Rubisco of the 1B type): *Nostoc* PCC7120 and *Nostoc punctiforme*, in *Trichodesmium erythraeum* (a marine cyanobacterium), in *Synechocystis* PCC6803, and in *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 (a thermophilic cyanobacterium). These genes form

subfamily 1 (Fig. 2). A second subfamily of fibrillin-related genes is also found in these organisms (with the exception of *T. elongatus*), but they are not orthologues of *Arabidopsis* fibrillin genes, since they show low scores for homology to the latter. This is also the case for a third subfamily of fibrillin-like genes found in marine  $\alpha$ -cyanobacteria (Rubisco of 1A type), namely *Synechococcus* sp. WH8102 (two genes) and the prochlorophyte *Prochlorococcus marinus* subsp. *Pastoralis* CCMP1986 (also known as MED4) (Fig. 2). In contrast, no fibrillin-related gene was detected in the completely sequenced genome of two other prochlorophytes, *P. marinus* str. MIT 9313 [27] and *P. marinus* subsp. *marinus* str. CCMP1375 (also known as strain SS120; [31]). The latter two prochlorophytes are low light-adapted strains, and CCMP1986 is a high light-adapted strain. Regarding *Synechococcus* sp. WH8102, the main physiological trait of this species is motility (a chemotactic response), which is of obvious interest for nutrient acquisition but could also imply that it can experience a large gradient of light exposure. *Gloeobacter violaceus*,

**Table 2.** Compilation of orthologues of Arabidopsis fibrillin genes in rice and various cyanobacteria.

| Species/protein name                 | Accession no.   | E-value |
|--------------------------------------|-----------------|---------|
| Rice ( <i>O.sativa</i> cv. japonica) |                 |         |
| FIB1                                 | AAO72593        | 2 e-84  |
| FIB2                                 | AAL67595        | 5 e-76  |
| FIB3                                 | AAS07245        | 1 e-55  |
| FIB4                                 | AK106159 (mRNA) | 9 e-67  |
| FIB5                                 | CAE04639        | 8 e-58  |
| FIB6                                 | CAE02133        | 4 e-57  |
| FIB7                                 | AAO72625        | 2 e-79  |
| FIB8                                 | AE017111 (gDNA) | 1 e-86  |
| FIB9                                 | CAE01685        | 4 e-56  |
| FIB10                                | BAC06949        | 9 e-98  |
| Synechocystis PCC6803                | NP_440566       | 6 e-21  |
| Nostoc PCC7120                       | NP_488358       | 2 e-22  |
| Nostoc Punctiforme                   | ZP_00108105     | 4 e-90  |
| Trichodesmium erythraeum             | ZP_00072492     | 4 e-21  |
| T.elongatus                          | NP_681209       | 6 e-19  |

The accession number of the protein is given when available. Alternatively, the accession number for mRNA or genomic sequence is given. In the latter case (AE07111), the following segments were joined: 1449–1809, 1915–2057, 2396–2493, 3362–3444, 3954–4042, 4356–4413, 4486–4595. E-values are obtained upon BLAST alignment, using the corresponding polypeptides from Arabidopsis as a query. For cyanobacteria, only the E-values obtained using Arabidopsis *FIB1b* are given. For rice: <http://rpg.dna.affrc.go.jp/IRGSP/>.

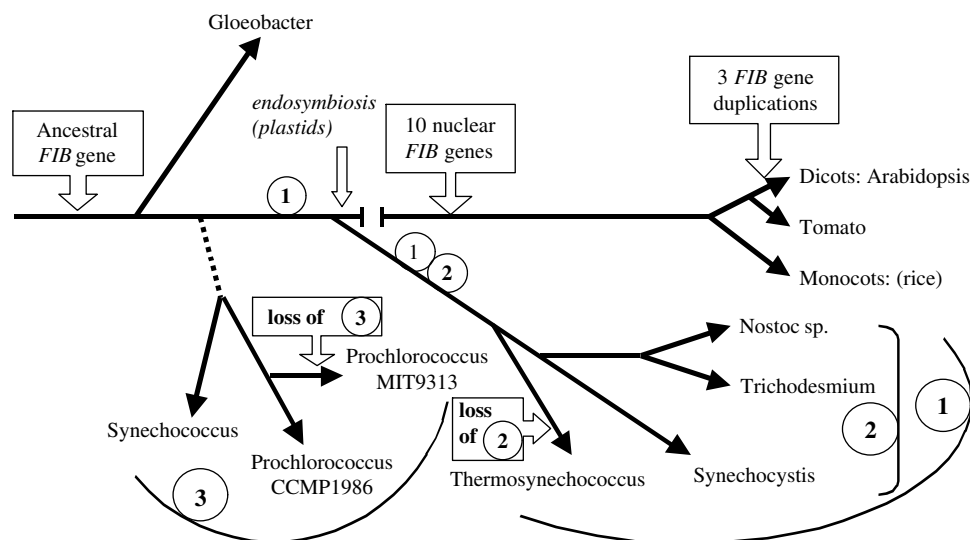
which lacks thylakoids and has photosystem I and II located in the plasma membrane, is an extremely light-sensitive cyanobacterium. Interestingly, it also contains a fibrillin-related gene. This gene is poorly related to any cyanobacterial fibrillin subfamily, which is not surprising since, during evolution, *G. violaceus* diverged very early from the other cyanobacteria (before the endosymbiotic event that led to plastids; [32]). Taken together, these data

suggest that at least one polypeptide related to fibrillin is essential in most cyanobacteria when this species/strain is subjected to occasional light stress.

A phylogenetic relation between the cyanobacterial subfamily 1 and plant *FIB1,2* can be proposed from the tree presented in Figure 2, in agreement with the homology scores (Table 1). However, a phylogenetic relation between the cyanobacterial subfamily 1 and plant *FIB3* cannot be fully excluded. Based on cyanobacterial evolutionary trees [27, 32, 33] and on the above-mentioned data, an evolutionary scheme for fibrillin genes can be proposed (Fig. 3). It postulates an ancestral fibrillin gene that gave rise (before the endosymbiosis event leading to plastids) to the ancestor of the cyanobacterial subfamily 1, whose direct descendants may be the plant *FIB1,2* genes (or *FIB3*). The other fibrillin genes found in higher plants might have derived from these *FIB1,2* (or *FIB3*) subfamilies at an early stage of plant evolution. It seems less likely that the ten *FIB* genes common to higher plants are all direct descendants of a separate cyanobacterial gene, since there is no evidence for such a multiplicity of genes in bacteria. The cyanobacterial subfamily 2 may have originated from subfamily 1. Whether this occurred before or after the endosymbiotic event leading to plastids cannot be ascertained. The loss of this subfamily 2 gene in *T. elongatus* is likely to be a more recent event. An ancient origin of subfamily 3 genes and loss of these genes in low light-adapted marine  $\alpha$ -cyanobacteria is proposed.

### 3.3. The Plant *FIB1,2* Subfamily

All *FIB* polypeptides characterized to date in detail, either under stress conditions or in a given organ/tissue/ substructure, belong to this *FIB1,2* subfamily. However, whether



**Figure 3.** Occurrence of *FIB* genes and their subfamilies in the context of plastid and cyanobacteria evolution. The scheme takes into account data from Figure 2 and from [32, 33] but is not intended to show evolutionary distances to scale. See Figure 2 for full names of cyanobacterial strains, accession numbers, and definition of cyanobacterial fibrillin gene subfamilies 1, 2, and 3 (circled). Formation of new genes or loss of genes is boxed. The branching of subfamily 3 is speculative.

these polypeptides correspond to FIB1a, 1b, or 2 needs clarification. The fibrillin homologue found in *Pisum sativum* leaf plastoglobules (PG-1; accession no. AF043905; [6]) is more closely related to FIB2. For Brassicaceae, to which Arabidopsis belongs, classification is unambiguous: a fibrillin homologue identified in tapetum elaioplasts from *Brassica rapa* (BCP32; AF084554; [4]) is more similar to FIB1a, but orthologues of each member of the *FIB1,2* subfamily (T01472, T04905, AAC3672; [11]) are present in this species. It appears to be more difficult to discriminate between FIB1a and FIB1b for more distally related species. Polypeptides with very close homology scores against FIB1a or FIB1b include fibrillin from *C. annuum* (X71952; [1, 2]), CDSP34 from *Solanum tuberosum* (T07825; [3]) and CHRC from *Cucumis sativus* (X95593; [10]). The fibrillin homologue found in various organs in *Citrus unshiu* (AB011797; [34]) is only slightly closer to FIB1b.

However, rather than overall sequence comparison, the N-terminal part of the mature polypeptide allows clear discrimination, depending on the occurrence of a short DEWG motif (Fig. 1). This motif is present as a single copy in Arabidopsis FIB1a and in all of the higher plant FIB1a,1b homologues mentioned above (including rice), but not in FIB1b from Arabidopsis or *B. rapa* (and not in cyanobacteria). In FIB2 a fourfold (rice), threefold (Arabidopsis), or twofold (*B. rapa*, which has a third incomplete motif; *P. sativum*) repetition of this motif occurs. The conservation of this motif suggests a functional role in plants, which is apparently not fulfilled by FIB1b.

### 3.4. The Arabidopsis *FIB3a,3b* Subfamily

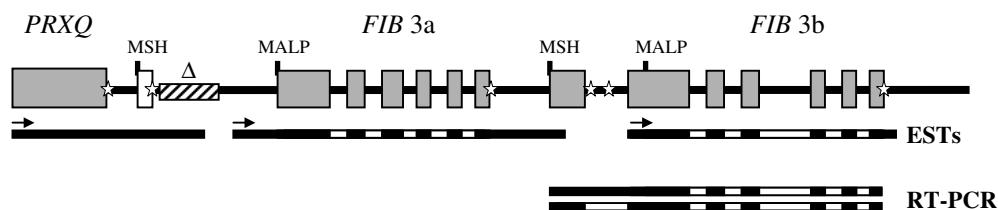
*FIB3a* and *FIB3b* are tandemly arranged on chromosome 3. The extent of their longest cDNAs in the databases (Fig. 4) is consistent with the deduced precursor polypeptides aligned in Figure 1 (which read MALP... at their N-terminus). However, we have been able to amplify by RT-PCR a longer *FIB3b* cDNA that potentially encodes a longer polypeptide (which reads MSH... at its N-terminus; Fig. 4). The use of this alternative upstream initiation codon to produce a FIB3b precursor would imply splicing of an additional intron (this intron contains two stop codons in-frame). We have been able to clone such a spliced form

after RT-PCR amplification, but it appears to be a minor form (data not shown). The prevalence of a nonfunctional “long” transcript (containing the upstream initiation codon) questions the synthesis of a FIB3b precursor starting at the downstream methionine. Primer extension experiments revealed multiple *FIB3b* transcripts of either large size (which contain the alternative upstream codon) or of shorter size (which do not contain the upstream methionine codon) (not shown). Therefore, it seems likely (at least under the experimental conditions used) that FIB3b is prevalently synthesized from “short” length transcripts, as a precursor starting at the downstream methionine (MALP...).

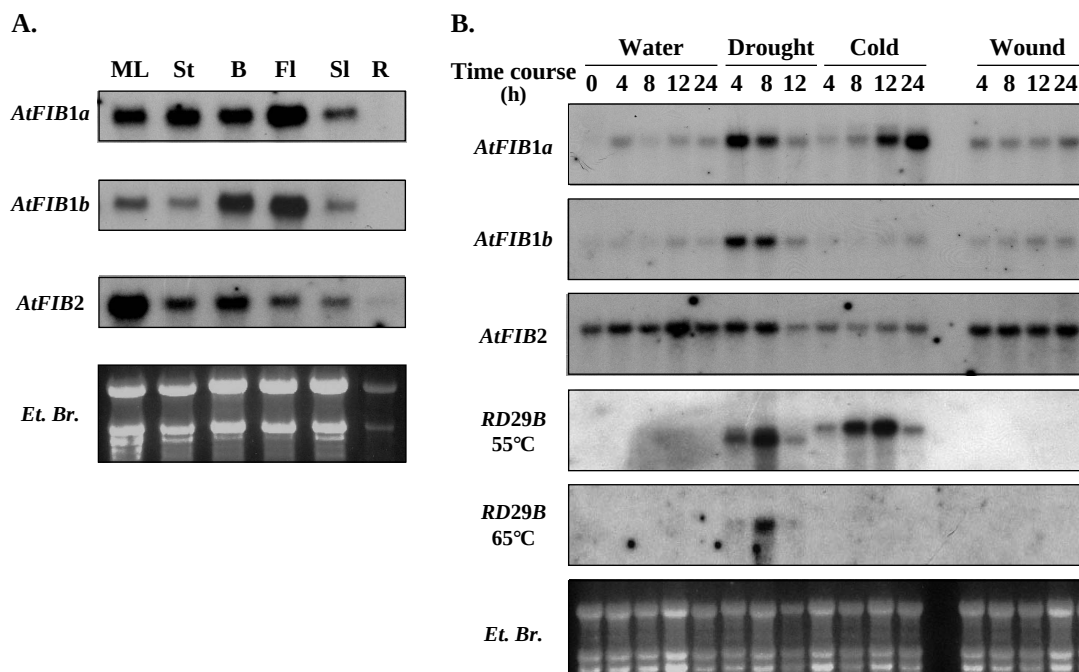
Comparison of *FIB3a* and *FIB3b* upstream genomic sequences revealed significant homology, with the exception of a 286-bp insertion in *FIB3a* (Fig. 4) showing striking sequence homology (63%) to a segment of the promoter of a peroxiredoxin Q gene. The latter *PRXQ* gene (locus At3g26060; [35]) is located immediately upstream of *FIB3a*. A potential alternative upstream translation initiation codon is also found in *FIB3a*. However, only a short open reading frame is observed in the latter case. In light of these observations, it can be proposed that a recent gene duplication led to the formation of these two genes (this duplication exists in Arabidopsis Columbia, Landsberg erecta, and WS ecotypes; data not shown), then *FIB3a* acquired a segment of the promoter from the unrelated upstream *PRXQ* gene.

### 3.5. Expression Pattern of Fibrillin Genes in Arabidopsis

We performed northern analysis of *FIB1a,1b,2* in roots, flowers, leaves, stem, and siliques (Fig. 5A). The lowest levels of expression were observed in roots and then siliques. Higher expression levels during flower development (with respect to leaves, for example) is observed for *FIB1a* and *FIB1b*, whereas the opposite is observed for *FIB2*. A differential expression of *FIB1a* and *FIB1b* can be noticed in stems. We also extracted and compiled Arabidopsis micro-array expression data available from two different sources (Table 3): repression in roots is observed for most *FIB* genes, but induction in flowers is not a general case (five other *FIB* genes show no induction in flowers, and two are repressed).



**Figure 4.** Schematic representation of genomic sequences from Arabidopsis *FIB3a*, *FIB3b*, and the end of the upstream *PRXQ* gene aligned with expressed sequence tags (ESTs) and RT-PCR fragments. Potential coding sequences are boxed in the genomic sequence. Intronic sequences absent from ESTs and RT-PCR products are in white. Potential translation initiation codons are shown with their following codons (MSH..., MALP...). Stars indicate relevant translation stop codons (see text). An insertion in the *FIB3a* upstream sequence (AB023041, position 67267–67553) homologous to a *PRXQ* promoter segment (AB023041, position 65208–65524), is boxed (Δ).



**Figure 5.** Expression of Arabidopsis *FIB1a*, *1b*, *2* in various organs (A) and in leaves subjected to various stress conditions (B). RNA gel blots were hybridized to gene-specific probes as described in Materials and Methods. ML, mature leaves; St, stem; B, flower buds; Fl, mature flowers; Sl, siliques; R, roots. The ethidium bromide-stained gels are shown (Et. Br.). The transcript levels in roots are underestimated since less RNA was available, but RT-PCR experiments confirmed a lower expression of these genes in roots when compared with any other tested organ (not shown). In (B), control leaves were incubated on water at 24 °C. Treatments are described in Materials and Methods. Hybridization of the *RD29B* probe at 55 °C reveals two types of transcripts (*RD29B* and *RD29A*), whereas only *RD29B* is detected at 65 °C.

Northern analysis also revealed that cold or drought stress applied to leaves leads to a repression of *FIB2* and an induction of *FIB1a* expression (Fig. 5B). Drought, but not cold, induced *FIB1b*. Wound stress induces the *C. annuum* orthologue [2], but has little effect on the expression of Arabidopsis *FIB1a*, *1b*, *2*. Note that the stress induction of the drought-induced gene *RD29B* or the drought- and cold-induced *RD29A* genes [36] is not parallel to that of *FIB1a* or *FIB1b*. Micro-array data were also compiled for cold,

drought, NaCl, and light exposure after a dark period. Either *FIB1a* or *FIB1b*, or both, is induced by a given stress in Arabidopsis. However, except for *FIB9* in the cold, no other fibrillin gene is stress-induced (only induction above a factor 2 was considered significant). Some fibrillin genes even show a slight repression due to stress.

Thus, our Northern experiments and the micro-array data are generally in agreement, but higher amplitudes are usually observed in Northern analysis, which could explain some minor differences. Validation of the micro-array data was also obtained for *FIB3a* and *FIB3b* with a more sensitive method, namely RT-PCR. For both genes a rather constitutive expression under stress and in most organs, and a repression in roots, was observed (not shown).

In conclusion, multiple examples of differential expression can be found among Arabidopsis fibrillin genes (except *FIB3a*, *3b*). This and the great variability in the features of most of the 13 fibrillin polypeptides (as described above, i.e., pI, molecular mass, hydropathy profile) suggest that the multiplicity of fibrillin genes reflects differential functions. The present report opens the way for a systematic functional investigation.

**Table 3.** Compilation of expression data for the Arabidopsis fibrillin genes.

| Name         | Flowers | Roots | Cold     | Drought   | Salt     | Light    |
|--------------|---------|-------|----------|-----------|----------|----------|
| <i>FIB1a</i> | n.a.    | n.a.  | + (×2,4) | ?         | + (×3)   | + (×8)   |
| <i>FIB1b</i> | +       | —     | =        | + (×4)    | + (×4)   | + (×3)   |
| <i>FIB2</i>  | =       | —     | =        | =         | =        | ?        |
| <i>FIB3a</i> | =       | —     | =        | — (×0,4)  | =        | =        |
| <i>FIB4</i>  | —       | —     | =        | — (×0,46) | — (×0,4) | =        |
| <i>FIB6</i>  | —       | —     | =        | =         | — (×0,5) | — (×0,4) |
| <i>FIB7a</i> | =       | —     | =        | =         | =        | ?        |
| <i>FIB8</i>  | =       | —     | n.a.     | n.a.      | n.a.     | n.a.     |
| <i>FIB9</i>  | =       | =     | + (×2,3) | =         | =        | ?        |

Statistically significant data were extracted from [www.arabidopsis.org/tools/bulk/microarray/index.jsp](http://www.arabidopsis.org/tools/bulk/microarray/index.jsp) (organs) and [http://rarge.gsc.riken.go.jp/microarray/microarray\\_data.pl](http://rarge.gsc.riken.go.jp/microarray/microarray_data.pl) (stress) and compiled here. No data are available for *FIB3b*, *5*, *7b*, and *10*. +, induction (more than 2.8-fold); —, repression (more than 2.8-fold); =, no change (less than 2-fold) when compared with reference sample (whole plant, nonstressed); ?, data not valid; n.a., not available. Numbers in parentheses quantify changes in expression (when available).

**Acknowledgments:** This work was funded in part by the European Community (contract QLK3-2000-00809). We also thank Genoplante for support. We are grateful to J. P. Alcaraz for advice on phylogeny, to J. J. Favory for

performing primer extensions, and to Dr. J. Gaffé for critical reading of the manuscript.

## References and Notes

- Deruère J, Römer S, d'Harlingue A, Backhaus RA, Kuntz M, Camara B. Fibril assembly and carotenoid overaccumulation in chromoplasts: A model for supramolecular lipoprotein structures. *Plant Cell* 6, 119 (1994).
- Chen HC, Klein A, Xiang M, Backhaus RA, Kuntz M. Drought- and wound-induced expression in leaves of a gene encoding a chromoplast carotenoid-associated protein. *Plant J.* 14, 317 (1998).
- Gillet B, Beyly A, Peltier G, Rey P. Molecular characterization of CDSP 34, a chloroplastic protein induced by water deficit in *Solanum tuberosum* L. plants, and regulation of CDSP 34 expression by ABA and high illumination. *Plant J.* 16, 257 (1998).
- Ting JT, Wu SS, Ratnayake C, Huang AH. Constituents of the tapetosomes and elaioplasts in *Brassica campestris* tapetum and their degradation and retention during microsporogenesis. *Plant J.* 16, 541 (1998).
- Hernández-Pinzón J, Ross JHE, Barnes KA, Damant AP, Murphy DJ. Composition and role of tapetal lipid bodies in the biogenesis of the pollen coat of *Brassica napus*. *Planta* 208, 588 (1999).
- Kessler F, Schnell D, Blobel G. Identification of proteins associated with plastoglobules isolated from pea (*Pisum sativum* L.) chloroplasts. *Planta* 208, 107 (1999).
- Smith MD, Licatalosi DD, Thompson JE. Co-association of cytochrome f catabolites and plastid-lipid-associated protein with chloroplast lipid particles. *Plant Physiol.* 124, 211 (2000).
- Rey P, Gillet B, Römer S, Eymery F, Massimino J, Peltier G, Kuntz M. Over-expression of a pepper plastid lipid-associated protein in tobacco leads to changes in plastid ultrastructure and plant development upon stress. *Plant J.* 21, 483 (2000).
- Langenkämper G, Manac'h N, Broin M, Cuiñé S, Becuwe N, Kuntz M, Rey P. Accumulation of plastid lipid-associated proteins (fibrillin/CDSP34) upon oxidative stress, ageing and biotic stress in Solanaceae and in response to drought in other species *J. Exp. Bot.* 52, 1545 (2001).
- Vishnevetsky M, Ovadis M, Vainstein A. Carotenoid sequestration in plants: the role of carotenoid-associated proteins. *Trends Plant Sci.* 4, 232 (1999).
- Kim HUK, Wu SSH, Ratnayake C, Huang HC. *Brassica rapa* has three genes that encode proteins associated with different neutral lipids in plastids of specific tissues. *Plant Physiol.* 126, 330 (2001).
- Emanuelsson O, Nielsen H, von Heijne G, ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. *Protein Sci.* 8, 978 (1999).
- Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S, von Heijne G. Predicting sub-cellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J. Mol. Biol.* 21, 1005 (2000).
- Perez-Amador MA, Lidder P, Johnson MA, Landgraf J, Wisman E, Green PJ. New molecular phenotypes in the dst mutants of *Arabidopsis* revealed by DNA microarray analysis. *Plant Cell* 13, 2703 (2001).
- Schaffer R, Landgraf J, Perez-Amador M, Wisman E. Monitoring genome-wide expression in plants. *Curr. Opin. Biotechnol.* 11, 162 (2000).
- Seki M, Narusaka M, Ishida J, Nanjo T, Fujita M, Oono Y, Kamiya A, Nakajima M, Enju A, Sakurai T, Satou M, Akiyama K, Taji T, Yamaguchi-Shinozaki K, Carninci P, Kawai J, Hayashizaki Y, Shinozaki K. 2002. Monitoring the expression profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *Plant J.* 31, 279 (2002).
- The Arabidopsis Genome Initiative. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408, 796 (2000).
- Kleffmann T, Russenberger D, von Zychlinski A, Christopher W, Sjölander K, Gruissem W, Baginsky S. The *Arabidopsis thaliana* chloroplast proteome reveals pathway abundance and novel protein functions. *Curr. Biol.* 14, 354 (2004).
- Heazlewood JL, Tonti-Filippini JS, Gout AM, Day DA, Whelan J, Millar AH. Experimental analysis of the *Arabidopsis* mitochondrial proteome highlights signaling and regulatory components, provides assessment of targeting prediction programs, and indicates plant-specific mitochondrial proteins. *Plant Cell* 16, 241 (2004).
- Friso G, Giacomelli L, Ytterberg J, Peltier JB, Rudella A, Sun Q, van Wijk KJ. In-depth analysis of the thylakoid membrane proteome of *Arabidopsis thaliana* chloroplasts: new proteins, new functions, and a plastid proteome database. *Plant Cell* 16, 478 (2004).
- Ferro M, Salvi D, Brugière S, Miras S, Kowalski S, Louwagie M, Garin J, Joyard J, Rolland N. Proteomics of the chloroplast envelope membranes from *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Cell Proteomics* 2, 325 (2003).
- Goff SA et al. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. japonica). *Science* 296, 92 (2002).
- Yu J et al. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. indica). *Science* 296, 79 (2002).
- Matsuzaki M, Misumi O, Shin. -IT, Maruyama S, Takahara M, Miyagishima SY, Mori T, Nishida K, Yagisawa F, Nishida K, Yoshida Y, Nishimura Y, Nakao S, Kobayashi T, Momoyama Y, Higashiyama T, Minoda A, Sano M, Nomoto H, Oishi K, Hayashi H, Ohta F, Nishizaka S, Haga S, Miura S, Morishita T, Kabeya Y, Terasawa K, Suzuki Y, Ishii Y, Asakawa S, Takano H, Ohta N, Kuroiwa H, Tanaka K, Shimizu N, Sugano S, Sato N, Nozaki H, Ogasawara N, Kohara Y, Kuroiwa T. Genome sequence of the ultra-small unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae* 10D. *Nature* 428, 653 (2004).
- Nakamura Y, Kaneko T, Sato S, Mimuro M, Miyashita H, Tsuchiya T, Sasamoto S, Watanabe A, Kawashima K, Kishida Y, Kiyokawa C, Kohara M, Matsumoto M, Matsuno A, Nakazaki N, Shimpo S, Takeuchi C, Yamada M, Tabata S. Complete genome structure of *Gloeobacter violaceus* PCC 7421, a cyanobacterium that lacks thylakoids. *DNA Res.* 10, 137 (2003) and supplement.
- Kaneko T, Nakamura Y, Wolk CP, Kuritz T, Sasamoto S, Watanabe A, Iriguchi M, Ishikawa A, Kawashima K, Kimura T, Kishida Y, Kohara M, Matsumoto M, Matsuno A, Muraki A, Nakazaki N, Shimpo S, Sugimoto M, Takazawa M, Yamada M, Yasuda M, Tabata S. Complete genomic sequence of the filamentous nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *DNA Res.* 8, 205 (2001).
- Rocap G, Larimer FW, Lamerdin J, Malfatti S, Chain P, Ahlgren NA, Arellano A, Coleman M, Hauser L, Hess WR, Johnson ZI, Land M, Lindell D, Post AF, Regala W, Shah M, Shaw SL, Steglich C, Sullivan MB, Ting CS, Tolonen A, Webb EA, Zinser ER, Chisholm SW. Genome divergence in two *Prochlorococcus* ecotypes reflects oceanic niche differentiation. *Nature* 424, 104 (2003).
- Kaneko T, Sato S, Kotani H, Tanaka A, Asamizu E, Nakamura Y, Miyajima N, Hirosawa M, Sugiura M, Sasamoto S, Kimura T, Hosouchi T, Matsuno A, Muraki A, Nakazaki N, Naruo K, Okumura S, Shimpo S, Takeuchi C, Wada T, Watanabe A, Yamada M, Yasuda M, Tabata S. Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Res.* 3, 109 (1996).
- Palenik B, Brahamsha B, Larimer F, Land M, Hauser L, Chain P, Lamerdin J, Regala W, Allen EA, McCarren J, Paulsen I, Dufresne A, Partensky F, Webb E, Waterbury J. The genome of a motile marine *Synechococcus*. *Nature* 424, 1037 (2003).
- Nakamura Y, Kaneko T, Sato S, Ikeuchi M, Katoh H, Sasamoto S, Watanabe A, Iriguchi M, Kawashima K, Kimura T, Kishida Y, Kiyokawa C, Kohara M, Matsumoto M, Matsuno A, Nakazaki N, Shimpo S, Sugimoto M, Takeuchi C, Yamada M, Tabata S. Complete genome structure of the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* BP-1. *DNA Res.* 9, 123 (2002).

31. Dufresne A, Salanoubat M, Partensky F, Artiguenave F, Axmann IM, Barbe V, Duprat S, Galperin MY, Koonin EV, Le Gall F, Makarova K, Ostrowski M, Oztas S, Robert C, Rogozin IB, Scanlan DJ, Tandeau de Marsac N, Weissenbach J, Wincker P, Wolf YI, Hess WR. Genome sequence of the cyanobacterium *Prochlorococcus marinus* SS120, a nearly minimal oxyphototrophic genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 10020 (2003).
32. Nelissen B, Van de Peer Y, Wilmotte A, de Wachter R. An early origin of plastids within the cyanobacterial divergence is suggested by evolutionary trees based on complete 16S rRNA sequences. *Mol. Biol. Evol.* 12, 1166 (1995).
33. Badger MR, Price GD. CO<sub>2</sub> concentrating mechanisms in cyanobacteria: molecular components, their diversity and evolution. *J. Exp. Bot.* 54, 609 (2003).
34. Moriguchi T, Kita M, Endo-Inagaki T, Ikoma Y, Omura M. 1998. Characterization of a cDNA homologous to carotenoid-associated protein in citrus fruits. *Biochim. Biophys. Acta* 1442, 334 (1998).
35. Dietz KJ. Plant peroxiredoxins. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54, 93 (2003).
36. Yamaguchi-Shinozaki Y, Shinozaki K. Characterization of the expression of a desiccation-responsive rd29 gene of and analysis of its promoter in transgenic plants. *Mol. Gen. Genet.* 236, 331 (1993).



Recent Res. Devel. Biochem., 5(2004): 307-316 ISBN: 81-271-0049-8

21

## Plastid lipid associated proteins of the plant fibrillin family: Structure, localisation, functions and gene expression

Andrew J. Simkin<sup>1</sup>, Yec'han Laizet<sup>2</sup> and Marcel Kuntz<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Horticultural Sciences Department, PO Box 110690, University of Florida, Gainesville Florida 32611-0690, USA; <sup>2</sup>Génétique Moléculaire des Plantes, Université J. Fourier and CNRS (UMR5575), BP53, F-38041 Grenoble cedex 9, France

### Abstract

*Proteins referred to as plant fibrillins or plastid lipid associated proteins are widespread from cyanobacteria to higher plants, and in the latter case in diverse tissues, in association with a variety of different lipidic structures. Fibrillin was originally purified from pepper fruit and cucumber flowers where these proteins participate in the formation of fibrillar lipoprotein structures implicated in carotenoid storage. Further studies have suggested that fibrillin, and its homologues, play a role in stabilizing the photosynthetic thylakoid membranes, contributing to the remarkable tolerance of the photosynthetic apparatus to stress condition. Evidence is also available for the association of these proteins to various lipid globules under non-stressed*

*conditions preventing plastoglobule coalescence. Furthermore, proteins of the fibrillin family can influence plant development. In the current state of our knowledge, these proteins seem to be involved in the stabilisation of lipid structures in an aqueous environment. Expression of these genes differs from plant species to plant species but seems consistent with the functions of the proteins: a constitutive and low level in most tissues, an induction in green tissues under photooxidative stress conditions (at least in Solanaceae) and a strong up-regulation in fruit and flowers in some plants.*

## Introduction

Protein-lipid interactions are essential to assemble and maintain biological lipidic structures. Biological bilayer membranes are obvious examples, but proteins are also found in other protein bodies (Chiba *et al.* 2003) including poorly organized structures such as oleosomes (Athenstaed and Daum 2003; Chinnasamy *et al.* 2003; Schumann *et al.*, 2003). Plant organelle-located plastoglobules (Kessler *et al.* 1999; Kaup *et al.* 2002) provide an example for the latter type. These globules have a varying biochemical composition but are usually thought to serve as lipid reservoirs in plastids. On the other hand, plants also contain highly organized non-bilayer lipid structures which provide interesting model to study lipid / protein interactions. This is the case for "fibrils", the tubular sub-structures found in a specialized plastid type (chromoplast) in some plants and which store large quantities of carotenoids (Emter *et al.* 1990). They are an example of a lipoprotein structure with high protein content. Evidence from biochemical and structural studies indicates that the shape of lipid-containing structures is governed by their protein-to-lipid ratio. High protein content allows the formation of membranes or thread-like structures, while globular structures are characterized by a lower protein-to-lipid ratio (Sitte *et al.* 1980). However, the nature and properties of lipid associated proteins is also of primary importance.

Here we focus on a protein class, that we term plastid lipid associated proteins of the fibrillin type and summarize a decade of research in this field, since their first molecular characterization in chromoplast fibrils (Deruère *et al.* 1994a). However, it is now clear that these proteins also fulfil a role in chloroplast resistance to stress, as well as a more general role in relation to development. These proteins most likely evolved from a prokaryotic ancestral form and represent a particularly interesting example of lipid interacting proteins. It illustrates that, beyond lipid associated enzymatic proteins, structural proteins and their exact role needs to be better understood.

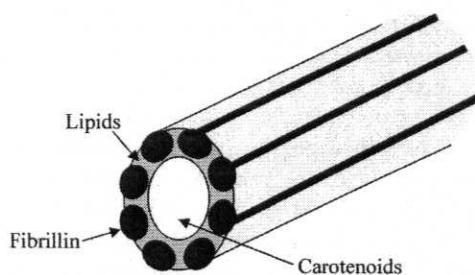
## A lipid associated protein in chromoplast fibrils

Chromoplasts are a specialized class of plastids, often derived from photosynthetic chloroplasts, in some plant organs such as fruit and flowers, and which accumulate carotenoid pigments to fulfil a role as attractant for animal assisted pollination and seed dispersal. Electron microscopy studies have classified chromoplasts according to their carotenoid storing sub-structures (Sitte *et al.* 1980). These include crystalline, globular, membrane and fibrillar structures as well as sub-classes. These structures form concomitantly with carotenoid accumulation, which is also dependent on lipid synthesis, and are influenced by their protein-to-lipid ratio. Early studies proposed a model for the structure of chromoplast fibrils (Winkenbach *et al.* 1976; Knoth *et al.* 1986; Emter *et al.*

1990), which was slightly revised when the major protein in fibrils was molecularly characterized from pepper fruit chromoplasts (Deruère et al. 1994a). Figure 1 presents the current view of fibrils structure and the location of this "fibrillin" protein. Originally, this protein was considered "chromoplast-specific". It likely corresponds to the ChrB protein (for chromoplast-specific) observed by Price and coworkers in red pepper fruit (see Price et al. 1995 and references therein). It also corresponds to a protein confusingly called ChrC and identified in the chromoplasts (fibrillar type) of cucumber flowers (Smirra et al. 1993; Vainstein et al. 1994) where it accumulates in parallel to carotenoids.

The *fibrillin* gene is located in the nucleus and was first characterized in pepper: its transcript and protein accumulates during chloroplast to chromoplast differentiation in the fruit, concomitant to carotenoid accumulation (Deruère et al. 1994a,b). However, induction of *fibrillin* expression precedes the visible onset of the maturation process (Deruère et al. 1994b). A single fibrillin gene was detected by Southern hybridization in the pepper genome (Pozueta-Romero et al. 1997). Transgenic tomato plants generated by *Agrobacterium* mediated transformation and carrying the pepper *fibrillin* promoter region fused to the GUS reporter gene, showed a similar expression pattern in tomato (which also forms chromoplasts in fruit but not of the fibrillar type) (Kuntz et al. 1998). This study points to events linked to the cellular redox balance (supposedly modified during fruit ripening) as the main trigger for gene induction.

The expression of the *chrC* gene in *Cucumis sativus* cv. carollas petals is also regulated at the levels of transcription in a tissue specific fashion. The transcript is barely detectable at anthesis, but increases during flower development (Vishnevetsky et al. 1996). The *chrC* transcript was not detectable in the leaves. Furthermore, gibberellic acid leads to a strong and rapid, dose dependant increase in the abundance of the *chrC* transcript in the flowers. Treatment with paclobutrazol, an inhibitor of gibberellic acid synthesis, led to a decrease in *chrC* transcript abundance (Vishnevetsky et al. 1997).



**Figure 1. Model of chromoplast fibril (not to scale).** The fibril core is occupied by fatty acid-esterified carotenoids which form a nematic liquid mesophase. The carotenoid esters are held together by hydrophobic effects and tend to point in the same direction. Carotenoids also interact directly with the lipid layer (phospholipids and galactolipids) whose polar heads in turn interact with fibrillin molecules, which are more directly in contact with the plastid aqueous phase. Fibrillin is a polypeptide with a molecular weight of approximately 32 to 35kDa depending on the studies.

Furthermore, ethylene treatment induces a strong and rapid decrease in transcript levels in flower corollas. A decrease in *chrC* transcript levels is also observed after treatment with 2-(chlorophenylthio)-triethylamine (CPTA, an inhibitor of carotenoid cyclisation) or abscisic acid (Vishnevetsky *et al.* 1997, 1999). These findings were confirmed when cucumber plants were bombarded with a construct carrying the *chrC* promoter region fused to the GUS reporter gene (Vishnevetsky *et al.* 1999).

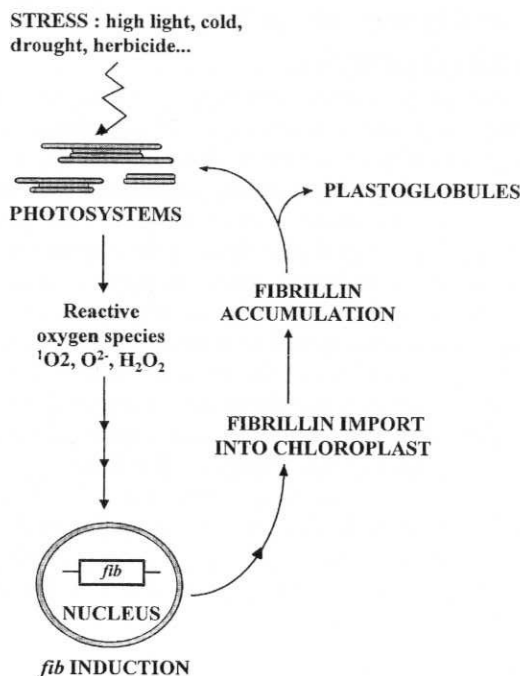
Taken together, these studies consistently point to a role of "fibrillin" in the assembly of chromoplast fibrils in various systems but show that the regulatory mechanisms governing gene expression involve different pathways in different organs.

## Accumulation of fibrillin and related proteins under stress conditions

In the late 90s, the concept of chromoplast-specificity of fibrillin was abandoned. Chen *et al.* (1998) demonstrated that the fibrillin transcript and protein accumulate in the leaves of wounded or drought-stressed pepper plants. Furthermore they also noted that the pepper *fibrillin* promoter is induced in transgenic tobacco leaves under stress conditions, as well as by treatment with the herbicide paraquat (methyl-viologen). It has also been shown that this induction requires the presence of light and oxygen (Figure 2). The role of photooxidation in the induction of the *fibrillin* promoter was confirmed in transgenic tomato leaves by a direct treatment with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and by various abiotic stresses, which induce the production of reactive oxygen species in the plastidial compartment (Manac'h and Kuntz, 1999). Langenkämper *et al.* (2001) also showed that *fibrillin* is induced by various biotic stresses.

Using potato (*Solanum tuberosum*) as a model system for accumulation of chloroplast drought stress-related protein (CDSPs), Pruvot *et al.* (1996a) observed two such proteins whose accumulation is also triggered by stresses (Pruvot *et al.* 1996b) such as salinity and low temperature. Subsequently, Gillet *et al.* (1998) demonstrated that the single gene encoding one of these proteins (CDSP34, which refers to its apparent MW) is homologous to the pepper *fibrillin* gene. Various data indicate that the expression of this gene is induced in response to diverse stresses, such as exposure to intense light, water deficit (70% of relative water content) or spraying with ABA over 10 days (Gillet *et al.* 1998). Furthermore, a strong accumulation of *cdsp34* transcript and protein has been observed in potato leaves submitted to several treatments inducing photo-oxidative stress (strong light, low temperature, ionising radiation or spraying with methyl-viologen; Langenkämper *et al.* 2001). The induction of the *cdsp34* gene and accumulation of mRNA in potato leaves treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Langenkämper *et al.* 2001) indicates that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> may have a role in the signalling pathway, thanks to its capacity to diffuse through membranes.

Monte *et al.* (1999) demonstrated that *cdsp34* (renamed *c40.4*) exists as a single copy in the genome of *S. demissum*. They observed a 10 to 20 times increase in *c40.4* transcript levels in the leaves during tuberization. It was also shown that transcript levels in the leaves increased during the day and decrease after being returned to darkness, suggesting that gene expression is directly regulated by light (Monte 1999). It should also be mentioned that unlike *cdsp34* the pepper *fibrillin* gene is only marginally repressed in darkness (Simkin *et al.* 2003).



**Figure 2. Model of the regulatory mechanisms leading to induction of the fibrillin gene in pepper leaves under stress condition.** Various stresses can cause over-production of reactive oxygen species by thylakoids in the light. When these excess reactive oxygen species are not eliminated by the normal pathway (ascorbate peroxidase, catalase, ...) they trigger a yet unidentified signal to be sent to the nucleus, which in turn induces transcriptionally the fibrillin gene. The fibrillin protein precursor is synthesized on cytosolic ribosomes and then post-translationally imported into chloroplasts, where the transit peptide, with a molecular weight of approximately 7kDa, is cleaved off. From a mainly soluble form, the mature fibrillin can be mobilized by stress to the thylakoids by a mechanism which is still unknown. Fibrillin can also be found to be associated to some extent to plastoglobules, even under non-stressed conditions.

One can also mention that expression of the *fibrillin* gene in pepper leaves does not parallel the expression of carotenoid biosynthetic genes, the latter being repressed in darkness and not induced under photooxidative stress triggered by inhibition of carotenogenesis (while *fibrillin* is induced; Simkin et al. 2000).

Stress related accumulation of fibrillin / CDSP34 proteins seems widespread since Langenkämper et al. (2001) have shown that homologues accumulate in the leaves of plants such as tobacco, tomato, *Arabidopsis*, barley and *Craterostigma plantagineum* under conditions of water deficit.

Taken together, these studies consistently point to a role of "fibrillin" in stressed chloroplasts, which appears unrelated to carotenoid accumulation. The induction of this nuclear gene appears mechanistically linked to the production of reactive oxygen species in plastids (see Figure 2).

## Physiological evidence of a stress-related function for fibrillin and related proteins

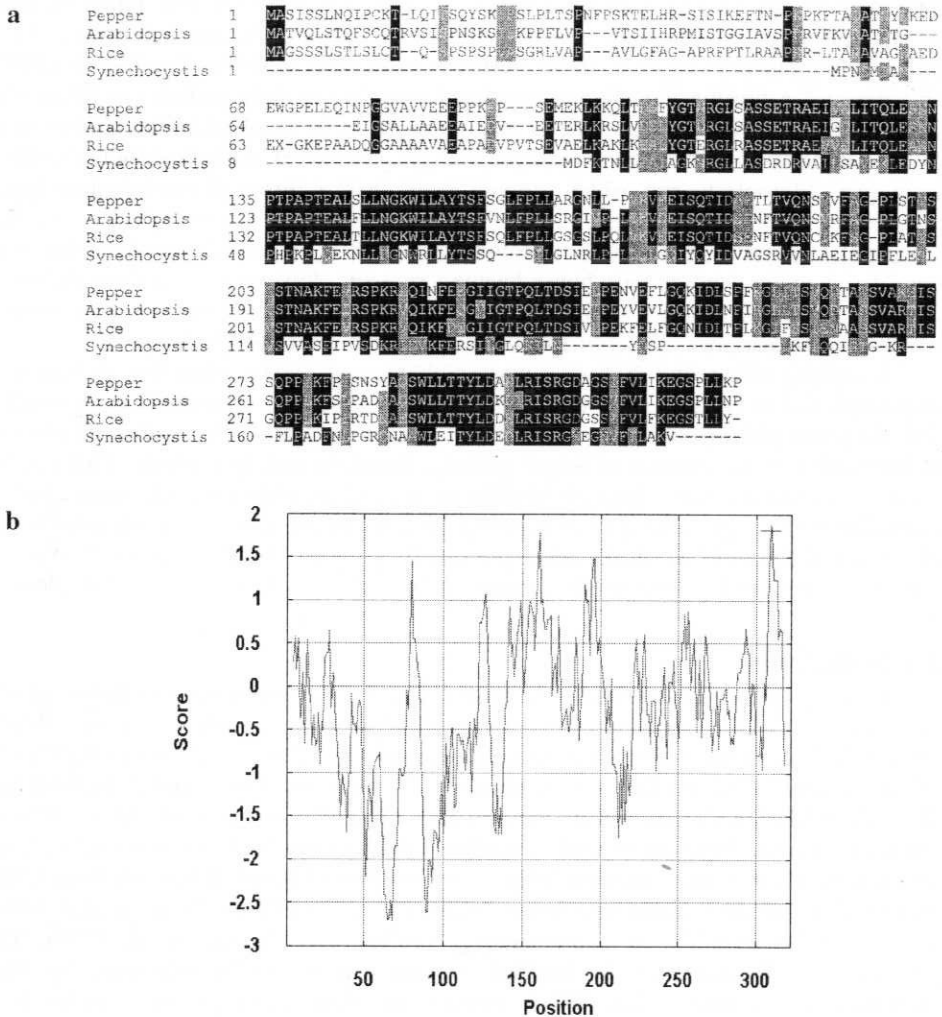
Antisense plants with reduced levels of *fibrillin / c40.4* transcripts showed a stunted growth, decreased tuber yield and reduced values of non-photochemical quenching of chlorophyll *a* fluorescence (Monte *et al.* 1999). These authors suggested a functional role in photosynthesis, by modulating photosynthetic efficiency and dissipation of excess absorbed light energy. On the other hand, over-expression of the pepper *fibrillin* gene in transgenic tobacco leads to accelerated plant development (plants reach the flower stage earlier) and enhanced shooting of lateral stems, as well as some level of improved resistance to water stress (Rey *et al.* 2000). It has been suggested that the fibrillin protein fulfil an important role in plant development in relation to environmental constraints.

The sub-chloroplastic localization of the protein differed in the above-mentioned papers. While Monte *et al.* (1999) found the protein associated with the photosynthetic antenna; Rey *et al.* (2000) found that both the over-expressed and the native proteins were located in the thylakoid stromal lamellae. The latter location is in line with previously reported data (Eymery and Rey, 1999; Pruvot *et al.* 1996a). It should be mentioned that a role in relation to stress is also shown by Rey *et al.* (2000), who showed that the over-expressed protein is mobilized from a predominantly stromal location in non-stressed plants to become predominantly associated with the thylakoid membranes under drought stress.

## A more general role ?

*Arabidopsis thaliana* and *Brassica rapa* have 3 genes clearly related to *fibrillin* (Kim *et al.* 2001), the first two being more closely related to the protein known in Solanaceae (see Figure 3). All three proteins have been found in the thylakoid proteome from *Arabidopsis* (Peltier *et al.* 2000; 2002). In *Brassica rapa*, their transcripts are ubiquitous in most organs (Kim *et al.* 2001), although gene1 transcript is more prevalent: It accumulates to a high level in the anthers, sepals, leaves, seeds and fruits pericarp, but is weakly detected in the petals. By contrast gene2 transcript accumulates preferentially in the petals and is detected at very low levels in the remaining organs. The third gene transcript accumulates at very low levels in all the organs mentioned above as well as in the pistil and the flowers. In *B. rapa*, the expression of these genes is also affected by environmental conditions (Kim *et al.* 2001) and stress, being slightly induced by some (wounding, light stress) and repressed by others (drought, ozone). This repression by drought may not necessarily be contradictory to the work performed in Solanaceae (Chen *et al.* 1998; Gillet *et al.* 1998; Rey *et al.* 2000) since a strong water deficit (56% relative water content) also leads to a decrease in the accumulation of the transcript in potato (Gillet *et al.* 1998): it is possible that different stresses are perceived with different intensities in different plants. Although puzzling at this stage, these results can be interpreted as a general role of these proteins, possibly involving a specific one for each member of the family.

Fibrillin family transcripts have been detected in flowers, leaves and fruit of mandarins (*Citrus unshiu*) in a rather ubiquitous manner (Moriguchi *et al.* 1998), which does not support an exclusive role in carotenoid sequestration and/or stress. A fibrillin protein homologue has been identified in the genomic sequence of the cyanobacteria



**Figure 3. Structure of the fibrillin protein. A.** Alignment of fibrillin and related polypeptide precursors from pepper (*Capsicum annuum*), *Arabidopsis thaliana*, rice (*Oryza sativa*) and the cyanobacterium *Synechocystis*. In pepper the precursor is cleaved after glutamine59. The alignment with the cyanobacterial polypeptide and the poor conservation of the N-terminal end of the mature polypeptides (up to approximately lysine99 from plants suggest that the N-terminal region is not important for fibrillin function. Conserved residues are boxed in black. Residues which are substituted by equivalent amino acids are boxed in grey. **B.** Kyte and Doolittle hydropathy plots of the pepper fibrillin polypeptide using a window of 9 amino acids. The fibrillin type proteins may be anchored to the lipid phase via the 2 short hydrophobic domains flanking the more hydrophilic domain spanning positions 150 to 200 approximately, but this remains to be experimentally confirmed. A similar profile is also found for the other plant polypeptides and to some extent for the cyanobacterial polypeptide.

*Synechocystis* sp. (Kaneko 1996). Fibrillin related proteins were also found in lipid bodies within elaioplasts from tapetal cells, which provide the nutrients required for pollen development (Ting *et al.* 1998; Hernandez-Pinzon *et al.* 1999). Smith *et al.* (2000) also detected a fibrillin homologue associated with diverse lipid particles in *Phaseolus vulgaris* chloroplasts. These particles are suggested to be involved in the normal turnover of thylakoids. A fibrillin-homologue was also identified in plastoglobules isolated from pea chloroplasts and which contain more than a dozen distinct protein types (Kessler *et al.* 1999). A certain level of fibrillin association to plastoglobules is also suggested in pepper leaves (Pozueta-Romero *et al.* 1997) and in this report fibrillin was considered to be a ubiquitous house-keeping protein. However, the authors failed to consider the possibility of a stress related induction in plants grown in greenhouse, which in our experience is readily obtained in this species for the *fibrillin* gene.

A striking effect of fibrillin on plastoglobules was shown when this protein was over-expressed in tobacco (Rey *et al.* 2000). In this case, over-expressers show smaller and clustered plastoglobules in non-stressed leaf chloroplasts, the number of clusters being similar to the number of larger globules found in wild-type plants. This can be viewed as evidence for a role of fibrillin in preventing globules coalescence and in maintaining them in some sort of topological association. This is reminiscent to the clustering of chromoplast fibrils, which are usually grouped with their axis being parallel and cross-links being visible in electron microscopic cross section (Deruère *et al.* 1994a).

## Conclusions

Proteins of the fibrillin family are widespread from cyanobacteria to higher plants, and in the latter case in diverse tissues, in association with a variety of different lipidic structures. One of their functions (demonstrated only in plants accumulating high levels of carotenoids) is the storage of these pigments. However, it is important to mention that the pepper fibrillin protein and its equivalent in cucumber chromoplasts have not been shown to directly bind carotenoids. In other words, to the best of our knowledge, no physical interaction with carotenoids has ever been demonstrated. It has only been found that fibrillin and carotenoids are present together in isolated fibrils (Deruère *et al.* 1994) or in a large complex on non-denaturing protein gels (Smirra *et al.* 1993). The arrangement of carotenoids in fibrillar structures seems to be influenced by their esterification by fatty acids. When brought in close topology by a polar lipid environment, carotenoid esters may self-assemble into liquid crystals of nematic type (Sitte *et al.*, 1980), which thanks to their chirality can be studied by circular dichroism spectroscopy (Zsila *et al.* 2001). In these fibrillar structures, fibrillin is in contact with polar lipids and allows these structures to remain in suspension in an aqueous environment (Deruère *et al.* 1994a).

A second demonstrated function for fibrillins is related to stress. Under natural conditions, plants are often exposed to stresses such as water deficit (see Ramanjulu and Bartels 2002). Water plays an essential role in cellular metabolism and a drop in its availability has an effect on photosynthetic processes, solute transport and growth (see Teraza *et al.*, 2002). These stresses are known to provoke the accumulation of damaging reactive oxygen species. Upon associating to thylakoids, fibrillins may contribute by a yet unknown mechanism to the remarkable tolerance of the photosynthetic apparatus to stress conditions (Tourneux and Peltier 1995).

Thirdly, fibrillin homologues have also been found in association with plastid lipidic structures in numerous cases which are not obviously related to stress (see above). In addition, over-expression of the pepper fibrillin influences tobacco development under mild environmental conditions (Rey et al. 2000).

We propose that proteins of the fibrillin family are originally involved in the stabilisation of lipid structures in an aqueous environment. Evolution may have selected them as contributors for protection against stresses (in parallel with other protective mechanisms) in many higher plants, and later in a few plants for carotenoid storage in lipoprotein structures.

## References

1. Athenstaedt, K. and Daum, G., 2003, *J. Biol. Chem.* 278, 23317-23323
2. Chen, H.C., Klein, A., Xiang, M., Backhaus, R.A. and Kuntz, M., 1998, *Plant J.*, 14, 317-326.
3. Chiba, A., Ishida H., Nishizawa N.K., Makino, A. and Mae, T. 2003, *Plant Cell Physiol.* 44, 914-921.
4. Chinnasamy, G., Davis, P.J. and Bal, A.K. 2003, *J. Plant Physiol.*, 160, 355-365
5. Deruère, J., Bouvier, F., Steppuhn J., Klien, A., Camara, B., and Kuntz, M. 1994a, *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 199(3), 1144.
6. Deruère, J., Römer, S., d'Harlingue, A., Backhaus, R.A., Kuntz, M., and Camara, B. 1994b, *Plant Cell*, 6, 119-133.
7. Emter, O., Falk, H. and Sitte, P., 1990, *Protoplasma*, 157, 128-135.
8. Eymery, F., and Rey, P. 1999, *Plant Physiol. Biochem.*, 37, 305.
9. Gillet, B., Beyly, A., Peltier, G., and Rey, P. 1998, *Plant J.*, 16, 257.
10. Hernández-Pinzón, J., Ross, J.H.E., Barnes, K.A., Damant, A.P., and Myrphy, D.J. 1999, *Planta*, 208, 588.
11. Kaneko, T. et al., 1996, *DNA Res.*, 3, 109-136
12. Kaup, M.T., Froese, C.D. and Thompson, J.E. 2002, *Plant Physiol.* 129, 1616-1626.
13. Kessler, F., Schnell, D., and Blobel, G. 1999, *Planta*, 208, 107.
14. Kim, H.U.K., Wu, S.S.H., Ratnayake, C. and Huang, H.C., 2001, *Plant Physiol.* 126, 330-341.
15. Knoth, R., Hansmann, P., and Sitte, P. 1986, *Planta*, 168, 167.
16. Kuntz, M., Chen, H.C., Simkin, A.J., Römer, S., Shipton, C.A., Drake, R., Schuch, W., and Bramley, P.M. 1998, *Plant J.*, 13: 351.
17. Langenkämper, G., Manac'h, N., Broin, M., Cuiné, S., Becuwe, N., Kuntz, M., and Rey, P. 2001, *J. Exp. Botany.*, 52, 1545.
18. Manac'h, N., and Kuntz, M. 1999, *Plant Physiol. Biochem.*, 37(11), 859.
19. Moriguchi, T., Kita, M., Endo-Inagaki, T., Ikoma, Y., and Omura, M. 1998, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1442, 334.
20. Monte, E., Ludevid, D., and Prat, S. 1999, *Plant J.*, 19: 399.
21. Peltier, J.B., Friso, G., Kalume, D.E., Roepstorff, P., Nilsson, F., Adamska, I. and van Wijk, K.J., 2000, *Plant Cell*, 12, 319-342.
22. Peltier, J.B., Emanuelsson, O., Kalume, D.E., Ytterberg, J., Friso, G., Rudella, A., Liberles, D.A., Söderberg, L., Roepstorff, P., von Heijne, G. and van Wijk, K.J., 2002, *Plant Cell*, 14, 211-236.
23. Pozueta-Romero, J., Rafia, F., Houlmé, G., Cheniclet, C., Carde, J.P., Schantz, M.L., and Schantz, R. 1997, *Plant Physiol.*, 115, 1185.
24. Price, C.A., Hadjeb N., Newman, L.A. Reardon, E.M. 1995, *Meth. Cell Biol.*, 50, 189.
25. Pruvot, G., Cuiné, S., Peltier, G., and Rey, P. 1996a, *Planta*, 198, 471.
26. Pruvot, G., Massimino, J., Peltier, G., and Rey, P. 1996b, *Physiol. Plant*, 97, 123.
27. Ramanjulu, S. and Bartels, D., 2002, *Plant Cell Environ.*, 25, 141-151.

28. Rey, P., Gillet, B., Römer, S., Eymery, F., Massimino, J., Peltier, G., and Kuntz, M. 2000, *Plant. J.*, 21, 483.
29. Schumann, U., Wanner, G., Veenhuis, M., Schmid, M. and Gietl, C. 2003, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 9626-9631.
30. Simkin, A.J., Breitenbach, J., Kuntz, M., and Sandmann, G. 2000, *J. Agric. Food Chem.*, 48, 4676.
31. Simkin, A.J., Changfu, Z., Kuntz, M., and Sandmann, G. 2003, *J. Plant Physiol.*, 160:(5) 439.
32. Sitte P, Falk H and Liedvogel B. 1980. In *Pigments in plants*. 2nd Edition (FC Czygan, Ed), G. Fischer, Stuttgart, New York, pp 117.
33. Smirra, I., Halevy, A.H. and Vainstein, A., 1993, *Plant Physiol.*, 102, 491-496.
34. Smith, M.D., Licatalosi, D.D., and Thompson, J.E. 2000. *Plant Physiol.*, 124, 211.
35. Tezara, W., Mitchell, V., Driscoll, S.P. and Lawlor, D.W., 2002, *J. Exp. Bot.*, 53, 1781 - 1791.
36. Ting, J.T., Wu, S.S., Ratnayake, C., Huang, A.H. 1998, *Plant J.*, 16(5):541.
37. Tourneux, C., and Peltier, G., 1995, *Planta*, 195, 570-577.
38. Vainstein, A., Halevy, A.H., Smirra, I., and Vishnevetsky, M., 1994, *Plant Physiol.*, 104, 321-326.
39. Vishnevetsky, M., Ovadis, M., Itzhaki, H., Levy, M., Libal-Weksler, Y., Adam, Z., and Vainstein, A. 1996, *Plant J.*, 10, 1111.
40. Vishnevetsky, M., Ovadis, M., Itzhaki, H., and Vainstein, A. 1999, *Plant J.*, 20, 423.
41. Vishnevetsky, M., Ovadis, M., Zuker, A., and Vainstein, A. 1997, *J. Biol. Chem.*, 272, 24747.
42. Winkenbach, F., Falk, H., Liedvogel, B., and Sitte, P., 1976, *Planta*, 128, 23-28
43. Zsila, F., Deli, J. and Simonyi, M., 2001, *Planta*, 213, 937-942.

## **Résumé :**

La fibrilline est une protéine majeure des structures fibrillaires de stockage des caroténoïdes dans les chromoplastes de poivron et elle semble être impliquée lors de réponses de la plante à des stress environnementaux. Afin de mieux comprendre la fonction de cette protéine, nous avons étudié ses homologues chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*.

Nous avons identifié 13 gènes codant des membres de cette famille de protéines et nous les avons classés en 10 sous-familles. Sachant que des protéines de type fibrilline sont également présentes chez d'autres plantes et chez des cyanobactéries, nous proposons un schéma de l'évolution de cette famille de gènes dont les membres présents chez les plantes seraient issus de la multiplication de gènes ancestraux qui présentent des homologues chez les cyanobactéries.

L'expression des 13 gènes de type fibrilline d'*Arabidopsis thaliana* est régulée différemment suivant les organes ou les conditions environnementales. Nous avons concentré notre étude sur la sous-famille 1-2 qui est la plus proche de la fibrilline de poivron identifiée à l'origine. Les 3 gènes présentent une régulation développementale avec une expression conséquente dans les feuilles et les fleurs. L'accumulation de la protéine FIB1b dans ces organes suggère une régulation transcriptionnelle de *FIB1b*. Les gènes *FIB1a* et *FIB1b* sont également induits lors de stress environnementaux, comme l'est le gène de la fibrilline de poivron, alors que le gène *FIB2* est constitutivement exprimé.

L'implication des fibrillines dans la réponse au stress a été étudiée par l'analyse de plantes ARNi réprimant l'expression des gènes de la sous-famille *FIB1-2*. Ces plantes montrent une croissance retardée, mais peu de modifications en réponse à un stress.

Afin de mieux comprendre la voie de régulation qui conduit à l'induction du promoteur du gène de la fibrilline de poivron en réponse à un stress, nous avons développé une approche de mutagenèse. Pour cela, nous avons produit et criblé une population de mutant EMS d'*Arabidopsis thaliana* comportant une construction dans laquelle deux gènes rapporteurs (*LUC*, *GUS*) sont sous le contrôle du promoteur de la fibrilline de poivron. Des mutants, dont l'activité des gènes rapporteurs est altérée, ont été isolés.

## **Abstract :**

Fibrillin is one of the major proteins in fibrillar carotenoid storage structures of bell pepper chromoplasts. In order to understand better the function of this protein, we studied the fibrillin homologues in the *Arabidopsis thaliana* plant model.

We have identified 13 genes encoding members of this family in *Arabidopsis thaliana* which form 10 groups. As proteins of the fibrillin type are also present in other plants and in cyanobacteria, we propose that during evolution, plants multiplied their fibrillin genes from an ancestral gene that still has a relative in some cyanobacteria.

In *Arabidopsis thaliana*, the 13 *FIB* genes show differential expression when stress- or organ-related expression is examined. We focused on the *FIB1-2* subfamily which is the closest to the bell pepper fibrillin that was first characterised. *FIB1-2* subfamily genes show a developmental regulation with a good induction in leaves and in flowers. The FIB1b protein accumulates in these organs, suggesting a transcriptional regulation. *FIB1a* and *FIB1b* are also induced under stress conditions like the bell pepper *FIB* gene, whereas *FIB2* is more constitutively expressed.

The involvement of the fibrillin gene in stress response has been studied in fibrillin RNAi plants which repress several members of this gene family. These plants showed a growth delay, but no drastic modification in response to stress conditions.

Finally, we have developed a mutagenesis approach in order to dissect the regulation pathway leading to the bell pepper *FIB* gene expression. We have produced and screened an EMS mutagenised *Arabidopsis thaliana* population carrying a double reporter gene construct (*LUC*, *GUS*) driven by the bell pepper fibrillin promoter. We isolated mutants altered in the regulation of the fibrillin promoter in flowers.