HAL
open science

Caractérisation d'une nouvelle famille de protéines susceptibles d'interagir avec les NEP plastidiales

Jacinthe Armanda Azevedo

To cite this version:

Jacinthe Armanda Azevedo. Caractérisation d'une nouvelle famille de protéines susceptibles d'interagir avec les NEP plastidiales. Biochimie [q-bio.BM]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2005. Français. NNT : . tel-00011722

HAL Id: tel-00011722

https://theses.hal.science/tel-00011722v1

Submitted on 3 Mar 2006

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.

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

THESE

Présentée par

Jacinthe AZEVEDO

Pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER (GRENOBLE I)

Discipline : Biologie

Caractérisation d'une nouvelle famille de protéines susceptibles d'interagir avec les NEP plastidiales

Directeurs de thèse : Silva Lerbs-Mache, Florence Courtois et Thierry Lagrange

Soutenue le 28 Octobre 2005, devant la commission d'examen :

M. H. GEISELMANN	Président
Mme L. DROUARD	Rapporteur
M. DB STERN	Rapporteur
Mme S. LERBS-MACHE	Directrice de thèse
Mme F. COURTOIS	Co-directrice de thèse
M. T. LAGRANGE	Co-directeur de thèse

Thèse préparée dans l'équipe « Transcription du génome plastidial et division des plastes » de l'UMR 5575 « Laboratoire Plastes et Différenciation celluaire »

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

Remerciements

Je tiens à remercier tout d'abord les membres du jury, et en particulier Mme L. Drouard et M. DB Stern pour avoir pris le temps d'évaluer mon travail. Je remercie également M. H. Geiselmann de présider ce jury, ainsi que mes trois co-directeurs de thèse pour m'avoir soutenue depuis mon année de DEA.

Je remercie tout particulièrement Mme S. Lerbs-Mache de m'avoir accueillie dans son laboratoire pour effectuer mon stage de DEA et pour m'avoir fait confiance tout au long de mon travail. J'ai découvert la recherche dans ce laboratoire. Mon goût pour la recherche ainsi que tous les « à côtés » (environnements de la recherche et humain) vraiment appréciables m'ont conduit à rester pour effectuer une thèse. Je remercie Thierry et Dominique qui m'ont guidée et aidée lors de ces premiers pas. J'ai appris de Thierry à garder mon esprit ouvert et une autonomie en me plongeant régulièrement dans la littérature scientifique pour me forger mes propres opinions. Grâce à Thierry, j'ai également connu Dominique, une « magicienne » de la biologie végétale et moléculaire, qui m'a également familiarisée avec l'ADN et les plantes. Je remercie également Florence qui a pris le relais au jour le jour et qui, avec Hélène, m'ont accueilli dans leur bureau. Le plus beau bureau du CERMO à mon avis, chaleureux et bien « vert », bref, un bureau de femmes ! Florence m'a appris toutes mes bases en biochimie et m'a grandement aidée et soutenue dans la phase finale de cette thèse, je la remercie énormément. Son dynamisme et son dévouement m'ont beaucoup inspirés. Je remercie également très fort Hélène, pour toute son humanité, sa chaleur, son rire et sa grande expérience. Je la remercie pour son soutien apporté pendant quelques petits moments délicats. Je remercie tous les thésards, et en particulier Emilie, Wafa, Mohamed, et JJ (bien sûr !) pour la bonne ambiance de travail, une entente et une entraide vraiment très appréciables. Je remercie Denis et Joël pour leurs éclats de rires et leur gentillesse. Jean-pierre et Anne-Marie pour tous leurs dépannages et leur joie de vivre. Je remercie également tous les membres du laboratoire encore présents ou partis vers d'autres horizons, avec qui j'ai fait un petit bout de chemin, je pense notamment à Annick, Sayed, Abdel-Fatah, Yec'han, Andy, Eve-Marie, Pierre et Mireille. Je remercie également Régis Mache pour tous ses conseils et pour m'avoir permis de finaliser mes résultats lors de ma dernière année de thèse.

Je finis en remerciant les personnes qui ont certainement le plus contribué à ce travail et qui m'ont permis d'arriver là, mon petit cercle familial, et en particulier ma maman, mon frère, mes grands parents, mon oncle, mon mari Jean-Jacques ainsi que d'autres personnes chères à mon cœur. Un remerciement spécial à Jean-Jacques, qui a passé sa première nuit blanche au labo par ma faute, et à Florence, sans qui j'aurais eu beaucoup plus de difficultés à finir cet interminable manuscrit.

SOMMAIRE

SOMMAIRE 1

Liste des abréviations 10

INTRODUCTION 11

I. Origine des organites 12

I.A. Endosymbioses en série 12

I.A.1 Découverte des organites intracellulaires : les symbiotes 12

I.A.2 Origine des mitochondries 13

I.A.3 Origine des plastes 14

I.B. Des symbiotes aux organites actuelles 14

I.B.1 « Eucaryogénèse » ou genèse de la cellule eucaryote, chez les végétaux 15

I.B.1.1 Transfert des gènes au noyau 15

II. Expression du génome plastidial 18

II.A. Organisation et structure 18

II.A.1 Organisation du génome plastidial 18

II.A.2 Dynamique du plastome 19

II.A.3 Organisation des gènes plastidiaux 20

II.A.3.1 Contenu du plastome 20

II.A.3.2 Organisation de type procaryotique 20

II.B. Transcription du plastome : appareil transcriptionnel plastidial de type procaryotique, PEP 20

II.B.1 Spécificité ou redondance des SLF ? 21

II.B.2 Mise en évidence d'une seconde activité ARN polymerase plastidiale chez les plantes supérieures 22

III. Les ARN polymérases monomériques NEP chez les eucaryotes 23

III.A. Origine évolutive des NEP chez les eucaryotes 23

III.B. Système transcriptionnel de type phagique 27

III.B.1 Comparaison des ARN polymerase bactériophagiques avec leurs homologues 27

III.B.1.1 Mécanismes de transcription de l'ARN polymérase T7 27

III.B.1.1.1. Structure de la T7 ARN polymérase 27

III.B.1.1.2. Mécanisme d'initiation de transcription 29

III.B.2 Comparaison du fonctionnement des enzymes de type phagique et des NEP 31

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

III.B.2.1 Propriétés des ARN polymerases mitochondriales de S.cerevisiae (RPO41) et de l'Homme (POLRMT) 33
III.B.2.2 Mécanismes d'initiation de la transcription des génomes mitochondriaux chez S. cerevisiae et l'Homme 34
III.B.2.2.1. Structure des génomes mitochondriaux de *S. cerevisiae* et de l'Homme 34
III.C. Facteurs de sélectivité associés aux ARN polymérases mitochondriales de la levure *S. cerevisiae* et l'Homme 35
III.C.1 Facteurs de type MTFB (Mitochondrial Transcription Factor B) 35
III.C.2 Facteur de spécificité MTF1 chez *S. cerevisiae* 37
III.C.3 Facteurs de transcription TFBM chez l'Homme 37
III.C.4 Facteur de transcription TFAM dans la mitochondrie humaine 38
III.C.4.1 Modèles d'initiation de la transcription des génomes mitochondriaux 39
III.C.4.1.1. Chez *S. cerevisiae* 39
III.C.4.1.2. Chez l'Homme 39
III.D. Les ARN polymérases NEP des végétaux supérieurs 41
III.D.1 Promoteurs NEP dépendants 41
III.D.1.1 Dans les mitochondries 41
III.D.1.2 Dans les plastes 42
III.D.2 Facteurs de transcription associés aux NEP chez les végétaux 43
***MATERIEL ET METHODES* 47**
***I. Méthodes d'analyse des acides nucléiques* 47**
I.A. Extraction rapide d'ADN génomique à partir de feuilles d'*A . thaliana* : criblage de mutants par PCR 47
I.B. Extraction des ARN totaux 47
I.B.1 Préparation d'ARN totaux : application, « northern blot » 47
I.B.2 Purification rapide d'ARN : criblage rapide pour RT-PCR 48
I.C. Méthode de dosage et de contrôle de la qualité des ARN totaux 49
I.D. Méthodes de séparation des acides nucléiques par électrophorèse 49
I.D.1 Séparation de fragments ADN sur gel d'agarose 49
I.D.2 Electrophorèse en conditions dénaturantes: séparation des ARN totaux 50
I.E. Méthodes de détection des ARNm 50
I.E.1 Détection des ARNm par hybridation 50
I.E.1.1 Transfert des acides nucléiques sur membrane 50
I.E.1.2 Préparation de la sonde ADN radioactive 50
I.E.1.3 Pré-hybridation, hybridation et lavages des membranes 50
I.E.2 Détection des ARNm par RT-PCR 51

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

I.E.2.1 Production d'ADNc par transcription inverse (ou reverse transcription, RT) 51
I.E.2.2 Amplification de fragments ADN par PCR 51

II. Techniques de clonage ***52***

II.A. Caractéristiques des vecteurs de clonage et souches réceptrices utilisées **52**
II.A.1 Vecteurs utilisés 52
II.A.1.1 Vecteurs procaryotes 52
II.A.1.1.1. Vecteur d'expression stable procaryote : 52
pBluescript II SK(-) (Stratagène) 53
II.A.1.1.2. Vecteurs d'expression et surexpression 53
II.A.1.2 procaryotiques 53
a) vecteurs pBAD/His (Invitrogen) et pBAD/thiotopo 53
b) Vecteurs pET28a et pET32a (Novagen) 53
II.A.1.3 Vecteurs navettes procaryote/ eucaryotes 54
II.A.1.3.1. Vecteur binaire EL103 54
II.A.1.3.2. Vecteur binaire : pFP101 54
II.A.2 Souches bactériennes utilisées 55
II.A.2.1 Souche réceptrice bactérienne : E. coli XL1-blue 55
II.A.2.2 Souches d' E. coli TOP 10 (Invitrogen) 55
II.A.2.3 Souches d'E. coli BL21 (Novagen) 55
II.A.2.4 Souche réceptrice A. tumefaciens : GV3121 55

II.B. Préparation de l'ADN **55**
II.B.1 Digestion enzymatique 56
II.B.1.1 Digestion totale 56
II.B.1.2 Digestion partielle 56
II.B.1.3 Purification d'un fragment d'ADN par élution du gel d'agarose 57
II.B.1.4 Ligation 57

II.C. Méthodes de Transformation de bactéries **57**
II.C.1 Transformation d' *E. coli* 57
II.C.1.1 Préparation de bactéries E. coli de souche XL1- blue chimiocompétentes 57
II.C.1.2 Transformation de cellules E. coli compétentes 58
II.C.1.3 Etalement de bactéries E. coli XL1 blue 58
II.C.2 Transformation d'Agrobacterium tumefaciens 58
II.C.2.1 Préparation d'agrobactéries chimiocompétentes 58
II.C.2.2 Transformation d'A. tumefaciens 58

II.D. Extraction d'ADN plasmidique : criblage des vecteurs recombinants **59**
II.D.1 Mini-préparation d'ADN plasmidique issu d'*E. coli :* protocole rapide 59
II.D.2 Mini-préparation d'ADN plasmidique issu d'*E. coli* : protocole long et propre (séquençage) 59

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

II.D.3 Mini-préparation de plasmides issus d'Agrobacterium 59
II.D.4 Midi-préparation de plasmides (*E. coli* ou *A. tumefaciens*) 60

II.E. Séquençage automatique 60

III. Méthodes d'études de la plante 61

III.A. Conditions de culture 61
III.A.1 Préparation des graines et plantes 61
III.A.1.1 Stérilisation des graines en surface: culture sur milieu gélosé 61
III.A.1.2 Stérilisation rapide de surface de graines d'A. thaliana: culture en milieu liquide 61
III.A.2 Conditions de culture *in vitro* 62
III.A.2.1 Milieux de culture 62
III.A.2.2 Conditions de culture in vitro 62
III.A.3 Conditions de culture en terre 62
III.A.3.1 Plantation 62
III.A.3.2 Conditions lumineuses en salle de culture 62
III.A.3.3 Conditions lumineuses en serre 63
III.A.4 Stockage des graines d'*A. thaliana* 63

III.B. Techniques de transformation des plantes 63
III.B.1 Techniques de transformations transitoires de cellules végétales 63
III.B.1.1 Agroinfiltration de feuilles de tabac 63
III.B.1.2 Transformation transitoire de jeunes plantules d'A. thaliana 64
III.B.2 Transformation stable d'*A. thaliana* 64

III.C. Observation d'échantillons agroinfiltrés 65

III.D. Dosage de la chlorophylle 66

III.E. Criblage de mutants d'insertion ADN-T par PCR 66

IV. Méthodes d'extraction de protéines 67

IV.A. Extraction de protéines totales 67
IV.A.1 Extraction au phénol 67
IV.A.2 Extraction rapide de protéines 67

V. Techniques de fractionnement subcellulaire 68

V.A. Chez l'épinard 68
V.A.1 Choix du matériel 68
V.A.2 Isolement de chloroplastes intacts 68
V.A.2.1 Séparation de sous compartiments plastidiaux 69
V.A.3 Isolement de mitochondries d'épinard 70
V.A.4 Chez *A. thaliana* 71

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

V.A.4.1 Purification de chloroplastes 71
V.A.4.1.1. Extraction rapide 71
V.A.4.1.2. Grande préparation de de chloroplastes intacts 72
V.A.4.1.3. Séparation des fractions membranaires et solubles plastidiales par choc osmotique 72
V.A.4.2 Extraction de noyau de cellules d'A. thaliana 73

VI. Techniques de détection des protéines ***73***

VI.A. Séparation des protéines par électrophorèse sur gel d'acrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) **73**
VI.A.1 Préparation du gel de polyacrylamide et des échantillons 73
VI.A.2 Electrophorèse en conditions dénaturantes 74

VI.B. Techniques de coloration des protéines sur gel **74**
VI.B.1 Coloration au bleu de Coomassie R250 74
VI.B.2 Coloration des protéines sur gel au nitrate d'argent 74

VI.C. Technique d'immunodétection (Burnette 1981) **75**
VI.C.1 Transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose 75
VI.C.2 Immunodétection 75

VII. Méthodes utilisées pour la caractérisation d'anticorps ***76***

VII.A. Détermination de la sensibilité des anticorps sur les peptides antigéniques : « dot blot » **76**

VII.B. Détermination de la spécificité des antisera sur protéines recombinantes **77**
VII.B.1 Production de protéines recombinantes 77
VII.B.1.1 Préparation d'extraits bruts 77
VII.B.1.2 Préparation de protéines recombinantes purifiées 77

VII.C. Purification des anticorps par chromatographie d'affinité sur peptides **78**

VIII. Méthodes d'étude des protéines ***78***

VIII.A. Analyse de la topologie membranaire **78**
VIII.A.1 Lavages de thylacoïdes intacts d'épinard 78
VIII.A.2 Traitement de thylacoïdes intacts par la thermolysine 79

VIII.B. Méthodes d'analyse des protéines **79**
VIII.B.1 Solubilisation de complexes membranaires 79
VIII.B.2 Séparation des protéines par chromatographie d'exclusion 80
VIII.B.2.1 Caractéristiques et préparation de la colonne 80
VIII.B.2.2 Etalonnage de la colonne 81
VIII.B.2.3 Elution des échantillons 81

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

VIII.B.3 Analyse des fractions obtenues par gel filtration par SDS-PAGE 81
VIII.B.3.1 Concentration des échantillons par précipitation au TCA 81
VIII.B.3.2 Séparation et détection des protéines 81
VIII.B.4 Etude d'interactions protéine-protéine la surface des membranes 82
VIII.B.4.1 Pontage chimique 82

RESULTATS ***83***

Chapitre 1 : Analyse d'une nouvelle famille de gènes et protéines chez A. thaliana ***83***

I. Analyse des gènes NIP chez A. thaliana ***83***

I.A. Organisation des gènes *AtNIP* **83**

I.B. Analyse des EST («Expressed Sequence Tag ») **84**
I.B.1 Analyse des EST chez *A. thaliana* 85
I.B.2 Recherche d'EST homologues 86

II. Analyse bioinformatique des séquences primaires des protéines NIP ***86***

II.A. Comparaison globale des séquences primaires d'*A. thaliana* et l'épinard **86**

II.B. Organisation structurale de la famille NIP chez *A. thaliana* et épinard **90**
II.B.1 Région N-terminale: bloc 1 91
II.B.2 Région centrale: bloc 2 92
II.B.2.1 Région C-terminale: bloc 3 94

Chapitre 2 : Caractérisation des anticorps anti-NIP et anti-NEP ***97***

I. Caractérisation des anticorps anti-NIP ***97***

I.A. Préparations des anticorps **97**
a) Choix des antigènes 98

I.B. Spécificité et sensibilité des antisera dirigés contre NIP **98**
I.B.1 Détermination de la sensibilité des antisera 98
I.B.2 Vérification de la spécificité des antisera AtNIP1 SE582 et AtNIP2 SE583 par rapport aux protéines cibles 100
I.B.3 Détermination de réactions croisées de l'antisérum SE582 sur les protéines AtNIP3 et NIP d'épinard 102
I.B.3.1 Immunodétection sur des extraits protéiques totaux 103

II. Caractérisation des anticorps dirigés contre les NEP d'épinard ***105***

II.A. Préparation des anticorps **105**
a) Choix des antigènes 105

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

Figure 19 : Peptides immunogènes utilisés dans la production des anticorps spécifiques des ARN polymérases RPOT ;2 et RPOT ;3 d'épinard et d'Arabidopsis 106

II.B. Spécificité et sensibilité des antisera dirigés contre SoRPOT ;2 et SoRPOT ;3 107

II.B.1 Détermination de la sensibilité des antisera 107

II.B.2 Vérification de la spécificité des antisera sur les protéines cibles 107

II.B.2.1 Immunodétection sur les protéines recombinantes produites chez E. coli 107

II.B.2.2 Immunodétection sur des extraits totaux de feuilles d'épinard 108

Chapitre 3 : Etude de l'expression des gènes AtNIP *111*

I. Expression des gènes AtNIP en fonction des organes *111*

I.A. Accumulation des transcrits 111

I.A.1 Analyse ciblée par RT-PCR semi quantitative 111

I.A.2 Etude large du transcriptome 113

I.B. Expression tissulaire des protéines AtNIP 115

II. Expression des gènes AtNIP au cours du développement de la plante *117*

II.A. Accumulation des transcrits 117

II.A.1 Analyse grâce à une étude large du transcriptome 117

II.B. Expression des protéines AtNIP au cours de la formation de la jeune plantule 119

III. Expression des gènes AtNIP en fonction des conditions d'éclairement *120*

III.A. Analyse de l'accumulation des transcrits *AtNIP* selon les conditions d'éclairement 120

III.A.1 Analyse de l'accumulation des messagers par RT-PCR semi-quantitatives. 120

III.A.2 Analyse des profils d'accumulation des ARNm *AtNIP* en fonction des spectres lumineux 121

III.B. Accumulation des protéines AtNIP en fonction des conditions lumineuses 123

Chapitre 4 : Etude fonctionnelle des protéines NIP *127*

I. Localisation subcellulaire des protéines NIP et NEP chez A. thaliana et chez épinard *127*

I.A. Approche par transformation transitoire *in planta* 127

I.A.1 Constructions des vecteurs binaires recombinants 128

I.A.2 Détection des protéines hybrides AtNIP::eYFP *in planta* 130

I.B. Localisation des protéines NIP et NEP déterminées par une approche de fractionnement subcellulaire 132

I B.1 Localisation subcellulaire des protéines NIP et SoNEP 132

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

I.B.2 Localisation subplastidiale des protéines NIP et NEP 137

Figure 34 : Localisation subplastidiale SoRPOT ;2 et SoRPOT ;3 chez l'épinard 141

I.B.3 Topologie des protéines NIP 142

II. Analyse des interactions NIP/NEP 146

II.A. Nature de l'association NEP - membranes plastidiales 146

II.B. Recherche des protéines associées à NIP 148

II.B.1 Séparation des complexes associés aux membranes plastidiales 148

II.B.1.1 Evaluation du protocole de solubilisation 148

II.B.1.2 Séparation des complexes membranaires natifs par gel filtration 151

II.B.1.2.1. Technique expérimentale 151

II.B.1.2.2. Séparation des complexes membranaires plastidiaux solubilisés par chromatographie d'exclusion 152

II.B.1.3 Pontage protéique 157

II.B.2 Propriétés d'oligomérisation des protéines NIP 159

II.B.2.1 Propriétés d'assemblage des protéines recombinantes 160

Chapitre 5 : Caractérisation de mutants AtNip 165

I. Mutants d'insertion ADN-T 165

I.A.1 Etude d'un mutant d'insertion d'ADN-T (AtNip1) dans le gène *AtNIP1* 166

I.A.2 Présentation du mutant AtNip1 166

I.A.2.1 Isolement de plantes hétérozygotes et homozygotes 167

I.A.2.2 Analyse moléculaire et phénotypique du mutant AtNip1 167

I.A.3 Etude du mutant d'insertion ADN-T dans le gène *AtNIP2* 168

I.A.4 Présentation du mutant 168

I.A.5 Analyse moléculaire et phénotypique 169

II. Mutants exploitant le mécanisme d'ARNi (ARN interférence) 172

II.A. Mécanisme d'ARN interference 172

II.B. Production de la lignée mutante 172

II.C. Analyse moléculaire et phénotypique 173

III. Mutants surexpresseurs des gènes AtNIP 176

III.A. production des lignées mutantes 176

III.B. Phénotypes apparents des plantes transformées : observations préliminaires 176

DISCUSSION, CONCLUSION ET PERSPECTIVES 179

ANNEXES 191

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

BIBLIOGRAPHIE _____ ***199***

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

Liste des abréviations

aa : acides aminés

ADN: acide désoxyribonucléotide

ADNc: ADN complémentaire

ARN: acide ribonucléotide

ARNm: ARN messager

ATP: adénosine triphosphate

BET: bromure d' éthidium

BSA: serum albumine bovine

Da: dalton

kDa: kilo daltons

DMSO: dimethyl sulfoxide

DO: densité optique

DTT: dithiothreitol

EDTA: ethylen diamin tetra-acetic acid

EGTA: ethylene glycol tetra-acetic acid

FPLC: Fast Performance Liquid Chromatography

Ga: Milliards d'années

GTP: Guanosine triphosphate

IE37 : Inner Envelope 37

IPTG: isopropylthio-β-galactoside

j: jours

kpb : kilopaires de bases

kDa : kilodalton

MF : matière fraîche

MM : masse moléculaire

mg : milligramme

min : minute(s)

ng : nanogramme

NEP: Nuclear Encoded RNA Polymerase

NTP: nucleotide triphosphate

pb: paire de bases

PBS : Phosphate Buffered Saline

PCR: Polymerase Chain Reaction

PEP: Plastid Encoded RNA Polymerase

PMSF: phenylmethylsulfonyl fluoride

PSI: photosystème I

PSII: photosystème II

PTOX: plastid terminal oxydase

rpm: rotations par minute

RT: Reverse Transcription

RT-PCR: reverse transcription polymerase chain reaction

SDS: sodium dodecyl sulfate

SLF: Sigma-like factors

TBS: Tris Buffered Saline

Ve: Volume d'élution.

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Les cellules eucaryotes résultent de la fusion de plusieurs entités biologiques distinctes, chacune possédant son propre génome. Leur métabolisme et leur structure sont donc les fruits d'une mosaïque génétique. Bien que le noyau reste l'élément central et soit le maître de la cellule, des échanges permanents, d'informations et de molécules, se mettent en place entre le noyau et les autres compartiments. Ils permettent d'optimiser le fonctionnement de la cellule en fonction du milieu environnant et du développement. La cellule eucaryote a tout d'abord établi un réseau de communication et de régulation entre le noyau et la mitochondrie. La cellule végétale est plus complexe car elle intègre en plus un second organite d'origine endosymbiotique, possédant son propre génome : le plaste. Ce dernier introduit ainsi une complexité supplémentaire dans ce réseau intracellulaire :

- une coordination avec le noyau (Rodermel 2001 ; Strand *et al.* 2003) ;
- des échanges avec le premier organite intégré dans la cellule, d'origine symbiotique, la mitochondrie (Hedtke *et al.* 1999b).

Bien que les plastes et mitochondries soient des organites semi-autonomes, possédant leur propre génome, la plupart des protéines retrouvées dans ces compartiments sont codées par le noyau. Elles sont produites dans le cytosol et importées spécifiquement dans les organites *bona fide*. Des gènes nucléaires contrôlent donc la biogenèse et le fonctionnement des organites.

Notre travail est centré sur le plaste, organite présentant une plasticité importante puisque son devenir et son fonctionnement sont particulièrement influencés par les conditions environnementales, telle la lumière. Les divers plastes spécialisés se développent à partir de proplastes. Ils présentent alors des différences morphologiques et structurales variables, selon le type cellulaire où ils se trouvent. Sous la forme de chloroplastes, les plastes assurent non seulement la photosynthèse mais participent aussi à de nombreux processus métaboliques, tels que le métabolisme de lipides, la synthèse d'amidon, de certains acides aminés, de bases nucléotidiques, de vitamines, et de groupements tétrapyrroliques. En outre, les plastes matures peuvent basculer dans une autre voie de différenciation vers d'autres formes de plastes, toujours guidés selon un stimulus externe ou lié au développement, par exemple lors du mûrissement du fruit vert (chloroplastes) en fruit adulte (chromoplastes). Bien que le génome plastidial (plastome) code une partie de son appareil génétique, le noyau détient la plupart des éléments clés de la régulation de l'expression génique plastidiale, incluant des facteurs intervenant dans la transcription et dans les évènements post-transcriptionnels (Rochaix

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

1996). Cette situation est encore plus accentuée dans la mitochondrie puisque tous les composants intervenant dans l'expression de son génome sont codés par le génome nucléaire. Un des points de contrôle du noyau sur le développement des organites porte donc sur la transcription des génomes extra-nucléaires.

Le but de ce travail est de caractériser un des appareils de transcription du génome plastidial, codé par le noyau. Afin de mieux comprendre l'expression des génomes extra-nucléaires, et en particulier du plastome, nous allons introduire dans un premier temps le contexte dans lequel ces organites semi-autonomes sont apparus et comment la cellule végétale a été bâtie. Nous détaillerons également ce qui est connu aujourd'hui sur les systèmes transcriptionnels dans les organites des eucaryotes supérieurs.

I. Origine des organites

I.A. Endosymbioses en série

I.A.1 Découverte des organites intracellulaires : les symbiotes

Au cours de la seconde moitié du XIXème siècle, les progrès techniques en microscopie optique ont permis d'effectuer les premières observations des composants intracellulaires, et ainsi d'établir les prémisses d'une explication quant à leur nature, fonctions, et leur origine.

Grâce à leur couleur verte naturelle, les chloroplastes ont été identifiés avant les mitochondries. Les botanistes sont les premiers à discuter de l'origine de « gouttelettes à pigments verts » qui se divisent, et en 1885, un botaniste allemand, Schimper suggère déjà que les chloroplastes pourraient provenir de microorganismes symbiotiques (cité dans Palenik 2002). En 1905, un botaniste russe, Mereschkowsky souligne des similitudes entre les cyanobactéries et les chloroplastes, décrivant ces derniers comme des « petits travailleurs, esclaves verts » au profit de la cellule eucaryote (cité dans Dyall *et al.* 2004).

La découverte des mitochondries est plus tardive car plus petites et non colorées naturellement. Il faut attendre la seconde moitié du XXème siècle pour éclaircir l'origine de ces deux organites et faire le rapprochement avec les procaryotes. Des similitudes sont finalement observées grâce au développement de nouvelles approches expérimentales. On peut relever, entre autres, la génétique, qui a permis de mettre en évidence une hérédité cytoplasmique de type non Mendelienne, suggérant l'existence d'une source de patrimoine génétique distincte du noyau; et les techniques de biochimie et de microscopie électronique,

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

qui ont contribué, notamment, à la découverte de ribosomes et molécules d'ADN dans les plastes et mitochondries.

Les plastes et les mitochondries sont dotés de leur propre matériel génétique, présentant des similitudes avec celui des procaryotes.

I.A.2 Origine des mitochondries

Les mitochondries sont apparues avant les plastes, suite à un événement endosymbiotique primaire.

Des analyses reposant sur la phylogénie, l'organisation et a distribution des génomes mitochondriaux et bactériens semblent indiquer que l'ancêtre de l'organite serait proche des α-protéobactéries actuelles. La phagocytose d'un organisme est souvent provoquée par un contexte défavorable, pour l'un ou pour les deux protagonistes. Ils sont contraints à évoluer pour subsister ou bien à disparaître. Deux hypothèses sont mises en avant pour expliquer l'intégration d'une bactérie, génitrice de la mitochondrie, chez un hôte de type archaebactérien ; une pression de sélection liée à un besoin métabolique, comme par exemple, un besoin d'hydrogène (Martin & Muller 1998) une pression de sélection due à l'apparition de l'oxygène sur Terre, composé pouvant être toxique pour des organismes non adaptés (Andersson *et al.* 2003).

La première hypothèse implique que l'endosymbiose ait eu lieu avant ou au début de l'apparition de l'oxygène dans l'atmosphère, il y a environ 2,7 milliards d'années (Ga). Elle suggère que l'hôte soit un organisme anaérobie et méthanogène, strictement hétérotrophe vis à vis de l'hydrogène. Cette dépendance peut constituer le moteur conduisant à cette première endosymbiose. Après phagocytose, la cellule peut alors tirer son énergie soit de la fermentation produisant de l'hydrogène en anaérobiose, soit de la respiration en aérobiose.

La seconde idée avancée repose sur un phénomène important engendré par l'apparition des organismes photosynthétiques sur Terre, tels que les cyanobactéries apparues il y environ 3,5 Ga : la production d'oxygène. Le taux en oxygène a augmenté dans l'atmosphère pour devenir relativement important vers 2,2 Ga avant nos jours. Cette deuxième hypothèse implique donc une fusion des deux organismes plus tardive que dans la théorie précédente. L'oxygène pouvant être toxique pour les organismes incapables de le métaboliser ; un hôte eucaryote primitif, anaérobie, a profité des facultés de détoxification de l'oxygène fourni par une protéobactérie anaérobie facultative pour survivre dans cet environnement. Ce symbiote fournit par ailleurs à son hôte, une véritable usine productrice d'énergie chimique, sous forme d'ATP.

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

Cette première endosymbiose est à l'origine de tout le règne eucaryote actuel, et seule, à l'origine du règne animal et des champignons.

I.A.3 Origine des plastes

Les plastes sont apparus après les mitochondries et leur origine est plus complexe. Une première hypothèse indique que les plastes sont issus d'une endosymbiose d'une cyanobactérie chez un eucaryote doté d'une mitochondrie. Le type de cyanobactérie à l'origine des plastes reste encore à déterminer. Le symbiote, dans ce cas, confère une photoautotrophie à un hôte hétérotrophe.

Les analyses phylogénétiques et structurales montrent une origine unique, suivie d'une divergence rapide des plastes conduisant à l'apparition de trois phylums majeurs (Martin & Muller 1998) :

- les végétaux à plastes verts, comprenant les algues vertes et les plantes terrestres, composant le sous-règne des *Viridaeplantae ;*

- les organismes à plastes rouges constituant les deux autres phylums retrouvés dans les algues rouges et les glaucocystophytes.

Au cours des années 1960 et 1970, Gibbs interprète des observations plus complexes : un eucaryote aurait pu être englouti par un autre eucaryote. Elle propose alors un scénario expliquant l'origine de certains plastes : un eucaryote photosynthétique est phagocyté par un eucaryote non photosynthétique (cité dans Palenik 2002). Dans la plupart des cas, le noyau et les mitochondries de l'algue phagocytée régressent au cours du temps jusqu'à disparaître. Il reste cependant actuellement parfois un vestige de noyau dit « nucléomorphe » permettant d'appuyer l'hypothèse de la fusion de deux eucaryotes (Martin & Muller 1998). Chez les apicomplexes, entre autres, la régression du symbiote s'accompagne de la perte des fonctions photosynthétiques des plastes (Dyall *et al.* 2004).

I.B. Des symbiotes aux organites actuelles

On peut se demander maintenant comment ces organismes phagocytés ont pu persister chez leur hôte, et comment ils ont réussi à s'intégrer. La cellule végétale est complexe puisqu'elle s'est bâtie autour de trois partenaires et par conséquent, son génome actuel découle des génomes issus de trois entités. La genèse de la cellule eucaryote végétale est fondée sur une restructuration massive des informations génétiques et des régulations métaboliques entre l'hôte et les symbiotes. Les deux symbiotes subissent les mêmes étapes d'intégration dans l'hôte. L'intégration de la mitochondrie étant antérieure à celle du plaste,

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

elle présente probablement un stade plus avancé de l'évolution. Par ailleurs, l'arrivée d'un second symbiote procaryote, implique, outre ces réarrangements, une donnée supplémentaire à intégrer : la présence d'un premier organite lui aussi d'origine bactérienne.

I.B.1 « Eucaryogénèse » ou genèse de la cellule eucaryote, chez les végétaux

Trois organismes vivants et libres ont formé une entité unique avec un métabolisme commun : la cellule végétale. Cette union est bâtie sur deux grands axes :

la dominance nucléaire : l'hôte doit maintenir les fonctions des symbiotes qui lui sont essentielles (entre autres respiration, photosynthèse, production d'ATP, synthèse de certains composés essentiels tels que des vitamines, acides aminé, lipides…) tout en restant le coordonnateur de la cellule et en créant une homéostasie entre ses divers compartiments ;

une plasticité des endosymbiotes : leur intégration implique la perte d'une partie de leur identité bactérienne. Ces symbiotes deviennent alors des organites, compartiments intégrés irréversiblement dans la cellule eucaryote et interdépendants.

Ce processus se met en place progressivement. Nous allons évoquer le point majeur de ce processus et souligner la complexité de la cellule végétale.

I.B.1.1 *Transfert des gènes au noyau*

Le transfert des gènes au noyau constitue une étape essentielle de l'intégration des symbiotes. La réduction des génomes des proto-mitochondries et proto-plastes peut être découpée en plusieurs phases (Figure 1). Les proto-organites perdent une grande partie de leur patrimoine génétique. Cet évènement implique des réarrangements d'ADN massifs. Le transfert est réalisé en trois grandes étapes :

une échappée d'un ou plusieurs gènes de l'organite au noyau (Figure 1, stades 3 et 4). Une analyse des génomes nucléaires d'*A. thaliana*, de procaryotes (dont les cyanobactéries), et de *Saccharomyces cerevisiae* montre que 18% du génome nucléaire d'*A. thaliana*, soit environ 4500 gènes, proviennent de l'ancêtre cyanobactérien des plastes (Martin 2003). Par ailleurs, un autre support de transfert génétique entre les organites et le noyau est envisagé (non représenté sur ce schéma), reposant matériellement sur un transfert d'ADNc. Cette seconde hyptothèse s'appuie notamment sur une étape du processus de maturation des certains ARNm codés dans les organites, indispensable pour obtenir une information génétique correcte: l'édition ou « editing ».

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

une étape de remaniements génomiques pour adapter ces séquences à un environnement transcriptionnel eucaryotique, et adjoindre une séquence d'adressage permettant au produit protéique de retourner, éventuellement, à l'organite d'origine (Figure 1, stade 5). Les gènes inutiles à l'hôte sont éliminés.
la délétion de la copie du gène présente dans le génome organellaire (Figure 1, stade 6).

Une comparaison des génomes des organismes les plus proches des ancêtres symbiotes, laisse supposer qu'ils pouvaient contenir entre 3000 et 7000 gènes. Les génomes mitochondriaux (animaux) et plastidiaux (plastomes) actuels comprennent actuellement environ 37 gènes et 120 gènes respectivement. Par conséquent, seuls environ 5% des gènes ancestraux ont été maintenus dans les organites actuelles.

Tous les gènes des symbiotes n'ayant pas été transférés, certaines hypothèses proposent des facteurs limitant au transfert. L'hypothèse la plus probable, dite des « cinq hélices transmembranaires » (Claros *et al.* 1995), repose simplement sur la nature et les propriétés très hydrophobes de certaines protéines organellaires. La taille et l'hydrophobicité peuvent être source de beaucoup de contraintes pour un adressage efficace à l'organite.

Par ailleurs, certains gènes codant seulement une partie des composants d'un complexe sont maintenus dans le génome organellaire, comme par exemple la grande sous unité de la RUBISCO (Ribulose 1-5 Biphosphate Carboxylase Oxygenase) maintenue dans le génome plastidial. Parfois, les gènes d'origine symbiotique transférés peuvent dupliquer une fonction préexistante dans l'hôte, et dans ce cas, le système le plus avantageux est alors sélectionné, et entraîne la perte des gènes de l'hôte correspondants. Les protéines d'origine procaryote peuvent être redistribuées dans d'autres compartiments de la cellule (ainsi, la phosphoglycerate kinase devient cytosolique), ou bien retourner naturellement dans l'organite d'origine. Cet adressage nécessite que ces produits présentent une « signature » leur assurant de rentrer dans le compartiment correct. Cet import de protéines doit être contrôlé et les séquences d'adressage reconnues par des complexes protéiques à chaque nouvelle barrière membranaire. Les séquences d'import peuvent parfois être réparties sur plusieurs exons, suggérant qu'elles seraient le produit d'un « schuffle » ou d'un épissage alternatif évoluant en séquence de transit (McFadden 1999). Elles peuvent être également créées *de novo* suite à des duplications et mutations sur la région promotrice d'accueil après l'intégration (Adams & Palmer 2003).

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

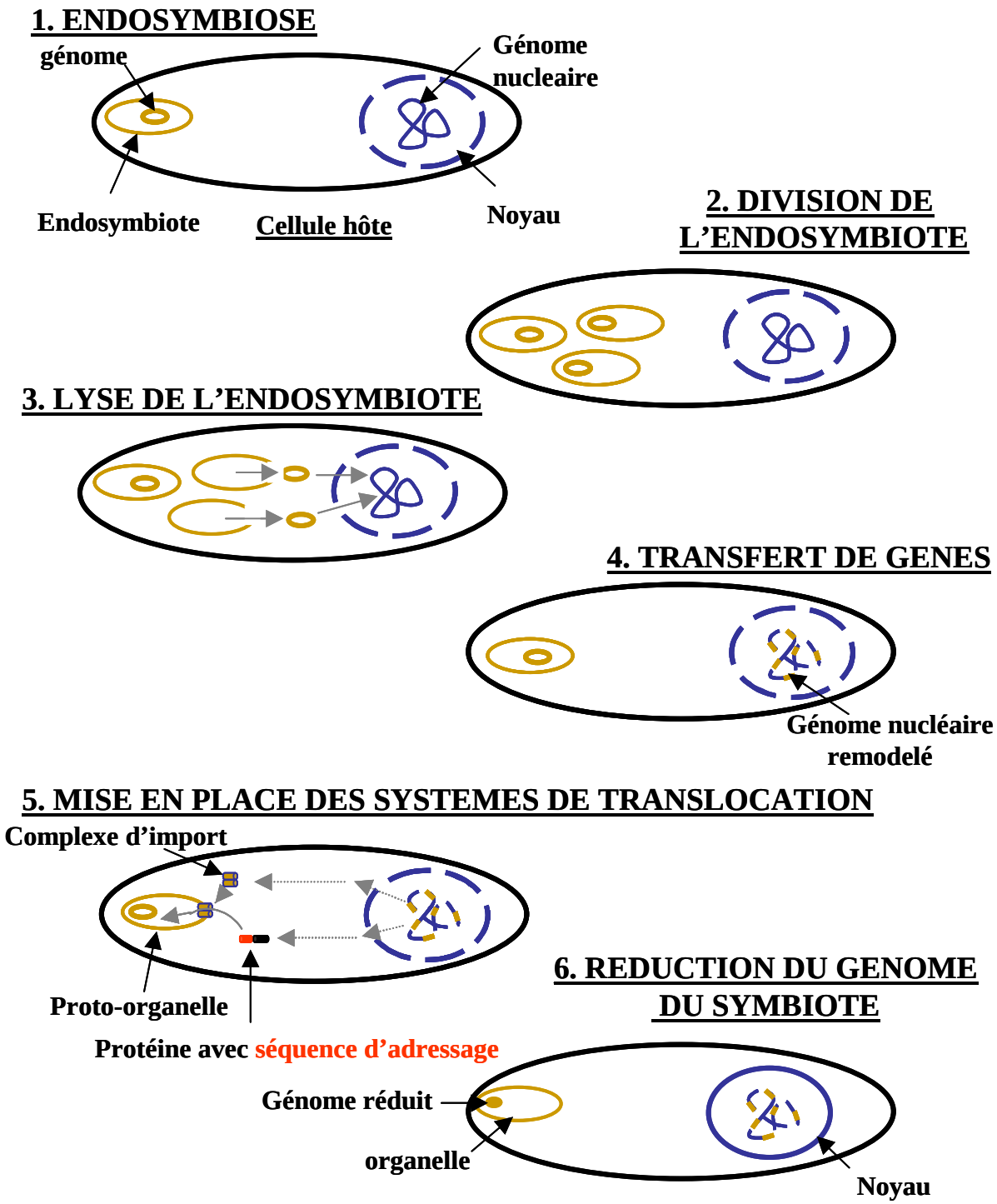


Figure 1 : Les grandes étapes de l'intégration de l'endosymbiote par son hôte (d'après Dyall et al. 2004)

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

La cellule eucaryote végétale résulte d'une mosaïque génétique d'origine double, eucaryotique et procaryotique. Cette dualité génétique se traduit finalement par une mixité des composants eucaryotes / procaryotes dans de nombreux processus organellaires, pour lesquels le noyau reste le coordonnateur. Elle facilite ainsi les échanges et la communication entre le noyau et ses organites. Ainsi, les systèmes d'expression géniques du plaste, et en particulier la transcription, sont principalement contrôlés par le noyau, par l'intermédiaire de gènes transférés au cours de l'évolution, ce que nous allons évoquer dans un des chapitres suivants.

II. Expression du génome plastidial

II.A. Organisation et structure

II.A.1 Organisation du génome plastidial

Plusieurs génomes plastidiaux sont aujourd'hui entièrement séquencés, on peut citer entre autres, le tabac (Shinozaki K *et al.* 1986), le riz (Hiratsuka *et al.* 1989), le maïs (Maier *et al.* 1995), Arabidopsis (Sato *et al.* 1999b), et l'épinard (Schmitz-Linneweber *et al.* 2001), ce qui permet une étude structurale exhaustive.

Les plantes supérieures actuelles possèdent un chromosome plastidial de 130 à 160 kpb (Palmer 1990) et codent environ 120 gènes. La variation de la taille est principalement liée aux variations de tailles de régions inversées répétées retrouvées dans ces génomes. Un plaste peut contenir un nombre de copies d'ADN différent selon le stade de développement, de différenciation ou selon le tissu, variant d'une dizaine (proplastes) jusqu'à 300 copies d'ADN (Bendich 1987).

Le génome plastidial est associé aux membranes et organisé en structures nucléoprotéiques, les nucléoïdes (Sato 2001). L'existence d'un squelette nucléoprotéique basé sur des protéines de type HU, comme chez les bactéries, n'a pas encore vraiment été mis en évidence chez les végétaux supérieurs. Chaque nucléoïde contient environ 10 molécules d'ADN, et semble plutôt être associé à des protéines d'origine eucaryote (pour revue, Sato 2001). Ces protéines sont très diverses. Certaines ressemblent à des facteurs de transcription nucléaires. En effet, la protéine PEND, découverte chez le pois et possédant un motif de type basique zipper (Sato *et al.* 1998 ; Sato *et al.* 1999a), s'associe à l'ADN, au cours des jeunes stades du développement, au niveau de l'enveloppe interne. La protéine ET1 du maïs, protéine à ruban de zinc (« zinc ribbon ») proche d'un facteur d'élongation nucléaire (TFIIS) est associée aux TACs (Transcripionnally Active Chromosome). Les TACs constituent la

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

partie du chromosome active en transcription associée aux membranes. Le mutant *et1* chez le maïs présente un phénotype précoce défini par des défauts au niveau de la graine (fissures et cicatrices, et un déficit de synthèse en amidon dans l'endosperme), et de la jeune plantule. Cette dernière présente un retard significatif du développement des chloroplastes, observé en microscopie électronique. Le phénotype disparaît au cours du développement (da Costa e Silva *et al.* 2004). D'autres protéines participant à ces nucléoïdes sont bi-fonctionnelles : CND41 et DCP68, fixent l'ADN et présentent en outre, respectivement, des activités protéases (Murakami *et al.* 2000) et sulfite réductases (Cannon *et al.* 1999 ; Chi-Ham *et al.* 2002).

II.A.2 Dynamique du plastome

Les nucléoïdes sont des structures dynamiques en fonction du stade de développement ou de différenciation du plaste (Sato *et al.* 2003). En effet, une étude basée sur des observations au microscope électronique menées par Herrmann et Kowallik en 1970 (Herrmann & Kowallik 1970b; Herrmann & Kowallik 1970a) montrent l'ADN plastidial associé à l'enveloppe dans les plastes en cours de développement alors que dans les plastes matures, le plastome est organisé en nucléoïdes à l'intérieur du plaste. Chez les jeunes plastes, la fixation de l'ADN à l'enveloppe pourrait se faire par la protéine PEND chez de jeunes plantules. Les stades précoces du développement des chloroplastes constituent des phases de division importante accompagnées de nombreuses réplications du plastome (Sato *et al.* 1998). Par conséquent, elle pourrait être impliquée dans la réplication du chromosome à ces stades précoces. Par contre, une deuxième protéine fixant l'ADN, MFP1, fournit un bon candidat à l'ancrage du chromosome aux membranes thylacoïdiennes dans les chloroplastes matures (Jeong *et al.* 2003). En revanche, les mécanismes de remodelage des nucléoïdes au cours du développement du plaste sont encore peu analysés. Une modulation par phosphorylation est discutée (Jeong *et al.* 2004) sur la base d'une protéine kinase co-purifiant avec un complexe plastidial associé aux TACs (Ogrzewalla *et al.* 2002). De plus, cette kinase, CpCKIIα, présente une forte similarité avec une des sous unités d'une protéine kinase nucléaire impliquée dans le remodelage de la chromatine, la caséine kinase II. L'activité de CpCKIIα, est dépendante de l'état redox du chloroplaste, elle constitue donc un pivot idéal pour coordonner et adapter l'expression génique nucléaire et plastidiale aux besoins de l'organite en intervenant à deux niveaux sur le plastome : l'accessibilité de l'ADN plastidial et la transcription des gènes.

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

II.A.3 Organisation des gènes plastidiaux

II.A.3.1 *Contenu du plastome*

D'après les annotations des génomes plastidiaux séquencés à ce jour, les gènes plastidiaux peuvent être répartis en 3 groupes majeurs :

1. le groupe majoritaire rassemble les gènes codant des protéines liées à la photosynthèse (Photosystème I –PSI- et PSII, ATP synthase) ;
2. des gènes codant des composants des appareils génétiques (transcriptionnels et traductionnels) ;
3. un groupe de gènes à fonctions diverses, dont les gènes à l'origine du complexe NADH oxydoréductase, d'une sous unité acétyl-CoA carboxylase (*accD*), et d'un complexe protéolytique multimérique présent dans le stroma (*clpP*), et enfin quelques phases de lectures (*ycf*) dont les rôles restent à éclaircir.

II.A.3.2 *Organisation de type procaryotique*

Les gènes plastidiaux sont organisés en unités transcriptionnelles appelées opérons, à cause de la similarité partielle avec les opérons des procaryotes. L'organisation des gènes au sein d'un même opéron peut même, parfois, être conservée entre *Escherichia coli* et le plaste (Sugiura 1992). Le plaste a hérité d'une partie du système génétique de son ancêtre procaryote ainsi qu'une conservation partielle de certains mécanismes génétiques. Les similitudes entre plaste et bactéries ont tout d'abord été en évidence biochimiquement. Elles concernent aussi bien les machineries traductionnelles, mettant en jeu des ribosomes 70S, que les appareils transcriptionnels avec ,

l'identification de régions promotrices analogues à celles des bactéries (les boîtes –10 TATAAT et –35 TTGACA) ainsi que des éléments ressemblant aux séquences de fixation de ribosomes procaryotes GGAGG, les RBS (Ribosomes Binding Sites) (Mullet 1993) ; et

l'identification d'une ARN polymérase plastidiale répondant aux critères d'une ARN polymérase procaryote dans le chloroplaste (pour revue, Igloi GL & Kössel H 1992).

II.B. Transcription du plastome : appareil transcriptionnel plastidial de type procaryotique, PEP

La PEP (Plastid Encoded RNA Polymerase) est une ARN polymerase d'origine procaryotique, présente chez la totalité des végétaux, excepté chez les parasites. Il s'agit d'une enzyme multimérique, dont le noyau (« core enzyme ») est composée de sous unités α, β, β',

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

β'', codées respectivement par les gènes plastidiaux *rpoA, rpoB, rpoC1* et *rpoC2* (Hu J *et al.* 1991 ; Hu & Bogorad 1990). Ces gènes sont répartis sur deux opérons : le gène *rpoA* est isolé sur un opéron « hétérogène » contenant *rps14-rpoA-psbB-psbH* , alors que les trois autres sont regroupés au sein d'un même opéron *rpoB-rpoC1-rpoC2*. Tout comme chez la bactérie, le noyau de l'enzyme α_2 ββ'β'' doit être associé au préalable avec un facteur de spécificité, capable de reconnaître les promoteurs consensus –10 et –35 : un facteur de type sigma ou « Sigma Like Factors » (SLF) codés par le noyau. Le complexe alors actif est appelé « holoenzyme ».

Des mutants transplastomiques, construits notamment chez le tabac, nuls pour l'une des sous unités de la polymérase (*ΔrpoA*, *ΔrpoB*, *ΔrpoC1* ; Allison *et al.* 1996 ; Santis-MacIossek *et al.* 1999) sont albinos, suggérant ainsi un rôle de cette enzyme dans la transcription de gènes liés à la photosynthèse. Cependant, le fait que ces plantes albinos soient viables avec un apport de glucides, et qu'elles présentent des plastes, suggère l'existence d'un autre système transcriptionnel sur lequel nous reviendrons. L'équipe de Maliga P a produit un mutant transplastomique de tabac présentant une copie chimérique du gène *rpoA* étiqueté. Grâce à cette étiquette, une partie de l'appareil PEP a été purifié par chromatographie d'affinité. Il s'agit d'un complexe de masse moléculaire supérieure à 900 kDa, comportant le noyau de l'enzyme ainsi que d'autres polypeptides de fonction encore indéterminée. Ce complexe est incapable d'initier spécifiquement la transcription de gènes plastidiaux, car tout comme chez la bactérie, l'ajout de SLF recombinants exogènes à cette forme purifiée suffit à restaurer une activité transcriptionnelle spécifique. Cette holoenzyme ainsi reproduite *in vitro* peut alors être utilisée pour analyser le rôle et identifier des séquences, des éléments promoteurs reconnus spécifiquement par chacun des facteurs de type sigma (Suzuki *et al.* 2004).

Le fonctionnement de la PEP est donc dépendant de la coopération et de l'expression de deux systèmes génétiques dans la cellule puisque l'activité de l'ARN polymérase peut être contrôlée par le noyau grâce aux facteurs SLF nucléaires.

II.B.1 Spécificité ou redondance des SLF ?

Les facteurs SLF constituent une famille de gènes nucléaires. On dénombre six facteurs de type sigma chez *A. thaliana*. Une famille de protéines peut parfois impliquer une redondance fonctionnelle, ou bien une certaine spécificité selon le stade de développement, le tissu ou encore selon les conditions externes ou de stress. Les travaux réalisés sur les mutants nuls ou KO (« Knock out ») SLF, connus à ce jour, n'empêchent pas la plante d'effectuer son

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

cycle de vie complet, et laissent donc penser que ces facteurs pourraient partiellement se substituer l'un l'autre. Mais ce point est encore controversé, car en effet, des mutants nuls pour le facteur SIG5 (KOSig5) présentent un phénotype embryo-léthal (Yao *et al.* 2003). Les mutants ΔSig2, ΔSig6 sont affectés dans le verdissement de la jeune plantule, dès l'apparition des cotylédons. De plus, ils présentent tous deux un réseau thylacoïdien réduit. Ils semblent donc indiquer un rôle très précoce, dans la biogenèse des chloroplastes et le développement de la jeune plantule (Yao *et al.* 2003; Ishizaki et al. 2005, Yao *et al.* 2003; Privat *et al.* 2003, Shirano *et al.* 2000). Les résultats actuels semblent plutôt montrer une action prépondérante des facteurs sigma au cours de la biogenèse du chloroplaste, notamment lors de la mise en place des appareils photosynthétiques, et dans le chloroplaste mature.

II.B.2 Mise en évidence d'une seconde activité ARN polymerase plastidiale chez les plantes supérieures

Depuis les années 1980, plusieurs indices basés sur des expériences de biochimie ont suggéré l'existence d'une autre activité ARN polymérase dans le plaste, distincte d'une activité de type bactérienne. En 1984, Greenberg et collaborateurs ont mis en évidence, dans le chloroplaste d'*Euglena gracillis*, deux profils d'activités ARN polymerases différant par leur localisation et leurs gènes cibles (Greenberg *et al.* 1984). En jouant sur les critères de sensibilité à certains antibiotiques des divers types d'ARN polymérases connues, ces auteurs ont pu discriminer :

une enzyme soluble présentant les propriétés d'une ARN polymérase bactérienne, assurant la synthèse d'ARNt et d'ARNm ;

et une activité ARN polymerase, d'origine inconnue, associée aux membranes à l'origine de la production d'ARNr.

Au début des années 1990, un ensemble de preuves moléculaires convergent vers l'existence d'une ARN polymérase plastidiale non codée par le plastome. En effet, certains organismes sauvages ou mutants, ne possédant pas d'ARN polymérase de type procaryotique fonctionnelle, peuvent cependant produire des transcrits plastidiaux. Ainsi, chez la plante parasite non photosynthétique, Epifagus, le plaste est capable de produire des ARNr bien que son génome soit délété de l'opéron *rpoB rpoC1 rpoC2*. Les observations faites chez les mutants *albostrians* de l'orge et *iojap* de maïs, déficients en ribosomes plastidiaux, suggèrent également l'existence d'un ARN polymérase d'origine nucléaire (Hess *et al.* 1993, Silhavy & Maliga 1998a; Silhavy & Maliga 1998b).

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

Les plastomes séquencés ne semblent pas coder une autre forme d'ARN polymérase connue. Cette enzyme serait donc d'origine nucléaire, importée dans le plaste. Elle ne répond pas à des critères biochimiques caractéristiques des ARN polymérases bactérienne ou eucaryote. Les premières expériences définissant un peu mieux la nature de cette polymérase ont été menées selon une approche biochimique au sein de notre laboratoire. Lerbs-Mache S. (Lerbs-Mache 1993) réussit à séparer deux activités transcriptionnelles dans les chloroplastes de très jeunes feuilles d'épinard : la première présentant le profil polypeptidique et propriétés de la PEP, déjà mises en évidence ; et la seconde est associée à un seul polypeptide de 110 kDa, capable de reconnaître et de transcrire à partir ou aux environs de promoteurs reconnus par l'ARN polymerase du bactériophage T7. Par la même approche, cette dernière serait très réduite chez les feuilles matures, suggérant ainsi un rôle très précoce dans le développement des chloroplastes.

Par ailleurs, des observations moléculaires ont confirmé par la suite l'existence d'un deuxième appareil transcriptionnel dans le plaste. En effet, les mutants transplastomiques *Δrpo* de tabac obtenu par l'équipe de P. Maliga n'exprimant donc pas la PEP, accumulent cependant des transcrits, notamment ceux de l'opéron *rpoBrpoC1rpoC2*. Ces transcrits ne dépendent pas de consensus –10 et –35. (Allison *et al.* 1996; Santis-MacIossek *et al.* 1999, Serino G & Maliga P 1998).

L'expression du plastome requiert donc un second système de transcription dont l'activité biochimique fut mise en évidence après celle de la PEP : une ARN polymérase monomérique (Single Subunit RNA Polymerase, ssRNAP), de type phagique, codée par le noyau: NEP (Nuclear Encoded ARN sPolymerase).

III. Les ARN polymérases monomériques NEP chez les eucaryotes

III.A. Origine évolutive des NEP chez les eucaryotes

Comme nous l'avons vu précédemment, l'acquisition de l'ancêtre mitochondrial par les cellules eucaryotes est antérieure à son correspondant chloroplastique. Au cours de l'évolution, les mitochondries ont conservé moins de caractéristiques procaryotiques, en particulier au niveau de l'expression transcriptionnelle des organites. D'un point de vue évolutif, le système procaryotique organellaire a progressivement été remplacé par un système gouverné par le noyau (Figure 2).

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

Le protozoaire primitif *Reclinomonas americana* a conservé au sein de son génome mitochondrial les gènes codant pour une ARN polymérase multimérique $\alpha_2\beta\beta'\beta''$, provenant d'un ancêtre α-proteobacterien (Mt-RPO) (Lang *et al.* 1997). Il témoigne sans doute du premier stade suivant l'endosymbiose (A). Cette ARN polymérase de type procaryotique est remplacée au cours de l'évolution par une ARN polymérase monomérique de type T3/T7 bactériophagique (RPOY). L'algue brune primitive *Pylaiella littoralis* reflète un stade intermédiaire (stade D) dans l'évolution de la transcription mitochondriale : son génome mitochondrial contient un gène codant pour une ARN polymérase de type phagique (Rousvoal *et al.* 1998), et bien qu'il ait bien perdu les gènes codant pour l'ARN polymérase ancestrale bactérienne (transférés dans le noyau ou bien définitivement éliminés ?), ses gènes mitochondriaux comportent des promoteurs type σ70, probablement utilisés (Delaroque *et al.* 1996). Par conséquent, elle témoigne de l'évolution entre deux types d'ARN polymérases, et peut suggérer une coexistence momentanée de deux systèmes d'ARN polymérases au cours de l'évolution de la mitochondrie (stade D) plutôt qu'une intégration et apparition directe du gène *RPOY* dans le génome nucléaire (stade B). Il reste cependant encore à définir laquelle des polymérases est fonctionnelle chez *P. littoralis*.

Le stade (C) est le plus répandu au sein des eucaryotes, il correspond aux règnes fongiques et animal (Masters *et al.* 1987; Tiranti *et al.* 1997). Leurs mitochondries ont perdu tous les gènes codant pour leur propre système d'expression transcriptionnel. L'expression du génome mitochondrial est prise en charge uniquement par une ARN polymérase de type phagique, RPOY, codée par le génome nucléaire, désignée « NEP », « Nuclear Encoded RNA Polymerase ». Elle est importée dans l'organite. Il est probable que la deuxième endosymbiose générant le plaste, a eu lieu après ce réarrangement génique des gènes Rpo.

Chez la majorité des végétaux photosynthétiques, la PEP d'origine cyanobactérienne persiste dans le plastome (stades E ; G et H figure 2). Elle est perdu en revanche chez les végétaux non photosynthétiques comme *Epifagus virginiana* (stade F figure 2 ; dePamphilis & Palmer 1990). Les gènes codant pour le cœur de l'ARN polymerase multimérique sont maintenus dans le plaste, l'enzyme est alors nommée PEP (« Plastid Endoded RNA Polymerase »). Malgré la réduction du génome plastidial au cours de l'évolution, un appareil transcriptionnel supplémentaire, se met en place dans le chloroplaste : une seconde NEP de type bactériophagique (RPOZ). Et finalement, l'existence de gènes codant pour des ARN polymérases de type phagique a été montrée dans tout les phyla (Cermakian *et al.* 1996).

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

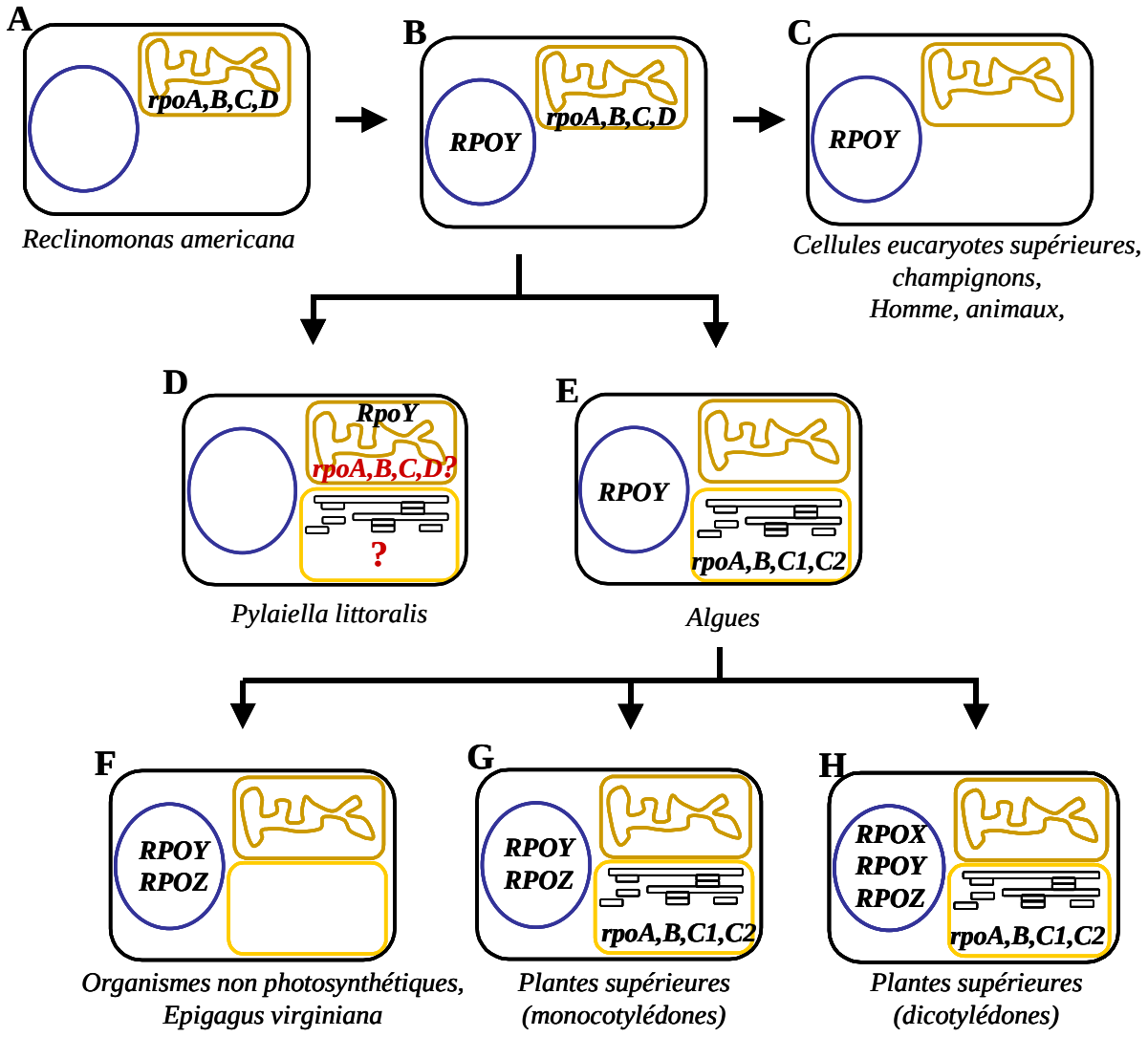


Figure 2 : Evolution des appareils transcriptionnels des organites, soulignant le remplacement progressif de l'ARN polymerase d'origine endosymbiotique par une ARN polymérase de type phagique chez les eucaryotes.

RPOY, RPOZ et RPOX : gènes codant les ARN polymérase de type phagique, RpoA, B, C1 et C2 : gènes codant le noyau de l'enzyme PEP. Sur les schémas, le noyau est délimité en bleu, les mitochondries en marron et les plastes en jaune, et ne sont pas représentés à l'échelle (Figure inspirée de Gray & Lang 1998).

Compte tenu des similarités de séquences chez les végétaux supérieurs, il est possible que la NEP plastidiale RPOZ résulte d'une duplication du gène codant pour l'enzyme

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

mitochondriale, suivie de l'acquisition d'une séquence codant un peptide de transit. La nomenclature des NEP n'est pas la même dans des publications différentes :

Noms	Localisation subcellulaire	Références
RPOY **Ou RPOT ;1** **Ou RPOTm**	**mitochondrie**	**(Chang et al. 1986)** **(Yao et al. 2003)** **(Schubot et al. 2001), (Bogenhagen et al. 1984), (Schluckebier et al. 1999)**
RPOZ **Ou RPOT ;3** **Ou RPOTp**	**chloroplaste**	**(Chang et al. 1986)** **(Yao et al. 2003)**
RPOX **Ou RPOT ;2** **Ou RPOTmp**	**Chloroplaste et mitochondrie**	**(Ojala et al. 1981)**

Tableau 1: Nomenclatures utilisées pour les NEP

On dénombre deux NEP chez les plantes monocotylédones (Ikeda & Gray 1999b) : les NEP mitochondriales (RPOY) et plastidiales (RPOZ).

Les plantes dicotyledones contiennent un troisième gène codant pour une ARN polymerase de type T7 (Hedtke *et al.* 1997; Hedtke *et al.* 1999a), issu d'une seconde duplication récente qui serait donc apparue avec la divergence monocotyledones/dicotyledones. Cette protéine est nommée RPOX ou encore RPOT ;2. La localisation subcellulaire de cette dernière polymérase n'est pas encore clairement établie. Selon Hedtke B. et collaborateurs (Hedtke *et al.* 2000), elle serait importée à la fois dans les plastes et dans les mitochondries chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, grâce à une initiation traductionnelle différentielle.

Etant donné que ce travail a été réalisé chez des plantes dicotyledones, nous conserverons par la suite la nomenclature utilisée par Hedtke B. *et al.*, dans leur article paru dans EMBO Reports en 2000, soit RPOT ; 1, RPOT ; 2, RPOT ; 3.

III.B. Système transcriptionnel de type phagique

Afin de mieux comprendre le fonctionnement des NEP et plus particulièrement la phase d'initiation de la transcription, étudiée dans notre équipe, nous allons, dans un premier

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

temps, rappeler quelques traits de l'ARN polymérase du bactériophage T7 ainsi que les mécanismes mis en jeu lors de la phase d'initiation. Nous présenterons ensuite les données accumulées sur la transcription des génomes mitochondriaux de la levure *Saccharomyces cerevisiae* et de l'Homme. En effet, ces deux modèles rassemblent le plus d'informations concernant l'appareil transcriptionnel NEP et son fonctionnement chez les eucaryotes. Nous reviendrons finalement à la transcription NEP dépendante chez les végétaux puis plus précisément chez le plaste des plantes supérieures.

III.B.1 Comparaison des ARN polymerase bactériophagiques avec leurs homologues

III.B.1.1 *Mécanismes de transcription de l'ARN polymérase T7*

Ces résultats sont en partie tirés de la revue de (Cheetham & Steitz 2000).

III.B.1.1.1. Structure de la T7 ARN polymérase

L'ARN polymérase du bactériophage T7 est monomérique, et présente une masse moléculaire proche de 100 kDa. Son fonctionnement est simple car il ne nécessite aucun facteur protéique supplémentaire.

L'organisation spatiale et fonctionnelle de cette polymérase est bien définie (pour revue, (Sousa 1996 ; McCulloch *et al.* 2002). Plusieurs structures cristallines de la T7 ARN polymérase seule (T7 ARN polymérase, (Sousa *et al.* 1993) ou à différents stades de son fonctionnement, notamment associé au promoteur (Chen *et al.* 1999) ou encore en phase d'élongation (Tahirov *et al.* 2002) ont déjà été présentées. Elles ont permis de mettre en évidence certains résidus critiques, et de définir l'organisation du site catalytique ainsi que les changements de conformations observés chez l'enzyme au cours de son fonctionnement. D'autre part, de nombreux tests d'activité ont été effectués après modifications de cette enzyme par mutagenèse dirigée (Brieba & Sousa 2000; Brieba *et al.* 2001 ; Bonner *et al.* 1992; Bonner *et al.* 1994 ; Rong *et al.* 1998).

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

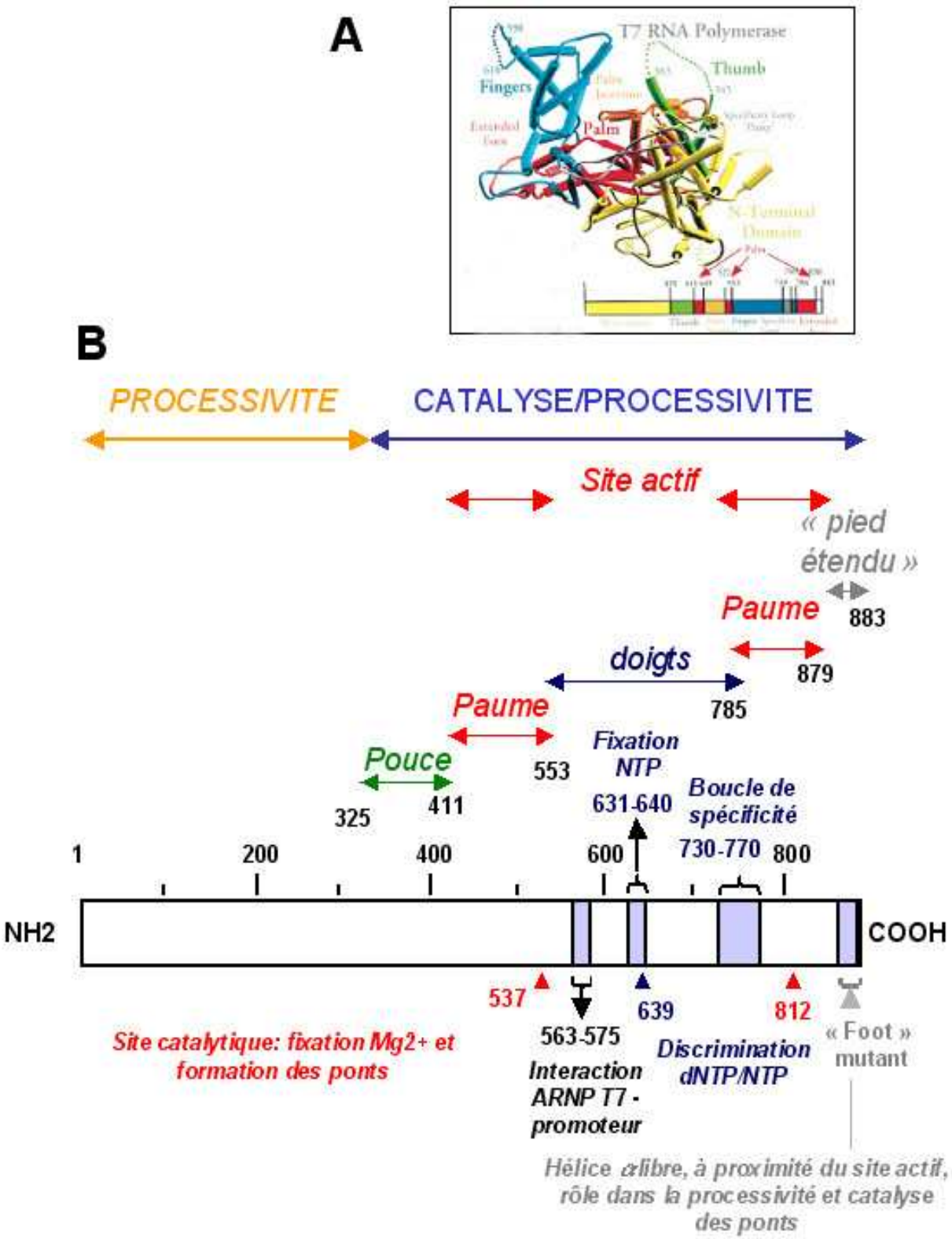


Figure 3 : Structure de l'ARN polymérase T7 (A) et, organisation de sa séquence primaire (B).

3A : structure extraite de Jeruzalmi & Steitz 1998. Avec ARNP : ARN polymerase

L'organisation structurale de l'ARN polymérase T7 est comparée à une « main droite » avec des domaines fonctionnels correspondant aux doigts, à la paume et au pouce

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

(figure 3A). Son extrémité N-terminale (environ 300 acides aminés) est impliquée dans plusieurs fonctions. Ainsi, elle forme conjointement avec le domaine « paume » un canal servant d'ancrage au transcrit néosynthétisé. Elle intervient également dans le passage du complexe d'initiation abortif à un complexe d'élongation processif (transition RPi – RPt). La partie en C-terminal de la protéine (« main droite »), est responsable de la fonction catalytique de l'enzyme. La catalyse d'une molécule d'ARN met en jeu deux ions Mg^{2+}, indispensables, fixés dans la région « paume » de la protéine. La polymérase discrimine en outre parfaitement lors de la catalyse les NTP des dNTP. L'extrémité C-terminale présente une petite hélice libre en solution (partie appelée « pied étendu » ou « extent foot ») impliquée dans la processivité de l'enzyme.

III.B.1.1.2. Mécanisme d'initiation de transcription

L'ARN polymérase T7 est strictement spécifique des promoteurs du bactériophage T7, elle discrimine parfaitement entre ses propres promoteurs et ceux d'autres phages grâce à une région comprise entre les résidus 730 à 770, dite « boucle de spécificité » (figure 3B). Les promoteurs T7 présente un consensus de 23 pb entre –20 et +2, que l'on peut diviser en deux sites fonctionnels (Kochetkov *et al.* 1998),

-17 T A A T A C G A C T C A C T A T A G G G A G A +6 (premier nucléotide transcrit souligné)

- un site de fixation de –17 à –6, représenté en rouge (toute mutation sur ce site engendre une baisse d'affinité de la polymérase) ;
- un site d'initiation de – 6 à +6 représenté en bleu (toute mutation modifie peu la fixation de l'enzyme mais perturbe la synthèse d'ARN).

L'initiation de la transcription par l'ARN polymérase T7 nécessite le positionnement correct de l'enzyme sur les promoteurs et forme alors un complexe secondaire fermé spécifique (RPf, figure 4). Une deuxième étape consiste à ouvrir la double hélice d'ADN (Rpo, voir figure 4), le complexe est alors thermodynamiquement instable. Il incorpore les premiers nucléotides de la chaîne d'ARN et forme ainsi le complexe ternaire polymérase/ADN/ARN (RPi, figure 4). Lorsque l'ARN naissant atteint une longueur de 9 à 12 nucléotides, il doit être déplacé dans un canal formé dans la région N-terminale de l'enzyme, pour éviter l'arrêt de la transcription. Le complexe change alors de conformation pour stabiliser le complexe ternaire, i.e. l'enzyme bascule en phase d'élongation, très stable et processive (complexe transcriptionnellement compétent RPt, figure 4). Le mouvement de la

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

polymérase sur la matrice et la capacité à fixer ce début de transcrit dans le tunnel influencent l'efficacité de l'initiation de transcription.

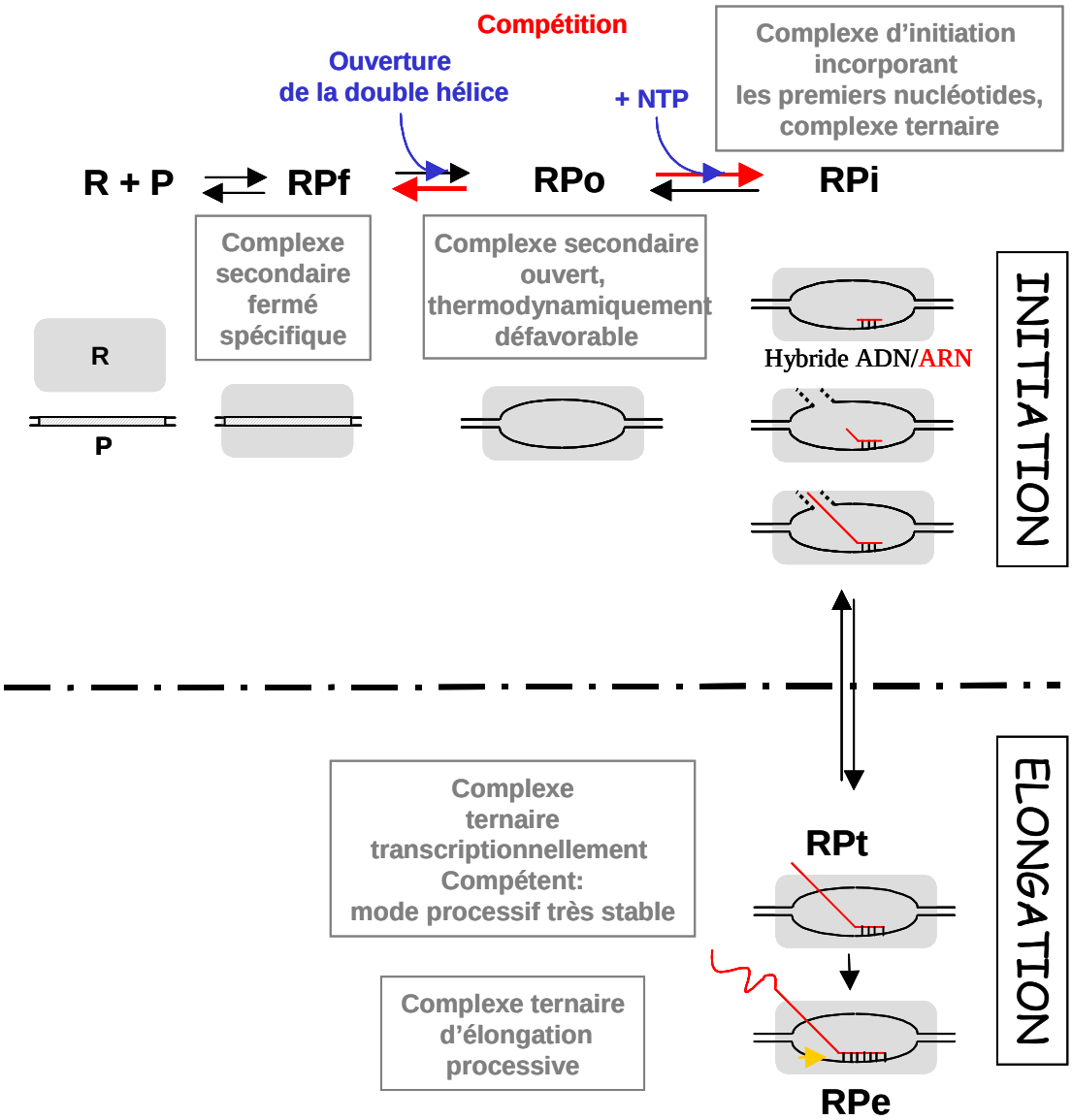


Figure 4 : Schéma représentant les stades de transitions observés lors du mécanisme d'initiation de transcription par l'ARN polymérase T7.

La figure est modifiée d'après Kochetkov SN, FEBS, 1998 et PNAS, 2001. La matrice ADN est représentée en noire, l'ARN naissant en rouge, et R signifiant « ARN polymérase » ; P : « Promoteur » ; RPf : complexe secondaire ARN pol/Promoteur fermé ; Rpo : ARN pol/Promoteur ouvert ; RPi : complexe d'initiation ; RPt : Complexe transcriptionnellement compétent ; RPe : Complexe en élongation.

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

III.B.2 Comparaison du fonctionnement des enzymes de type phagique et des NEP

Un alignement de l'ARN polymérase T7 et de ses homologues est présenté sur la figure 5. Il montre le degré de conservation de ces ARN polymérases organellaires monomériques avec les enzymes phagiques. Le degré de conservation croît de l'extrémité N-terminale, portion très variable, à l'extrémité C-terminale, bien conservée, et regroupant les régions fonctionnellement importantes (Cermakian *et al.* 1996). Les masses moléculaires varient de 100 kDa à 140 kDa selon l'organisme. L'alignement montre également une conservation des résidus critiques pour l'activité catalytique et des domaines fonctionnels (Sousa *et al.* 1993). Néanmoins les enzymes NEP sont délétées de 5 à 6 résidus dans une région impliquée dans la discrimination des promoteurs phagiques et situés dans la boucle de spécificité (Raskin *et al.* 1993). Cette donnée suggère que, contrairement aux ARN polymérases phagiques, les NEP sont incapables de reconnaître et/ou d'initier seules une transcription efficace. Elles nécessiteraient l'intervention de facteurs responsables de la reconnaissance des séquences promotrices. L'analyse des promoteurs NEP des plantes avaient conduit également à l'hypothèse de l'existence de facteurs de sélectivité (Silhavy & Maliga 1998b; Liere & Maliga 1999). Actuellement, le mécanisme d'initiation de la transcription dans les mitochondries est beaucoup plus étudié chez la levure, l'homme et les animaux que chez les plantes. Nous allons présenter quelques points établis pour ces modèles, afin de mieux comprendre ce qui pourrait se passer dans les organites semi-autonomes des végétaux.

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

```
                 10        20        30        40        50        60        70        80
                  |         |         |         |         |         |         |         |
RPO41   MLRPAYKSLVKTSLLQRRLISSKGSKLFKPSPDSTSTILISEDPLVTGSSPTSSTTSGIISSNDFPLFNKNRKDAKSSIS
POLRMT  ---MSALCWGRGAAGLKRALRPCGRPGLPGKEGTAGGVCGPRR--SSSASPQEQDQDRRKDWGHVELLEVLQARVR---Q
T7      ------------------------------------------------------------------------------
                 90       100       110       120       130       140       150       160
                  |         |         |         |         |         |         |         |
RPO41   YQWKNPSELEFDPFNKSHASAVTSMTRTRDVMQLWSLLEACLQSNLMKRAFSILES-LYLVPEHKQRFIEDYNMYLNSFS
POLRMT  LQAESVSEVVVNRVDVARLPECGSGDGSLQPPRKVQMGAKDATPVPCGRWAKILEKDKRTQQMRMQRLKAKLQMPFQSGE
T7      ------------------------------------------------------------------------------
                170       180       190       200       210       220       230       240
                  |         |         |         |         |         |         |         |
RPO41   KNDPNFPILKMNEKLTNDLETSFKDVNYNDKTLAIMIHHALNFHSTTSSMLLKPIIS---AYLKMSVNG-IREIFSCLDI
POLRMT  FKALTRRLQVEPRLLSKQMAGCLEDCTRQAPESPWEEQLARLLQEAPGKLSLDVEQAPSGQHSQAQLSGQQQRLLAFFKC
T7      ------------------------------------------------------------------------------
                250       260       270       280       290       300       310       320
                  |         |         |         |         |         |         |         |
RPO41   LTISDLNILMNDLKVITPSQLPNSVRPILESLTLSPTPVNNIENEEGLNKVEAENDSKLHKASNASSDSIKKPSLDPLRE
POLRMT  CLLTDQLPLAHHLLVVHHGQRQ---KRKLLTLDMYNAVMLGWARQGAFKELVY----VLFMVKDAG---LTPDLLSYAAA
T7      --MNTINIAKNDFSDIELAAIP------------FNTLADHYG-ER--------------LAREQL-----A----LEHE
                330       340       350       360       370       380       390       400
                  |         |         |         |         |         |         |         |
RPO41   VSFHGSTEVLSKDAEKLIAVDTIGMRVIRHTLLGLSLTPEQKEQISKFKFDANDNVLKMKPTKNDDNNNSINFFEIYN--
POLRMT  LQCMGRQDQDAGTIERCLEQMSQEGLKLQALFTAVLLSEEDRATVLKAVHKVKP-TFSLPPQLPPPVNTSKLLRDVYAKD
T7      SYEMG-EARFRKMFERQLKAGEVADNAAAKPLITTLLP--------KMIARINDWFEEVKAKRGKRPTAFQFLQEIKP--
                410       420       430       440       450       460       470       480
                  |         |         |         |         |         |         |         |
RPO41   -SLPTLEEKKAFESALNIFNQDRQKVLENRATEAARERWKHDFEEAKARGDISIEKNLNVKLWKWYNEMLPLVKEEINHC
POLRMT  GRVSYPKLHLPLKTLQCFFEKQLHMELASRVCVVSVEKPTLPSKEVKH---A--RKTLKTLRDQWEKALCRALRETKN--
T7      EAVAYITIKTTLACLTSADNTTVQAVAS-------------------------------------AIGRAIEDEAR--
                490       500       510       520       530       540       550       560
                  |         |         |         |         |         |         |         |
RPO41   RSLLSEKLSDKKGLNKVDTNRLGYGPYLTLIDPGKMCVITILELLKLNSTGGVIEGMRTARAVISVGKAIEMEFRSE---
POLRMT  -----------RLEREVYEGRFSLYPFLCLLDEREVVRMLLQVLQALPAQGESFTTLARELSARTFSRHVVQRQRVSGQV
T7      -------------------------------------------------------FGRIRDLEAKHFKKNVEEQLNKR---
                570       580       590       600       610       620       630       640
                  |         |         |         |         |         |         |         |
RPO41   QVLKSESQAFRDVNKKSPEFKKLVQNAKSVFRSSQIEQSK-ILWPQSIRARIGSVLISMLIQVAKVSVQGVDPVTKAKVH
POLRMT  QALQNHYRKYLCLLASDAEVPEPCLPRQYWEELGAPEALREQPWPLPVQMELGKLLAEMLVQATQMPCSLDKPHRSSRLV
T7      -VGHVYKKAFMQVVEAD-------MLSKGLLGGEAWSS-----WHKEDSIHVGVRCIEMLIESTGM-VS-----------
                650       660       670       680       690       700       710       720
                  |         |         |         |         |         |         |         |
RPO41   GEAPAFAHGYQYHNGSKLGVLKIHKTLIRQLN-GERLIASVQPQLLPMLVEPKPWVNWRSGGYHYTQSTLLRTKDSPEQV
POLRMT  ---PVLYHVYSFRNVQQIGILKPHPAYVQLLEKAAEPTLTFEAVDVPMLCPPLPWTSPHSGAFLLSPTKLMRTVEGATQH
T7      ---LHRQNAGVVGQDSET--IELAPEYAEAIATRAGALAGISPMFQPCVVPPKPWTGITGGGYWANGRRPLALVR--THS
                730       740       750       760       770       780       790       800
                  |         |         |         |         |         |         |         |
RPO41   AYLKAASDNGDIDRVYDGLNVLGRTPWTVNRKVFDVVSQVWN-KGEGFLDIPGAQ-DEMVLPP--APPKNSDPSILRAWK
POLRMT  QELLETCPPTALHGALDALTQLGNCAWRVNGRVLDLVLQLFQAKGCPQLGVPAPP-SEAPQPPEAHLPHSAAPARKAELR
T7      KKALMRYEDVYMPEVYKAINIAQNTAWKINKKVLAVANVITKWKHCPVEDIPAIEREELPMKP---EDIDMNPEALTAWK
                810       820       830       840       850       860       870       880
                  |         |         |         |         |         |         |         |
RPO41   LQVKTIANKFSSDRSNRCDTNYKLEIARAFL-GEKLYFPHNLDFRGRAYPLSPHFNHLGNDMSRGLLIFWHGKKLGPSGL
POLRMT  RELAHCQKVAREMHSLRAEALYRLSLAQHLR-DRVFWLPHNMDFRGRTYPCPPHFNHLGSDVARALLEFAQGRPLGPHGL
T7      RAAAAVYRKDKARKSRRISLEFMLEQANKFANHKAIWFPYNMDWRGRVYAVS-MFNPQGNDMTKGLLTLAKGKPIGKEGY
                890       900       910       920       930       940       950       960
                  |         |         |         |         |         |         |         |
RPO41   KWLKIHLSNLFGFDK-LPLKDRVAFTESHLQDIKDSAENPLTGDRWWTTADKPWQALATCFELNEVMKMDNPEEFISHQP
POLRMT  DWLKIHLVNLTGLKKREPLRKRLAFAEEVMDDILDSADQPLTGRKWWMGAEEPWQTLACCMEVANAVRASDPAAYVSHLP
T7      YWLKIHGANCAGVDK-VPFPERIKFIEENHENIMACAKSPLEN-TWWAEQDSPFCFLAFCFEYAGVQHHG--LSYNCSLP
                970       980       990      1000      1010      1020      1030      1040
                  |         |         |         |         |         |         |         |
RPO41   VHQDGTCNGLQHYAALGGDVEGATQVNLVPSDKPQDVYAHVARLVQKRLEIAAEKGDE---------------------
POLRMT  VHQDGSCNGLQHYAALGRDSVGAASVNLEPSDVPQDVYSGVAAQVEVFRRQDAQRGMR---------------------
T7      LAFDGSCSGIQHFSAMLRDEVGGRAVNLLPSETVQDIYGIVAKKVNEILQADAINGTDNEVVTVTDENTGEISEKVKLGT
               1050      1060      1070      1080      1090      1100      1110      1120
                  |         |         |         |         |         |         |         |
RPO41   ---NAKILKDKITRKVVKQTVMTNVYGVTYVGATFQIAKQ-LSPIFDDRKE-----SLDFSKYLTKHVFSAIRELFHSAH
POLRMT  ---VAQVLEGFITRKVVKQTVMTVVYGVTRYGGRLQIEKR-LRELSDFPQEF----VWEASHYLVRQVFKSLQEMFSGTR
T7      KALAGQWLAYGVTRSVTKRSVMTLAYGSKEFGFRQQVLEDTIQPAIDSGKGLMFTQPNQAAGYMAKLIWESVSVTVVAAV

               1130      1140      1150      1160      1170      1180      1190      1200
                  |         |         |         |         |         |         |         |
RPO41   LIQDWLGESAKRISKSIRLDVDEKSFKNGNKPDFMSSVIWTTPLGLPIVQPYREESK-KQVETNLQTVFISDPFAVN---
POLRMT  AIQHWLTESARLISHMG-----------------S-VVEWVTPLGVPVIQPYRLDSKVKQIGGGIQSITYTHNGDISR--
T7      EAMNWLKSAAKLLAAEVK------DKKTGEILRKRCAVHWVTPDGFPVWQEYKKPIQTRLNLMFLGQFRLQPTINTNKDS
```

Figure 5: Alignement des séquences primaires des ARN polymérases du bactériophage T7 (ARNpol T7) et des ARN polymérases mitochondriales de l'Homme (POLRMT) et de la levure S. cerevisiae (RPO41).

Cet alignement a été établi par le logiciel Clustalw (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/align_clustalw.pl). Les acides aminés identiques et à propriétés similaires sur les trois séquences sont indiqués respectivement en rouge et en bleu ; les acides aminés représentés en vert correspondent à des résidus conservés sur deux séquences. La région surlignée en gris (résidus 742 à 773) de l'ARN pol T7 est responsable de la reconnaissance spécifique des promoteurs (boucle de spécificité, Rong et al. 1998). Le domaine N-terminal ATD de la polymérase de levure RPO41, s'étendant sur environ 472 résidus (Wang & Shadel 1999) est surlignée en jaune ;

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

III.B.2.1 *Propriétés des ARN polymerases mitochondriales de S.cerevisiae (RPO41) et de l'Homme (POLRMT)*

Les deux ARN polymérases mitochondriales de *Saccharomyces cerevisiae,* RPO41, (Masters *et al.* 1987) et de l'Homme, POLRMT, présentent une particularité par rapport à l'ARN polymérase T7. Elles comportent une extension en N-terminale (Amino Terminal Domain, ou ATD chez la levure) d'environ 40 kDa (figure 5).

L'ARN polymérase mitochondriale humaine a été tout d'abord identifiée par des approches de purification biochimique à partir de cellules HeLa par Shuey D. et Attardi G (Shuey & Attardi 1985). Ces auteurs ont mis en évidence des similitudes de comportement avec l'ARN polymérase mitochondriale de levure (notamment grande sensibilité à la force ionique et aux ions Mn^{2+}). Le clonage du gène codant pour cette enzyme a permis confirmer une homologie avec les ARN polymérases phagiques (Tiranti *et al.* 1997).

La fonction de cette partie N-terminale a été bien caractérisée chez la levure. Elle est essentielle à la réplication et par conséquent au maintien du génome mitochondrial (Clayton 1991 ; Wang & Shadel 1999). Elle est également impliquée dans le couplage de la transcription (matricielle)- traduction (associée à la membrane interne), la connexion étant établie par des protéines de la matrice mitochondriale.

Ces ARN polymérases monomériques sont incapables d'initier seules une transcription efficace (Fisher *et al.* 1987). Cependant, RPO41 présente une capacité intrinsèque à interagir, avec une certaine spécificité, avec des séquences nucléotidiques de type $(AT)_n$ (Levens *et al.* 1981a; Levens *et al.* 1981b), assez proche du consensus des promoteurs mitochondriaux de levure. Elle est également capable de reconnaître et d'initier une transcription à partir d'un promoteur fourni dans une configuration ouverte (Matsunaga & Jaehning 2004a; Matsunaga & Jaehning 2004b).

Gaspari M. et collaborateurs (Gaspari *et al.* 2004a), ont récemment mis en évidence que POLRMT semble être le seul composant de la machinerie transcriptionnelle capable de reconnaître, *in vitro*, les séquences promotrices mitochondriales avec une grande spécificité. Leurs travaux expliquent pourquoi les ARN polymérases mitochondriales ne sont pas interchangeables entre différentes espèces. La POLRMT, bien qu'incapable de se fixer seule sur l'ADN sans protéines accessoires *in vivo*, assure sans doute la reconnaissance spécifique des promoteurs. Ceci a également été conclu par Matsunaga et Jaehning pour la mitochondrie

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

de levure (Matsunaga & Jaehning 2004b). Cette propriété pourrait être commune à toutes les ARN polymérases mitochondriales.

III.B.2.2 *Mécanismes d'initiation de la transcription des génomes mitochondriaux chez S. cerevisiae et l'Homme*

La structure des génomes mitochondriaux ainsi que les facteurs mis en jeu lors des phases d'initiation de la transcription diffère chez ces deux modèles. Nous allons brièvement présenter l'organisation de ces deux génomes mitochondriaux et comparer leur organisation aux génomes des organites des végétaux supérieurs. Nous présentons ensuite les mécanismes mis en jeu lors de l'initiation de la transcription des gènes mitochondiaux en introduisant les facteurs engagés avec les ARN polymérases dans cette phase.

III.B.2.2.1. Structure des génomes mitochondriaux de *S. cerevisiae* et de l'Homme

Ces deux génomes codent essentiellement pour quelques protéines impliquées dans la chaîne respiratoire ainsi que des éléments de l'appareil traductionnel : protéines ribosomales, ARNr et ARNt. Tous les composants de la machinerie transcriptionnelle mitochondriale sont codés et contrôlés par le noyau.

Le génome mitochondrial de *S. cerevisiae* est circulaire, et représente 85 kpb. Il est peu dense en gènes ; les régions intergéniques représentent les 2/3 du génome (Foury *et al.* 1998). Il comporte des promoteurs multiples (Christianson & Rabinowitz 1983), contrôlant des gènes pouvant s'organiser en opérons. Les gènes peuvent parfois aussi intégrer des introns. Ils comportent des promoteurs consensus de type ATATAAGTA (le premier nucléotide transcrit est souligné). Les variations d'expression géniques liées à la phase d'initiation ne sont pas définies par ce consensus mais par la nature des nucléotides situés en aval, et en particulier en +2 et +3 (si pyrimidine, le promoteur est plutôt faible, si purine, le promoteur est plutôt fort) (Mangus *et al.* 1994 ; Christianson & Rabinowitz 1983).

Le génome mitochondrial de l'Homme est circulaire et petit (16,6 kpb). Il est dense et moins complexe dans son organisation que les génomes mitochondriaux de *S. cerevisiae* et des organites des végétaux supérieurs : il ne possède pas d'introns, et ses séquences intergéniques sont très réduites (Shadel & Clayton 1997). En effet, les régions non codantes majeures sont les séquences promotrices et les origines de réplication regroupées dans une même région dite boucle D ou « D-loop ». En revanche, un point remarquable par rapport aux levures et aux végétaux est que seuls trois promoteurs sont mis en jeu pour transcrire les deux

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

brins du chromosome (brin H, « Heavy » ou brin lourd et ; brin L, « Light » ou brin léger) (Chang & Clayton 1985; Chang *et al.* 1986). Deux promoteurs majeurs, HSP1 et LSP (Bogenhagen *et al.* 1984) («Heavy Strand Promoter 1 » et « Light Strand Promoter ») sont à l'origine de deux longs transcrits représentant quasiment l'intégralité des informations codantes des deux brins respectifs. Le promoteur mineur, HSP2 initie la synthèse de deux ARNr. Les deux longs transcrits polycistroniques sont par la suite maturés et épissés (Clayton 1991; Ojala *et al.* 1981). Par conséquent, toute variation dans le profil d'expression des gènes mitochondriaux les uns par rapport aux autres doit relever de régulations post-transcriptionnelles.

III.C. Facteurs de sélectivité associés aux ARN polymérases mitochondriales de la levure *S. cerevisiae* et l'Homme

III.C.1 Facteurs de type MTFB (Mitochondrial Transcription Factor B)

L'initiation de la transcription sur les promoteurs mitochondriaux requiert notamment un facteur de spécificité homologue chez la levure et chez l'Homme : les facteurs de type TFB, nommés MTF1 (Mitochondrial Transcription Factor 1) chez *S. cerevisiae* et TFBM chez l'Homme (Mitochondrial TFB).

Ces facteurs présentent des similitudes, particulièrement dans leur structure tertiaire, avec une grande famille d'ADN/ARN méthyl transférases, et plus particulièrement avec des ARNr methyl transférases universelles de type Erm (Schubot *et al.* 2001; McCulloch *et al.* 2002). Ces enzymes ajoutent spécifiquement un groupement méthyl sur deux adénines situées sur une structure tige-boucle très conservée en 3' de l'ARNr au cours de la biogenèse des ribosomes mitochondriaux (Schluckebier *et al.* 1999) (figure 6A). Les protéines bifonctionnelles ne sont pas rares chez les organites (Chen *et al.* 2005). Ce sont par exemple, l'aconitase 1 chez la levure, enzyme du cycle de Krebs assurant également le maintien du génome mitochondrial ; et la protéine plastidiale CND41 du tabac qui présente une activité de protéase et est associée aux nucléoïdes (cité dans Sato 2001).

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

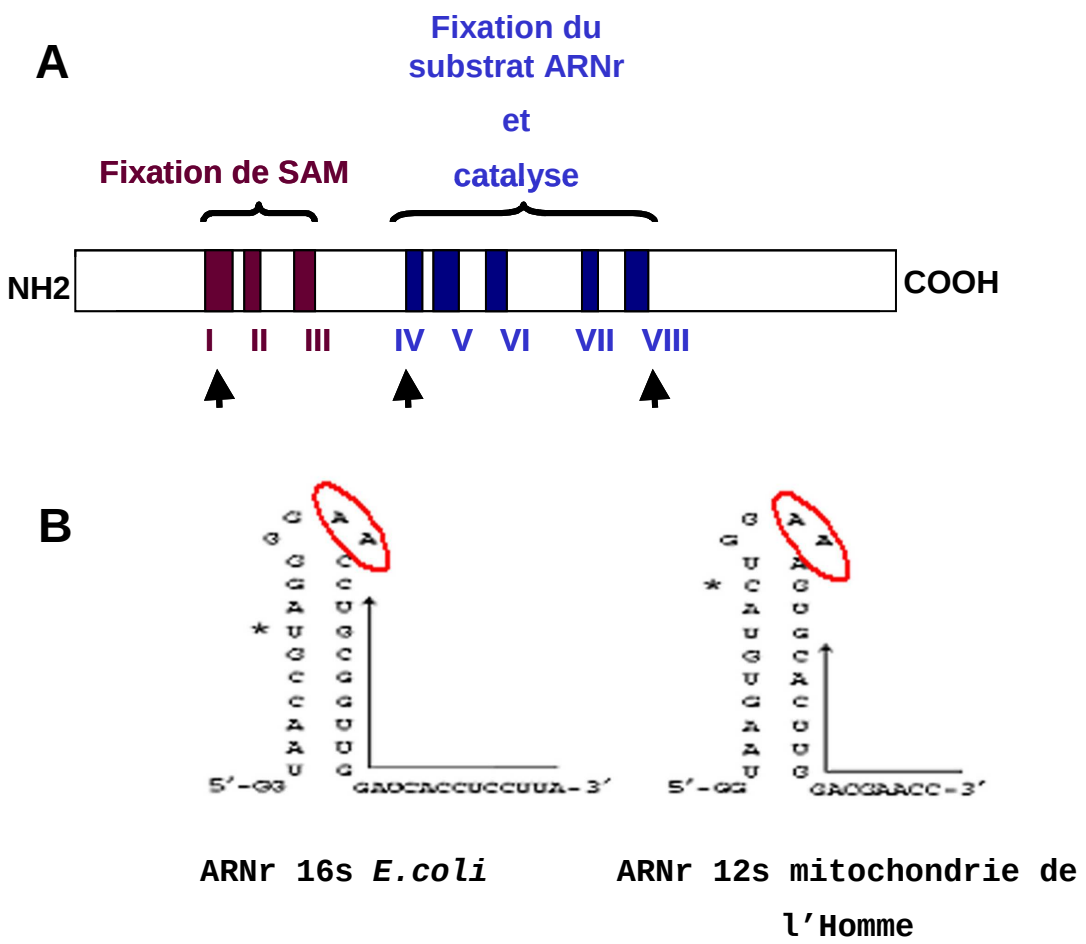


Figure 6 : Représentation schématique des régions à fonction ARNr methyl transférase des facteurs de sélectivité mitochondriaux de type TFB (A) ainsi que de leurs substrats (B).

A : Les huit domaines sont (indiqués en chiffre romains et sous forme de boîtes violettes. Les domaines I à III interviennent dans la fixation du donneur de groupement méthyl (SAM, S-adénosyl méthionine) et les domaines IV à VIII fixent le substrat de la réaction (ARNr) et effectuent la catalyse. Les domaines mutés dans les travaux de Mc Cullogh et Shadel (McCulloch & Shadel 2003) sont indiqués par des flèches ; B : Les deux bases adénines substrats des ARNr méthyl transférases de type Erm sont localisées sur la structure tige-boucle en 3' des ARNr des petites sous unités ribosomiques. Elles sont entourées en rouge .

Le facteur TFB est une protéine bifonctionnelle chez l'Homme, et chez la levure, il aurait été recruté au cours de l'évolution dans la machinerie transcriptionnelle. Chez l'Homme, Mc Cullogh et collaborateurs ont montré par des expériences de mutagenèse dirigée que des résidus critiques pour l'activité methyl transférase (Figure 6B) n'altèrent pas la capacité de la protéine à initier une transcription efficace *in vitro*. Par conséquent, les fonctions de facteur de transcription et d'ARNr methyl transférase de la protéine TFBM chez l'Homme sont totalement indépendantes l'une de l'autre (McCulloch & Shadel 2003).

III.C.2 Facteur de spécificité MTF1 chez *S. cerevisiae*

Chez *S. cerevisiae*, le complexe d'initiation de transcription implique uniquement un hétérodimère formant l'holoenzyme (Winkley *et al.* 1985) constitué d'une ARN polymérase

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

monomérique, RPO41 (Masters *et al.* 1987) et d'un facteur de spécificité, MTF1 (Schinkel *et al.* 1987).

MTF1 s'associe plutôt de façon non spécifique à l'ADN (Shadel & Clayton 1995). *In vivo*, il est essentiel pour initier une transcription efficace (Winkley *et al.* 1985; Schinkel *et al.* 1987). Certaines mutations de MTF1 provoquent une diminution de l'efficacité de l'initiation de transcription par l'holoenzyme si le promoteur est dans une forme fermée. L'efficacité est rétablie si le promoteur fourni est en conformation ouverte (Shadel & Clayton 1995). MTF1 semble par conséquent jouer un rôle important dans l'ouverture de la double hélice au niveau des séquences promotrices. Par ailleurs, l'excès de MTF1 dans des tests de transcription *in vitro* augmente la stabilité du complexe d'initiation. Il provoque par conséquent un déséquilibre lors du passage de la phase d'initiation en phase d'élongation processive et complète (Matsunaga & Jaehning 2004b) conduisant à la production de transcrits abortifs.

MTF1 interagit notamment avec deux régions de l'ARN polymerase mitochondriale, d'une part, au niveau des structures responsables de l'ouverture du promoteur et de la stabilisation du complexe ouvert observées chez la T7 ARN polymerase (voir figures 3 et 4) (Cliften *et al.* 2000) (1) ; et d'autre part, il s'associe avec la région correspondant au canal se sortie de la chaîne d'ARN néosynthétisée chez l'homologue phagique (Cliften *et al.* 2000 ; Matsunaga & Jaehning 2004a; Tahirov *et al.* 2002 ; Yin & Steitz 2002) (voir figures 4 et 5). La nature des interactions avec l'ADN et la polymérase peut aider à mieux comprendre le mécanisme de l'initiation de la transcription.

III.C.3 Facteurs de transcription TFBM chez l'Homme

Les facteurs TFBM sont des protéines basiques, affines pour l'ADN, et tout comme leurs homologues chez la levure, ils ne semblent pas posséder de spécificité pour une séquence donnée. Il existe chez l'Homme deux facteurs, TFBM1 et TFBM2. Ils sont tous les deux capables de participer à l'initiation de la transcription mais le facteur TFBM2 semble être deux fois plus actif que TFBM1 dans les conditions de transcription *in vitro* testées (Falkenberg *et al.* 2002).

Contrairement à *S. cerevisiae*, les facteurs TFBM associés à l'ARN polymérase mitochondriale ne suffisent pas pour initier une transcription efficace chez l'Homme. Un troisième partenaire est indispensable au complexe POLRMT-TFBM pour assurer une activation de la transcription à partir des promoteurs mitochondriaux : le facteur TFAM (Falkenberg *et al.* 2002 ; Gaspari *et al.* 2004a).

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

III.C.4 Facteur de transcription TFAM dans la mitochondrie humaine

Le facteur TFAM est également une protéine bifonctionnelle. Il assure un rôle de facteur de transcription (Dairaghi *et al.* 1995a; Dairaghi *et al.* 1995b; Fisher & Clayton 1988; Fisher *et al.* 1992) et il est indispensable au maintien et à la réplication du génome mitochondrial (Ekstrand *et al.* 2004 ; Kanki *et al.* 2004).

Le facteur TFAM ressemble aux protéines nucléaires à boîtes HMG (« High Mobility Group ») (Parisi & Clayton 1991). Les protéines à boîtes HMG sont d'une part riches en acides aminés basiques, leur conférant la capacité d'interagir avec l'ADN sans grande spécificité. D'autre par, leur région C-terminale est riche en aminoacides acides assurant une interaction avec les histones nucléaires. Les protéines HMG sont capables de se fixer à l'ADN sans spécificité et d'introduire une courbure de la double hélice. Les propriétés du facteur TFAM sont proches d'un facteur de transcription puisqu' il présente une extension C-terminale (25 résidus) (Dairaghi *et al.* 1995a ; Kanki *et al.* 2004) qui lui permet d'interagir sur une séquence cis spécifique située juste en amont du promoteur. Cette région est définie entre - 40 à - 11 (Gaspari *et al.* 2004a). D'autre part, le facteur TFAM se comporte comme un véritable activateur de l'initiation de la transcription (Fisher & Clayton 1988; Fisher *et al.* 1992, Dairaghi *et al.* 1995b ; Gaspari *et al.* 2004a).

Il est également capable d'homopolymériser sous forme de tétramères (Antoshechkin *et al.* 1997). Il se fixe en amont des promoteurs pour induire une courbure de l'ADN et rendre ainsi les séquences promotrices accessibles à l'ARN polymérase (Fisher *et al.* 1992). Un positionnement strict du tétramère est indispensable pour assurer une activation de la transcription (Dairaghi *et al.* 1995b). Ce facteur TFAM est indispensable pour obtenir un taux de transcription élevé.

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

III.C.4.1 *Modèles d'initiation de la transcription des génomes mitochondriaux*

III.C.4.1.1. Chez *S. cerevisiae*

Le modèle actuel proposé pour expliquer l'initiation de la transcription des gènes mitochondriaux de *S. cerevisiae* est relativement simple car il ne fait intervenir que deux partenaires : l'ARN polymérase monomérique de type phagique RPO41 et un facteur de spécificité de type TFB, le facteur MTF1.

L'ARN polymérase mitochondriale présente une capacité intrinsèque à reconnaître les séquences promotrices. Le facteur MTF1 est chargé de recruter RPO41 sur l'ADN (complexe fermé RPf, voir figure 4). Dès lors, ce complexe holoenzyme engendre l'ouverture de la double hélice au niveau du promoteur, créant ainsi les conditions favorables à l'interaction spécifique polymérase/promoteur et stabilisant le complexe d'initiation pour assurer une transcription efficace (complexe ouvert Rpo). MTF1 est finalement relargué après la progression du transcrit de quelques nucléotides (Mangus *et al.* 1994). La libération du facteur MTF1 se fait soit par compétition entre le brin ARN en cours de synthèse et le facteur MTF1 pour l'accès au canal de sortie de l'ARN néosynthétisé (Matsunaga & Jaehning 2004b) ; soit par changements conformationnels de la polymerase sortant de la phase d'initiation et rentrant dans la phase d'élongation.

III.C.4.1.2. Chez l'Homme

Comme nous l'avons vu précédemment, la transcription du génome mitochondrial humain fait intervenir plus de partenaires à l'ARN polymérase que chez la levure ; tous, également, codés par le noyau.

Le facteur TFBM recrute l'ARN polymérase POLRMT, mais cet hétérodimère requière la fixation d'un second facteur, TFAM, afin de pouvoir reconnaître et se fixer sur les séquences promotrices. Le facteur TFAM lie l'ADN grâce à son extrémité C-terminale sous forme d'un tétramère (Gaspari *et al.* 2004a). Le positionnement entre les positions –17 et -20 est impératif pour engendrer la courbure de l'ADN nécessaire à l'accès et la reconnaissance des séquences promotrices au complexe POLRMT-TFBM. Tout comme chez la levure (Matsunaga & Jaehning 2004b), Gaspari M. *et al* suggèrent que la polymérase humaine possède intrinsèquement la capacité de reconnaître les séquences promotrices (Gaspari *et al.* 2004a). L'interaction de deux facteurs TFAM et TFBM crée donc les conditions propices ouvrant l'accès du promoteur à la polymérase (Gaspari *et al.* 2004b).

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

Les interactions entre les différents composants de l'appareil transcripionnel ont été étudiés (McCulloch & Shadel 2003) et la figure 7 montre le modèle d'initiation de la transcription chez la mitochondrie humaine suggère que le facteur TFBM forme un pont entre l'ARN polymérase et le facteur TFAM. Cependant, l'ordre des événements d'initiation de la transcription n'est pas encore bien défini : le facteur TFAM se fixerait il tout d'abord sur l'ADN seul, puis TFBM guiderait, par l'intermédiaire de son interaction avec TFAM, le positionnement de la polymérase sur les séquences promotrices ? Ou bien un hétérotrimère se formerait-il avant même toute fixation sur l'ADN ?

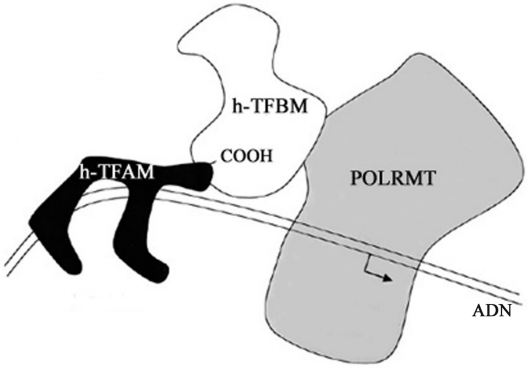


Figure 7 : Modèle proposé par McCulloch et al. (McCulloch & Shadel 2003), des interactions établies entre les protéines intervenant dans le mécanisme d'initiation du génome mitochondrial chez l'Homme

En résumé, les ARN polymérases de type phagiques, tout du moins dans les mitochondries de *S. cerevisiae* et de l'Homme, semblent posséder intrinsèquement, tout comme l'enzyme T7, la capacité de reconnaître les séquences promotrices avec une grande spécificité. Cependant, contrairement à l'ARN polymérase phagique, elle requière l'intervention des facteurs de sélectivité. Ces facteurs agissent non pas dans la reconnaissance spécifique de promoteurs, mais plutôt dans le positionnement de la polymérase et dans l'ouverture de la double hélice. Ils facilitent ainsi les interactions ARN polymérase/promoteur.

Chez les végétaux supérieurs, les mécanismes d'initiation de la transcription des génomes organellaires, NEP dépendant est encore très mal comprise. Les résultats observés chez la levure et l'Homme, laissent penser que les NEP plastidiales et mitochondriales des végétaux pourraient fonctionner avec un ou plusieurs partenaires lors de cette phase d'initiation. Dans les parties suivantes, nous allons présenter les gènes et promoteur contrôlés par les NEP chez les végétaux. On constate que les séquences promotrices ne sont pas aussi

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

bien définies et conservées que chez *S. cerevisiae.* Malgré cela, on peut nommé quelques candidats potentiels au rôle de facteurs de spécificité associés aux NEP chez les végétaux.

III.D. Les ARN polymérases NEP des végétaux supérieurs

III.D.1 Promoteurs NEP dépendants

III.D.1.1 *Dans les mitochondries*

Les promoteurs NEP des végétaux ne sont pas très conservés. Un alignement des séquences promotrices des gènes mitochondriaux de plantes monocotylédones (maïs, blé et orge) a cependant permis de mettre en évidence un petit motif conservé, YATA ou encore YRTA (Binder *et al.* 1996; Covello & Gray 1991; Mulligan *et al.* 1991). Quelques promoteurs mitochondriaux ont été finement analysés par mutagénèse et test d'activité mis en place *in vitro* notamment chez quelques plantes monocotylédones (Rapp & Stern 1992; Rapp *et al.* 1993). Chez les plantes dicotylédones, le cœur des premiers promoteurs mitochondriaux identifiés correspond à un nonanucléotide de type CRTAAGAGA (Giese *et al*. 1996). Récemment, Kühn K. et ses collaborateurs (Kuhn *et al.* 2005) ont apporté de nouvelles informations en réalisant une étude assez large des promoteurs mitochondriaux chez *A. thaliana*. Ils ont ciblé 33 transcrits primaires, c'est à dire directement issus d'une initiation de la transcription, avant la phase d'épissage. Leur analyse a mis en évidence que près de 50 % des promoteurs mitochondriaux étudiés présentent le motif YRTA (bases pyrimidines Y= T ou C, et purines R= A ou G), positionné généralement de – 7 à – 4 par rapport au premier nucléotide transcrit (+1). Il peut être retrouvé seul (variantes ATTA, AGTA, GGTA, AATA) ou incorporé dans une séquence nonanucléotidique consensus : -7 **CGTA**TAT<u>A</u>A +2 ou -7 **CATA**AGA<u>G</u>A +2 (le +1 est souligné et le motif CRTA apparaît en gras). Les 50 % restants sont des promoteurs divergents, ne présentant aucun consensus apparent entre eux. Par ailleurs, Kühn et al (Kuhn *et al.* 2005) mettent en évidence l'existence des promoteurs multiples dans le génome mitochondrial d'une plante dicotylédone. Quelques promoteurs multiples ont été identifiés et analysés dans certains gènes mitochondriaux chez le pois, le maïs, le riz et le sorgho (Kuhn *et al.* 2005; Lupold *et al.* 1999; Yan & Pring 1997; Nakazono *et al.* 1996). Chez Arabidopsis, 9 gènes mitochondriaux présentent plusieurs sites d'initiation de la transcription (*tRNA-fMet, atp9, rrn18, trnK/rps3, orf113/orf101b/orf294/atp1, atp6-1, atp6-2, atp8, atp9, cox2*). Six de ces gènes comportent trois voire 4 promoteurs différents, dont un nonanucléotide consensus toujours placé en aval des autres promoteurs.

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

III.D.1.2 *Dans les plastes*

La plupart des promoteurs NEP plastidiaux a été identifiée chez le tabac (Hajdukiewicz *et al.* 1997; Hubschmann & Borner 1998; Kapoor *et al.* 1997) et chez le maïs (Silhavy & Maliga 1998b). La caractérisation *in vitro* du promoteur de l'opéron plastidial *rpoB* de tabac dans une région étendue sur 1 kpb conduit à identifier la séquence utile et suffisante pour l'initiation de la transcription à une petite région de 15 pb entre –14 et +1. Des expériences de mutagenèse dirigée ont révélé un cœur de 3 nucléotides critiques pour une initiation de la transcription efficace -8 CRT -6. La plupart des promoteurs NEP plastidiaux comportent ce petit motif de type YRT suivi d'une adénine, présentant une forte similitude avec le motif CRTA déduit des alignements de promoteurs mitochondriaux. Ce consensus YRTA, conservé entre plaste et mitochondrie, semble attester de la relation phylogénétique des deux appareils transcriptionnels NEP. En outre, ce système semble être conservé entre les monocotylédones et dicotylédones puisque des extraits plastidiaux bruts d'un mutant *ΔrpoA* de tabac parviennent, *in vitro*, à initier efficacement la transcription à partir du promoteur *PrpoB* de maïs (Liere & Maliga 1999).

Des promoteurs dits « multiples » existent également dans les gènes plastidiaux. L'analyse des promoteurs des mutants déficients en PEP (mutant *albostrians* de l'orge et mutants *Δrpo* de tabac) avait permis de classer les gènes plastidiaux en trois catégories :

1. les gènes sous dépendance exclusive de la PEP,
2. les gènes à promoteurs multiples, PEP et NEP, majoritaires,
3. les gènes dépendants de la NEP exclusivement, représentant essentiellement des gènes codant pour des produits dits « de ménage » ou encore des fonctions génétiques (Trifa *et al.* 1998; Fan *et al.* 2005), tels que l'opéron *rpoB-C1-C2* , et le gène *accD*.

Cependant, des études comparatives plus récentes du profil d'expression des gènes plastidiaux à partir de feuilles de tabac sauvage et du mutant transplastomique déficients en PEP, remettent en cause cette classification. Legen *et al*. (Krause *et al.* 2000; Legen *et al.* 2002) ont adopté une approche génomique à l'aide de puce à ADN (ADNc matures amplifiés par PCR et fixés) pour réaliser une analyse globale, en variant la nature des sondes libres à hybrider : des transcrits néosynthétisés obtenus par la technique de « run-on », et des transcrits matures marqués en 5' par la PNK (polynucleotide kinase). Après confirmation par northern blot et des expériences d'extension d'amorces et par immunodétections, les auteurs suggèrent que le phénotype observé chez ces mutants ne repose pas sur une diminution de la transcription liée à l'absence de la PEP. Ils suggèrent plutôt une perturbation de la régulation

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

génique post-transcriptionnelle due à une instabilité des messagers produits par la NEP, et/ou une dégradation très rapide des polypeptides correspondants. En fait, tous les gènes plastidiaux semblent être transcrits en l'absence de la PEP. Ces travaux ne permettent pas de classer les gènes du plastome selon une régulation spécifique PEP ou NEP dépendante. Mais ils soulignent une implication plus complexe de NEP dans le système génétique par rapport à ce qui était pensé précédemment.

Il est probable qu'une fonction de la polymérase de type phagique est d'assurer une expression accrue de la PEP à certains stades du développement notamment au cours de l'ontogenèse du chloroplaste. L'activité NEP semble être plus importante au cours de la différenciation des proplastes en chloroplastes, et particulièrement aux stades très précoces du développement de la jeune plantule. Elle peut par conséquent précéder l'activité PEP au cours de la germination (Hajdukiewicz *et al.* 1997). Mais cette idée reste encore à démontrer. Les interactions entre les différentes ARN polymérases plastidiales au cours du développement et dans l'expression tissu spécifique des gènes organellaires sont finalement très complexes.

III.D.2 Facteurs de transcription associés aux NEP chez les végétaux

Chez les végétaux, peu de candidats ont été identifiés jusqu'ici : un facteur de 63 kDa intervenant dans la transcription du gène *cox2* chez les mitochondries de blé, p63 (Ikeda & Gray 1999a) ; et le facteur CDF2, intervenant dans l'initiation de transcription de l'opéron rDNA chez le chloroplaste d'épinard (Bligny *et al.* 2000).

Ils ont tous été mis en évidence après quelques étapes de purification biochimiques à partir d'extraits mitochondriaux ou plastidiaux. Ces protéines ont été caractérisées pour les propriétés suivantes:

affinité pour l'ADN, pour des séquences spécifiques ou non ; peut être vérifiée par des expériences de retard sur gel ;

influence sur la transcription par des tests de transcription *in vitro*.

Depuis, il n'y a pas eu d'autres travaux effectués sur ces protéines. L'existence d'autres facteurs agissant sur un spectre plus large de promoteurs n'a encore été clairement mise en évidence dans les organites des cellules végétales. La situation est d'autant plus complexe dans le chloroplaste qu'au moins deux types de machineries d'origine différentes se partagent l'expression du plastome. En fait, au moment où nous avons commencé nos travaux, peu de données étaient disponibles sur l'appareil transcriptionnel chez les végétaux.

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

Projet de thèse

Le travail de l'équipe « transcription et division du plaste » repose pour une grande partie, sur l'étude des mécanismes de transcription dans le plaste, en prenant comme modèle d'étude des plantes dicotyledones : *Spinacia oleracea,* modèle aisé pour toutes les études biochimiques, et *Arabidopsis thaliana*, modèle pour les études génétiques et moléculaires. Afin de mieux cerner l'appareil transcriptionnel NEP plastidial, les séquences ADNc codant pour des NEP chez l'épinard ont été isolées au sein de notre laboratoire (Lagrange T. et Bligny M. numéros d'accession Y18852 ET Y18853). Un criblage de banque d'ADNc préparée à partir de feuilles d'épinard a mené à l'identification de deux clones. Une comparaison des séquences avec celles connues à l'époque chez d'autres organismes, a montré que ces séquences correspondaient aux ADNc codant pour les deux NEP plastidiales : RPOT ;2 et RPOT ;3. Les plantes dicotylédones possédant a priori 3 ARN polymérases de type phagique, on peut supposer qu'il existe une troisième enzyme.

Par la suite, MA. Hakimi a cherché des candidats potentiels capables d'interagir avec une NEP. Un crible double hybride (système « MATCHMAKER two hybrid system », de Clonetech) a été mis en place à partir d' une banque d'ADNc de rosette d'Arabidopsis, âgées de 3 semaines (banque MATCHMAKER de clonetech), en utilisant comme appât l'ARN polymérase RPOT ;2 d'épinard. Cette stratégie a permis d'identifier deux protéines, très proches, et nommées NIP1 et NIP 2 (NEP Interacting Protein). L'existence d'un 3ème gène homologue, *NIP3*, a été mise en évidence dans le génome nucléaire d'*A. thaliana*. Un seul homologue chez l'épinard a pu être isolé par un criblage de banque d'ADNc de feuilles d'épinard, nommé SoNIP. Nous ne pouvons pas exclure l'existence d'autres protéines NIP chez l'épinard.

Le but de mon travail était de caractériser cette famille de protéines, comprenant des facteurs potentiellement associés aux NEP plastidiales. Pour cela, j'ai rassemblé les informations disponibles *in silico* dans les banques de données afin de définir la famille NIP. D'autre part, en collaboration avec d'autres chercheurs du laboratoire, j'ai tenté de définir leur localisation cellulaire et suborganellaire chez *A. thaliana* et chez l'épinard. Après une étude de l'expression de cette nouvelle famille de gènes et de protéines; j'ai essayé d'identifier, par des méthodes biochimiques, d'autres partenaires éventuels aux protéines NIP, et ainsi de vérifier par une seconde approche l'interaction NIP-NEP observée par le test double hybride. J'ai abordé également des travaux en vue de définir la fonction de ces protéines selon une

approche génétique chez *A. thaliana*, par l'analyse de mutants nuls ou « knock out », mutants « knock down » (exploitant le mécanisme d'ARNi) et récemment de mutants surexpresseurs.

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

MATERIELS ET METHODES

MATERIEL ET METHODES

I. Méthodes d'analyse des acides nucléiques

Sauf indication contraire, le matériel végétal est broyé dans un mortier refroidi régulièrement à l'azote liquide jusqu'à obtenir une poudre fine.

I.A. Extraction rapide d'ADN génomique à partir de feuilles d'*A. thaliana* : criblage de mutants par PCR

Le broyage s'effectue à température ambiante. 25 à 50 mg de matière fraîche sont broyés dans un tube Eppendorf contenant 100 µL de tampon d'extraction (Tris HCl pH 8 ; 0,2 M ; NaCl, 0,25 M ; EDTA 0,025 M ; SDS 0,5 % p/v) à l'aide d'un piston bleu (Polylabo). 100 µL de tampon sont de nouveau ajoutés et le broyage poursuivi. Le broyat est alors vortexé puis centrifugé 5 min à 13-15 000 rpm, à température ambiante. Les acides nucléiques retrouvés dans le surnageant sont alors précipités en ajoutant 200 µL d'isopropanol. Après homogénéisation, un culot est obtenu par une centrifugation à 13-15 000 rpm pendant 5 min à 4°C. Il est alors rincé à l'éthanol 70 %, séché et remis en suspension dans 30 µL d'eau distillée autoclavée. 2 µL de cette suspension sont alors utilisés pour effectuer un criblage par PCR (0,05 µL d'enzyme Taq ADN polymérase Bioline soit 0,25 unité pour une réaction de 25 µL, voir protocole PCR dans partie suivante). Les produits PCR sont séparés sur un gel à 1% d'agarose, TBE 0,5X.

I.B. Extraction des ARN totaux

I.B.1 Préparation d'ARN totaux : application, « northern blot »

Ce protocole, fourni par Dominique Pontier, est adapté à l'hybridation d'acides nucléiques (« northern blot »).

1 à 5 g de MF est utilisée initialement dans ce protocole. La poudre obtenue est transférée dans un tube corex de 15 mL. On ajoute 5 mL de tampon E (Tris.HCl 50 mM, pH 8 ; NaCl 300 mM ; EDTA 5 mM ; SDS 2 % ; Aurin Tricarboxylic Acid ou ATA 2 mM ; β-mercaptoéthanol ajouté avant utilisation à 14 mM final). L'ATA est un puissant inhibiteur des interactions acides nucléiques-protéines, il protége ainsi les ARN de l'action des RNases (Gonzalez *et al.* 1980). Le tube est vortexé 2 min, puis incubé dans la glace pendant au moins

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

10 min. 0,7 mL d'une solution de KCl à 3M sont ajoutés et l'incubation poursuivie dans la glace pendant 15 min. Après une centrifugation de 10 min à 8 000 rpm (rotor JA 14, Beckman), le surnageant est récupéré dans un nouveau tube corex. 2 mL de LiCl 8 M sont ajoutés et les acides nucléiques précipités par une incubation à 4°C pendant la nuit. La sédimentation s'achève par une centrifugation de 10 min à 8 000 rpm. Le culot est repris dans 0,4 mL d'une solution contenant de l'ATA 1 mM. La suspension est alors transférée dans un tube Eppendorf. Les protéines sont éliminées par une précipitation au phénol. 0,1 volume d'acétate de sodium 3 M et 2 volume d'éthanol absolu froid sont alors ajoutés à la phase aqueuse puis le mélange incubé au moins une heure à – 20°C. Une centrifugation de 10 min à 20 000 g permet d'obtenir un culot d'ARN, rincé à l'éthanol 80 % froid. Les ARN sont remis en suspension dans un petit volume de solution contenant de l'ATA 0,1 mM.

I.B.2 Purification rapide d'ARN : criblage rapide pour RT-PCR

Ce protocole est utilisé pour effectuer des transcriptions inverses (Reverse Transcription : RT). Il est adapté de « *Methods in Molecular Biology* », vol. 82 : Arabidopsis protocols; *Preparation and analysis of RNA*, Current protocols ; 4.3.1 (édité par J. Martinez-Zapater et J. Salinas).

Les ARN totaux sont extraits à partir d'environ 500 µL de poudre (tube Eppendorf 1,5 mL). 550 µL de tampon d'extraction (Tris.HCl 0,2M pH 9 ; LiCl 0,4 M ; EDTA 25 mM, SDS 1 %) sont alors ajoutés et le mélange vortexé jusqu'à homogénéisation. Un volume équivalent de phénol est ajouté afin d'éliminer les protéines, l'échantillon est ensuite vortexé. Après une centrifugation de 2 min à 13 000 rpm, à température ambiante, la phase aqueuse est récupérée. L'extraction au phénol est répétée 2 fois , puis suivie d'une précipitation au chloroforme. Les acides nucléiques sont précipités par l'ajout à la phase aqueuse de 55 µL d'acétate de sodium 3 M pH 5,3 et de 1 mL d'éthanol absolu froid suivi d'une incubation de 5 min à – 80°C. Après une centrifugation de 5 min à 13 000 rpm, à 4°C, le surnageant est éliminé. Le culot est resuspendu dans 300 µL de LiCl 2M puis laissé précipiter 10 à 30 min dans la glace. La suspension est alors centrifugée 10 min à 13 000 rpm et à 4°C. Le culot est repris dans 300 µL d'eau distillée autoclavée, auxquels on ajoute 30 µL d'acétate de sodium 3 M pH 5,3 et 600 µL d'éthanol absolu froid. Les ARN sont alors sédimentés lors d'une incubation de 5 min à – 80 °C e t par une centrifugation de 10 min à 13 000 rpm, à 4°C. Le culot est finalement lavé à l'éthanol 70 % froid et séché avant d'être repris dans un petit volume d'eau distillée autoclavée. Les ARN peuvent être stockés à – 80°C.

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

Cette préparation nécessite un traitement à la DNase I pour éliminer l'ADN génomique contaminant avant une réaction de transcription inverse. Le traitement à la DNase I est effectué selon les instructions du fournisseur (Fermentas).

I.C. Méthode de dosage et de contrôle de la qualité des ARN totaux

La qualité de l'échantillon extrait peut être visualisée rapidement en séparant une fraction aliquote sur gel d'agarose 1% (p/v) après une courte migration (front de migration bleu de bromophénol à ≈ 2 cm des puits) (voir description de la préparation de l'échantillon et du gel). Une éventuelle contamination en ADN génomique présentant un haut poids moléculaire peut être observée au dessus des ARN.

Les ARN sont dilués et dosés au spectrophotomètre à 260 nm (Biophotometer, Eppendorf). La qualité et la pureté de la préparation peuvent être évaluées en mesurant les absorbances à 280 nm (protéines) et 320 nm (bruit de fond). La concentration en ARN (µg/mL) est déterminée par la formule suivante,

(A280 – A320) x coefficient d'extinction des ARN x facteur de dilution de l'échantillon dans la cuve ;

coefficient d'extinction des ARN : une unité de DO à 260 nm = 40 µg/mL d'ARN.

I.D. Méthodes de séparation des acides nucléiques par électrophorèse

I.D.1 Séparation de fragments ADN sur gel d'agarose

La séparation des fragments d'ADN est obtenue par migration électrophorétique sur gel d'agarose dans du tampon TBE 0,5X. Le gel d'agarose est préparé dans le même tampon (TBE 10X : tris 1M, acide borique 1M, EDTA 25 mM), auquel on ajoute 1µL de BET pour 50 mL de gel (solution stock de BET à 10mg/ml dilué de l'eau distillée, et conservé à l'abri de la lumière). La concentration en agarose varie entre 0,7 et 2% (p/v) en fonction de la taille des fragments à isoler (Sambrook J *et al.* 1989). Les échantillons sont préparés dans un tampon de dépôt (tampon de dépôt 10X : gylcérol stérile 30% v/v, bleu de bromophénol 0, 25 % p/v, xylène de cyanol 0,25% p/v, qsp eau stérile). La migration est réalisée sous voltage constant (20 V/cm de gel). L'ADN est visualisé à 320 nm, grâce au BET, agent intercalant des acides nucléiques.

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

I.D.2 Electrophorèse en conditions dénaturantes: séparation des ARN totaux

Un gel d'agarose 1,2% (p/v) / formaldéhyde 6,6% (p/v) est préparé dans 150 mL final de tampon de migration 1X (20 mM MOPS; 1 mM EDTA; 1 mM acétate de sodium; pH 7). Les échantillons (20 µg et 30 µg d'ARN totaux de plantules âgées de 7 jours, racines, feuilles et fleurs d'Arabidopsis) sont dénaturés en présence de 9 µL de tampon de dépôt (5 µL formamide ; 2 µL formaldéhyde ; 1 µl de tampon de migration 10X ; 1µl de BET à 400µg/mL) par un traitement de 10 min à 65°C avant dépôt. L'électrophorèse est effectuée dans du tampon de migration 1X ; à 3 V/cm de gel, et stoppée lorsque le front de migration atteint les 2/3 du gel. Les ARN sont visualisés à 320 nm, grâce au BET.

I.E. Méthodes de détection des ARNm

I.E.1 Détection des ARNm par hybridation

I.E.1.1 *Transfert des acides nucléiques sur membrane*

Les fragments d'acides nucléiques, préalablement séparés par électrophorèse en conditions dénaturantes, sont transférés par capillarité sur une membrane de nitrocellulose. Le transfert s'effectue pendant une nuit, en présence de tampon SSPE 10X stérile (pour 1L de SSPE 10X : 87,65 g NaCl ; 13,8 g NaH2PO4.H2O ; 3,7 g EDTA ; pH7,4 ajusté avec NaOH 10 N soit ≈ 6,5 mL (Sambrook J *et al.* 1989). La membrane est ensuite immergée 5 min dans une solution SSPE 5X, séchée, et cuite 40 min à 80°C.

I.E.1.2 *Préparation de la sonde ADN radioactive*

Les deux sondes utilisées sont obtenues par PCR (paires d'oligonucléotides correspondant aux ADNc *NIP2 et NIP3* ; voir tableau d'amorces en annexe 2). Les fragments PCR purifiés (25 ng) servent de matrice à la synthèse de sondes marquées radioactivement par incorporation d' [α^{32}P]dCTP, par la technique d'amorçage aléatoire (kit « NEBlot Kit » Biolabs) suivant les instructions du fournisseur. Les sondes sont isolées des nucléotides libres par rétention spécifique sur colonne en respectant les instructions du kit « QIAquick removal nucleotide kit », et leur activité est estimée à l'aide d'un compteur à scintillation.

I.E.1.3 *Pré-hybridation, hybridation et lavages des membranes*

Toutes ces étapes s'effectuent à 65°C. La membrane est pré-hybridée 4 heures en présence de 10 mL d'une solution SSPE 6X ; Denhart 1X ; SDS 0,1% ; ADN de sperme de

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

saumon dénaturé 50µg/mL. Elle est alors incubée avec10 mL de tampon d'hybridation (SSPE 3X ; Denhart 1X ; SDS 0,1% ; ADN de sperme de saumon dénaturé 50µg/mL) et la sonde radioactive sur la nuit puis lavée à 3 reprises pendant 10 min en abaissant à chaque fois progressivement la force ionique de solutions de lavage : SSPE 2X - SDS 0,1% ; SSPE 0,2X - SDS 0,1% et pour finir SSPE 0,1X - SDS 0,1%.

Les ARN marqués sont révélés par autoradiographie (exposition à –80°C ; révélation sur film BioMax, KODAK).

I.E.2 Détection des ARNm par RT-PCR

I.E.2.1 *Production d'ADNc par transcription inverse (ou reverse transcription, RT)*

A 2 µg d'ARN sont ajoutés 300 pmoles d'amorces dT_{18}. Le volume est ajusté à 20 µL avec de l'eau distillée autoclavée. Les ARN sont dénaturés 5 min à 65°C, le mélange est ensuite centrifugé brièvement et placé dans la glace.

Un mélange de 40 µL est alors ajouté, comprenant : 12 µL de tampon de réaction 5X (first strand buffer), 4 ou 6 µL d'une solution de DTT 0,1M (respectivement pour la M-MLV Reverse Transcriptase (GibcoBRL) et la Superscript II (Invitrogen)), 2 µL d'un mélange de dNTP (10mM chacun), 400 unités d'enzyme transcriptase inverse, qsp 40 µL avec de l'eau distillée stérile. La réaction est réalisée pendant 2h à température optimale de réaction de l'enzyme (37°C pour la M-MLV Reverse Transcriptase; et 42°C pour la Superscript II). Elle est finalement stoppée en chauffant 5 min à 95°C. 2 µL de la réaction sont utilisés comme matrice pour réaliser une PCR.

I.E.2.2 *Amplification de fragments ADN par PCR*

La RT-PCR semi quantitative doit être tout d'abord rapportée à un contrôle correspondant à l'amplification d'un transcrit exprimé constitutivement. Le transcrit contrôle utilisé ici est le messager *APT1* (Adenosyl Phosphoryl Transferase 1) (Cowling *et al.* 1998 ; Hedtke *et al.* 1999b). L'amplification du transcrit doit également se trouver dans la phase exponentielle de la PCR, soit 25 cycles ici pour *APT1*, dans le cadre de notre étude (Thèse de doctorat d'Isabelle Privat). Les amorces utilisées pour amplifier l'ADNc *APT1*, sont celle choisies par Cowling R et collaborateurs (respectivement amorces 3' et 5' : OLLY42 et OLLY23 renommées dans le laboratoire APT1-1 et APT1-2 (voir tableau des amorces, annexe 2). Une des amorces est à cheval sur la jonction de deux exons, et elles ont été testées pour amplifier spécifiquement et uniquement l'ADNc correspondant (fragment environ 500

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

pb) et non l'ADN génomique. Il s'agit donc d'un bon contrôle de charge ou amplicon rapporteur de la quantité d'ADNc matrice contenue dans la réaction PCR. Les conditions optimales d'amplification sont définies au préalable pour chaque ADNc d'intérêt en variant le nombre de cycles d'amplification PCR pour déterminer et rester dans la phase d'amplification exponentielle de la PCR.

La réaction en chaîne de la polymérase (Polymerase Chain Reaction, PCR) assure une amplification exponentielle et sélective d'un fragment d'ADN.

A 2 µL de la réaction de matrice (ici, réaction RT) sont ajoutés 23 µL du mélange suivant : 2, 5 µL de tampon de la Taq ADN polymerase 10X ; 0,75 µL de $MgCl_2$ 50 mM ; 0,5 µL d'un mélange de dNTP (10 mM chacun) ; 0,75 µL pour chacune des deux amorces 5' et 3' utilisées (10 µM) ; et finalement, l'enzyme Taq ADN polymerase (0,2 µL soit 1 unité par réaction RT-PCR). La réaction est complétée à 23 µL avec de l'eau distillée autoclavée. La réaction est effectuée dans les conditions suivantes : une première étape de dénaturation du double brin d'ADN à 94°C, pendant 3 min à 7 min selon l'enzyme utilisée (voir instructions du fabricant); un cycle de 3 étapes répété 25 à 50 fois selon la nature de la matrice à amplifier fois :

dénaturation 30 sec, 1 min ; 94°C

hybridation amorce-matrice de 30 sec à Thyb= Tm ou (Tm - 4°C) selon la spécificité des amorces

élongation de l'amplicon (1 min pour une synthèse de 1000 pb environ) à 72°C

La réaction s'achève par une élongation finale de 10 min à 72°C. Les produits PCR sont séparés sur un gel d'agarose (0,7 à 2 % (p/v)) - TBE 0,5X.

II. Techniques de clonage

II.A. Caractéristiques des vecteurs de clonage et souches réceptrices utilisées

II.A.1 Vecteurs utilisés

II.A.1.1 *Vecteurs procaryotes*

II.A.1.1.1. Vecteur d'expression stable procaryote :

pBluescript II SK(-) (Stratagène)

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

Le phagemide pBluescript est autoréplicatif (origine de réplication ColE1). Ce vecteur de 2958 pb confère une résistance à l'ampicilline (gène *bla ;* 50 à 100 µg/mL) à sa souche hôte, et apporte l'allèle *lacZ'*, interrompu par une cassette de clonage, sous contrôle d'un promoteur inductible à l'IPTG (voir carte en annexes 5). Ce plasmide est donc capable d'α-complémenter la souche XLI blue de *E. coli*, offrant ainsi une possibilité de discrimination des vecteur recombinants de ceux dépourvus d'insert par une sélection blanc/bleu en présence de l'inducteur IPTG et d'un substrat artificiel de la β-galactosidase, le X-Gal.

II.A.1.1.2. Vecteurs d'expression et surexpression

II.A.1.2 *procaryotiques*

a) vecteurs pBAD/His (Invitrogen) et pBAD/thiotopo

Les ADNc AtNip2 et AtNip3 sont clonés respectivement dans les vecteurs pBAD/HisC et pBAD/HisB au niveau des sites de restriction 5'-PstI / EcoRI-3' et 5'-BglII / EcoRI-3' (voir annexes 5). Un fragment ADNc amplifié par PCR (oligonucléotides : voir annexe), codant le premier tiers de la protéine SoRPOT ;2, soit environ 37 kDa, est directement cloné dans le vecteur pBAD/Thiotopo.

Ces plasmides permettent d'exprimer des protéines couplées à deux étiquettes ou « tag » situées en amont de la cassette de clonage : deux régions codant pour un tag 6 His, et pour un épitope « Xpress™ » (carte en annexes 5). Des anticorps primaires dressés contre ces marqueurs sont vendus dans le commerce (Invitrogen), ces étiquettes peuvent donc être utilisées comme cibles pour détecter la protéine recombinante. Le gène hybride est sous la dépendance du promoteur araB, assurant une expression très contrôlée et dose dépendante en présence de L-arabinose. L'utilisation de cette famille de vecteurs est par conséquent préconisée pour l'expression de protéines toxiques pour la bactérie ou difficiles à surproduire. Ces plasmides présentent un gène conférant la résistance à l'ampicilline. Ces vecteurs de type pBAD sont utilisés, dans le cadre d'expression de protéines, dans des souches *E. coli* Top10.

b) Vecteurs pET28a et pET32a (Novagen)

Les ADNc *AtNIP1* et *AtNIP2* sont clonés dans les deux vecteurs pET28 a et pET32a au niveau des sites 5'-BamHI / SalI-3' (séquences ADNc clonées : voir annexe).

L'expression du gène d'intérêt est sous le contrôle d'un promoteur T7 et d'une région régulatrice Lac permettant une induction par l'IPTG. Ces vecteurs offrent la possibilité de marquer la protéine à produire avec une étiquette 6His en Nter avec ou/et en Cter. De plus, le

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

vecteur pET32a contient une étiquette en N-terminale de la protéine supplémentaire : la thioredoxine (voir annexes 5). Les productions de protéines à partir de ces vecteurs sont réalisées dans des souches *E. coli* BL21.

II.A.1.3 *Vecteurs navettes procaryote/ eucaryotes*

II.A.1.3.1. Vecteur binaire EL103

Ce vecteur *E. coli / Agrobacterium tumefaciens* a été fourni également par Dominique Pontier. Il offre une résistance à la kanamycine à son hôte bactérien (100 µg/mL final) et à la plante transformée de façon stable (50 µg/mL). Il dérive du plasmide binaire pBI121 (Clonetech) comportant entre les bords droit et gauche de l'ADN-T (ADN de transfert) une construction destinée à l'expression de protéines chez les plantes. Elle comprend successivement le promoteur fort constitutif 35S du virus de la mosaïque du chou fleur, un activateur traductionnel Ω, 3 sites de restriction (BamHI, XbaI, SacI) et en aval le terminateur du gène de la nopaline synthase (voir carte en annexe 4). EL103 contient un ADNc codant pour le rapporteur EYFP (version 4 de Clonetech) cloné en 5'XbaI-SacI3'dans le laboratoire d'Eric Lam (laboratoire de post-doctorat de D. Pontier, Université de Rutgers, New Jersey, Etats-Unis).

II.A.1.3.2. Vecteur binaire : pFP101

Ce vecteur *E. coli / A. tumefaciens* a été fourni au laboratoire par François Parcy, dans le cadre d'une collaboration avec Gilles Vachon. Il offre une résistance à la spectinomycine (Sigma) aux clones d'*E. coli* ou d'agrobactéries transformés (50 µg/ml final). Il s'agit d'un vecteur permettant d'exprimer dans la plante un gène d'intérêt, cloné en aval d'un double promoteur 35S CaMV (annexe 4). De plus, pFP101 comporte le gène *GFP* sous contrôle d'un promoteur graine spécifique *At2S3* (protéine *At2S3* étant une protéine de réserve de la graine d'Arabidopsis), il permet de sélectionner directement les graines transformées T0 sous lumière bleue (longueur d'onde d'excitation de GFP dans le bleu 450 nm) à l'aide d'une loupe (U-RFL-T, OLYMPUS). Les transformants d'Arabidopsis sont alors cultivés sur milieu (ATG) sans antibiotique.

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

II.A.2 Souches bactériennes utilisées

II.A.2.1 *Souche réceptrice bactérienne : E. coli XL1-blue*

Cette souche d'*Escherishia coli* possède un gène conférant une résistance à la tétracycline ainsi qu'une mutation *lacIqZΔM15* fournissant une possibilité d'α-complémentation (Stratagène, **http://www.stratagène.com/manuals/200256.pdf**). Elle est utilisée pour les clonages.

II.A.2.2 *Souches d' E. coli TOP 10 (Invitrogen)*

Cette souche est utilisée pour cloner, amplifier un plasmide ou exprimer une protéine recombinante. Elle est déficiente dans la biosynthèse d'arabinose, et peut être utilisée en combinaison avec des vecteurs de type pBAD présentant un promoteur araBAD dans le cas d'une expression inductible au L-arabinose. Son génotype est le suivant : F- mcrA D(mrr-hsdRMS-mcrBC) f80lacZDM15 DlacX74 deoR recA1 araD139 D(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG. L'induction de protéines recombinantes chez *E. coli* est réalisée en suivant les instructions du fournisseur du vecteur. Les protéines extraites peuvent être alors séparées par électrophorèse en conditions dénaturantes, analysées par une coloration et/ou une immunodétection comme décrit dans la partie IV.C.

II.A.2.3 *Souches d'E. coli BL21 (Novagen)*

Cette souche est utilisée pour le clonage et pour surexprimer une protéine recombinante, et dans ce travail, elle est associée au travail effectué avec les vecteurs de type pET. Elle est résistante à l'ampicilline (50 µg/mL final) et protège les protéines exogènes produites des protéases LON et OMPT. Les inductions sont effectuées selon les instructions du fournisseur.

II.A.2.4 *Souche réceptrice A. tumefaciens : GV3121*

Cette souche d'*Agrobacterium tumefaciens* GV3121, fournit par Dominique Pontier, possède un gène conférant une résistance à la gentamycine (50 µg/mL), ainsi qu'un plasmide porteur notamment d'un opéron *VIR* à l'origine de la virulence de la bactérie.

II.B. Préparation de l'ADN

Les fragments ADN à cloner sont amplifiés par PCR, avec une enzyme Taq ADN polymérase présentant une activité correctrice (3-5' exonucléase), l'Amplitaq Gold (Roche Diagnostics) ou la Pwo DNA polymerase (Genaxis Biotechnology) en respectant les

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

instructions du fournisseurs : L'AmpliTaq Golg est utilisée notamment pour des clonages directs dans des vecteurs type TOPO. Les réactions PCR sont effectuées dans un volume de 50 µL. Le mélange réactionnel et les conditions d'amplification PCR sont définis selon les instructions du fournisseur (robocycler gradient 96, Stratagène)..

II.B.1 Digestion enzymatique

La digestion enzymatique peut nécessiter l'utilisation de RNase A (10mg/mL dans une solution Tris.HCl 10mM, pH 7,5 ; NaCl 15 mM ; 1 µL/réaction) selon le mode d'extraction des plasmide (voir partie « extraction d'ADN plasmidique » qui suit).

II.B.1.1 *Digestion totale*

Le vecteur et les fragments d'ADN (produits PCR ou plasmide recombinant) sont digérés par les enzymes adéquates (1 unité par µg d'ADN à digérer et par heure de réaction). La réaction est catalysée à 37°C en présence d'un tampon OPA (concentration ajustée selon instructions de Pharmacia Biotech en fonction des enzymes utilisées) pendant quelques heures. Les enzymes sont ensuite inactivées par un traitement de 15 min à 65°C, et l'ADN purifié par un traitement au phénol-chloroforme-alcool isoamylique (25:24:1 v/v), puis au chloroforme. Les acides nucléiques sont alors précipités par l'addition d' 1/10 de volume d'acétate de sodium (3M pH5,2) et de 2 volumes d'éthanol absolu froid.

II.B.1.2 *Digestion partielle*

Une digestion partielle peut être nécessaire si le fragment d'intérêt présente deux fois le même site de restriction. Le produit à digérer (produit PCR ici) doit être présent en grande quantité. Le produit PCR est digéré tout d'abord totalement à l'extrémité comportant le site unique par l'enzyme correspondante, la digestion est contrôlée en déposant une fraction aliquote sur gel d'agarose. L'enzyme, susceptible de couper deux sites, est alors ajoutée à la réaction (tampon OPA ajustée à 2X). Elle est incubée pendant 10 min à 37°C, puis la réaction immédiatement placée dans la glace. Les enzymes sont inactivées par un traitement à 65°C pendant 15min. Les produits de digestion sont séparés sur gel d'agarose 1%, TBE 0,5X. Le fragment d'intérêt est découpé et purifié à l'aide du « QIAquick gel extraction kit » (QIAGEN).

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

II.B.1.3 *Purification d'un fragment d'ADN par élution du gel d'agarose*

Après migration des acides nucléiques, la bande de gel contenant le fragment d'intérêt est découpée sous UV puis purifié à l'aide du « QIAquick gel extraction kit » (QIAGEN) selon les instructions du fournisseur.

II.B.1.4 *Ligation*

La ligation d'un fragment digéré dans un vecteur linéarisé est catalysée par une T4 ADN ligase (Invitrogen, 1 unité par réaction) en présence de son tampon (1X final). L'insert doit toujours être en excès par rapport au vecteur digéré. La réaction doit être effectuée dans un volume final minimum afin de faciliter le contact vecteur-insert (10 à 12 µL en général). Le volume est ajusté avec de l'eau distillée autoclavée et le mélange incubé à température ambiante pendant une nuit.

II.C. Méthodes de Transformation de bactéries

II.C.1 Transformation d' *E. coli*

II.C.1.1 *Préparation de bactéries E. coli de souche XL1- blue chimiocompétentes*

1,5 mL de LB frais est inoculé avec une colonie de *E. coli* XL1- blue isolée sur boîte de pétri contenant du milieu LB gélosé avec de la tétracycline, antibiotique de sélection de la souche (10 µg/mL final). Cette mini-culture est ensuite placée sous agitation (180 rpm) à 37°C pendant une nuit. Une pré-culture de 50 mL de LB (sans antibiotique) est alors ensemencée au 1/100 avec la mini culture, et incubée la nuit sous agitation et à 37°C. 1 mL de cette suspension est finalement ajouté à 100 mL de LB, puis cultivée à 37°C sous agitation jusqu'à atteindre une DO à 600 nm comprise entre 0,3 et 0,5. Les étapes suivantes sont réalisées dans la glace. Les bactéries sont sédimentées par une centrifugation de 10 min à 2000 rpm, et à 4°C. Le culot est délicatement repris dans 10 mL d'une solution froide, et fraîchement préparée, contenant 10 mM $MgSO_4$; 50 mM $CaCl_2$. La suspension est incubée 30 min dans la glace, puis centrifugée 10 min à 2000 rpm; et à 4°C. Le culot de bactéries compétentes est remis en suspension dans 1,7 mL de $MgSO_4$ 10 mM, $CaCl_2$ 50 mM froid.
300 µL de glycérol stérilisé est alors ajouté. Des aliquotes de 100 µL de cellules sont enfin congelées dans de l'azote liquide puis conservés à - 80°C.

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

II.C.1.2 *Transformation de cellules E. coli compétentes*

Les produits issus de la réaction de ligation et 100 µL de cellules compétentes sont mis en présence pendant 30 min dans la glace. Un bref choc thermique (1 min, 42°C) stimule l'incorporation de l'ADN exogène par les bactéries. 1mL de milieu LB est ajouté aux cellules. Elles sont alors incubées à 37°C pendant une heure afin d'initier l'expression et la réplication du plasmide intégré.

II.C.1.3 *Etalement de bactéries E. coli XL1 blue*

Environ 100 µL de la réaction de transformation sont étalés sur une boîte de Pétri contenant du milieu LB gélosé supplémenté en antibiotique de sélection apporté par le plasmide et en présence de 60µL de X-Gal (20 mg/mL dans du N,N'diméthyl-formamide) et de 20 µL d'IPTG (solution filtrée à 0,2 g/mL dans de l'eau distillée) afin de permettre un criblage blanc-bleu. Les bactéries sont ensuite incubées à 37°C pendant une nuit. Seules les colonies blanches seront sélectionnées.

II.C.2 Transformation d'Agrobacterium tumefaciens

II.C.2.1 *Préparation d'agrobactéries chimiocompétentes*

Une colonie d'*A. tumefaciens* est inoculée dans 20 mL de LB supplémenté de gentamycine (50 µg/mL), et incubée à 28°C sous agitation pendant une nuit. 2mL de cette préculture sont ensemencés dans 50 mL de LB + gentamycine et incubés dans les mêmes conditions jusqu'à atteindre une DO à 600 nm d'environ 0,5. La culture est alors incubée 10 min dans la glace. Toutes les étapes suivantes sont réalisées dans la glace ou à 4°C. Les agrobactéries sont récoltées par une centrifugation de 5 min à 3000 g et à 4°C. Le culot est repris délicatement dans 1 mL de $CaCl_2$, 20mM froid. Cette suspension est finalement aliquotée par fractions de 100 µL, congelées rapidement dans l'azote liquide, et stockées à -80°C.

II.C.2.2 *Transformation d'A. tumefaciens*

0,5 à 1 µg d'ADN et cellules compétentes (100µL) sont mis en présence pendant 5 min dans la glace. Un double choc thermique (5 min dans l'azote liquide puis 5 min à 37°C) achève la transformation. 1 mL de LB est alors ajouté, et la suspension laissée à 28°C pendant 4 h afin d'initier la réplication du plasmide. Les bactéries sont étalées sur milieu sélectif (LB gélosé contenant l'antibiotique de sélection de la souche et l'antibiotique de sélection du plasmide recombinant exogène), puis incubées à 36 h à 30°C.

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

II.D. Extraction d'ADN plasmidique : criblage des vecteurs recombinants

II.D.1 Mini-préparation d'ADN plasmidique issu d'*E. coli* : protocole rapide

Ce protocole a été apporté au laboratoire par Dominique Pontier, il est idéal pour un criblage rapide de culture d' *E. coli*, il peut être aussi utilisé pour produire des fragments ou vecteurs digérés à liguer, mais pas à séquencer. Une culture de 1,5 mL de LB + antibiotiques est ensemencée à partir d'une colonie sur boîte, et incubées à 37°C sous agitation pendant une nuit. Les bactéries sont sédimentées par une centrifugation (1min, 12 000rpm). Le surnageant est éliminé et les bactéries lysées par l'addition de 300 µL de tampon TENS (Tris 1M, pH 8 ; EDTA 0,5M, pH8 ; NaOH 0,1N ; SDS 0,5%). ADN chromosomique et protéines sont précipités par 150µL d'acétate de potassium (3M, pH4.7). Débris cellulaires, et protéines sont éliminés par une centrifugation (2 min, 12 000 rpm). 1mL d'éthanol absolu est alors ajouté au surnageant afin de précipiter les acides nucléiques récupérés par centrifugation (2 min, 12000 rpm). Le culot est lavé à l'éthanol 70%, séché et repris dans 20µL d'eau distillée autoclavée. Cette méthode d'extraction des plasmides est rapide mais n'élimine pas l'ARN contaminant. Les digestions enzymatiques seront par conséquent réalisées en présence de RNase A (Fermentas, 10 mgLmL, 0.5µL par réaction) afin d'améliorer l'observation des produits de digestion sur gel d'agarose.

II.D.2 Mini-préparation d'ADN plasmidique issu d'*E. coli* : protocole long et propre (séquençage)

Le protocole utilisé pour extraire des vecteurs destinés au séquençage automatique est celui du (Molecular Cloning, a laboratory manual, Sambrook J *et al.* 1989).

II.D.3 Mini-préparation de plasmides issus d'Agrobacterium

Une culture de 2 mL de LB sélectif inoculée à partir d'une colonie prélevée sur boîte est incubée pendant 24h à 28°C puis centrifugée 2 min à 12 000 rpm. Le culot est resuspendu dans 100 µL de solution I froide (lysozyme 4 mg/mL ; glucose 50 mM ; EDTA 10 mM ; Tris.HCl pH8, 25 mM). Après une étape d'incubation de 10 min à température ambiante, les bactéries sont lysées par un traitement alcalin (200 µL de solution II : 1% SDS ; 0,2N NaOH), vortexées et incubées dans les mêmes conditions. Les protéines sont précipitées par l'ajout de

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

90µL d'un mélange phénol-solution II (1 :2 v/v respectivement) puis vortexées 2 min. 150 µL d'acétate de sodium (3M ; pH 4,8) sont ajoutés, le mélange agité et incubé 15 min à –20°C afin de précipiter les acides nucléiques. Une centrifugation de 3 min à 14000 rpm permet de récupérer les acides nucléiques dans le surnageant. Ces derniers sont précipités par l'ajout de 2 volumes d'éthanol absolu froid, et sédimentés suite par une centrifugation (3min, 14000 pm). Le culot est lavé à l'éthanol 70%, séché et repris dans 20 µL d'eau distillée autoclavée. 5 µL sont utilisés pour transformer *E. coli*, afin de vérifier la présence de l'insert par digestion de mini-préparation de plasmide.

II.D.4 Midi-préparation de plasmides (*E. coli* ou *A. tumefaciens*)

Une midi-culture de bactéries transformées (100 mL LB sélectif) est ensemencée au 1/100 à partir d'une culture de 1,5 mL sélective, et placée à 37°C sous agitation pendant 12 à 16 h. La purification de plasmides est réalisée par la technique de lyse alcaline des bactéries en suivant le protocole fourni par le kit « QIAfilter Midi » (QIAGEN). La concentration en ADN est estimée en mesurant la DO à 260 nm (une unité de DO correspond à 50µg/mL d'ADN double brin).

II.E. Séquençage automatique

1 µg d'ADN à séquencer doit être préparé dans un volume final de 5µL. Les séquences sont obtenues grâce à l'utilisation du séquenceur automatique de type « ABI 373 XL stretched » (Applied Biosystems). Le séquençage automatique est une adaptation de la technique de Sanger utilisant les 2',3'-didéoxynucléotides (ddNTP) pour terminer les brins. L'ADN est amplifié par PCR à partir d'une amorce en présence de dNTP et ddNTP. Chacun des 4 ddNTP est couplé à un fluorophore spécifique. Cette étape est réalisée avec le kit « BigDye terminator » (Perkin-Elmer).

Les amorces choisies pour séquencer les divers fragments clonés sont localisées de part et d'autre de la cassette de clonage. Il s'agit d'amorces universelles pour les clones recombinants Bluescript, situées dans les promoteurs T3 et T7. Les amorces utilisées pour contrôler la fusion traductionnelle *NIP::eYFP* sont récapitulées en annexe 2 (tableau amorces). Les produits de réaction sont séparés sur un gel d'acrylamide par électrophorèse. Un logiciel d'analyse permet d'associer le fluorophore, détecté par un système optique, au ddNTP correspondant marquant l'extrémité 3' du fragment.

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

III. Méthodes d'études de la plante

III.A. Conditions de culture

III.A.1 Préparation des graines et plantes

Toutes les manipulations de stérilisation sont réalisées en conditions stériles sous une hôte à flux laminaire horizontal.

III.A.1.1 *Stérilisation des graines en surface: culture sur milieu gélosé*

Avant d'être semées *in vitro*, les graines sont stérilisées en surface par immersion dans une solution de chlore diluée au cinquième dans de l'éthanol absolu, à raison d'environ 500 graines/mL, dans un microtube de 1,5 mL. La solution de chlore ou solution de stérilisation est réalisée par dissolution d'une pastille d'environ 1,5 g de chlore actif INOV'CHLORE (INOV'CHEM) dans 40 mL d'eau distillée autoclavée. Après 5 min d'agitation, puis décantation, la solution de stérilisation est éliminée et les graines lavées 2 fois à l'éthanol absolu, puis séchées sous hôte pendant au moins 2 heures.

III.A.1.2 *Stérilisation rapide de surface de graines d'A. thaliana: culture en milieu liquide*

Il s'agit d'une technique de stérilisation de surface des graines rapide facilitant la germination grâce à une étape d'imbibition dans l'eau. Une pastille de chlore actif INOV'CHLORE d'environ 1,5 g (INOV'CHEM) est dissoute dans 40 mL d'eau distillée. 10 mL de la solution sont ensuite ajoutés à 40 mL d'éthanol absolu. Toutes les étapes qui suivent ont lieu sous hotte à flux laminaire. Environ 500 graines d'*A. thaliana* (soit un équivalent en volume d'environ 20 µL dans un tube Eppendorf) sont agitées pendant 4 à 5 min dans 1mL du mélange chlore /éthanol. Après décantation, le mélange est éliminé et les graines lavées 3 fois avec de l'eau distillée stérile. Elles sont alors remises en suspension dans l'eau distillée autoclavée et ajouté dans un erlen contenant 25 mL de milieu MS liquide (pour 1 litre : 0,5 g MES ; 2,2 g MS basal salt mixture (Sigma) ; 8g saccharose ; pH 5,6-5,8 ajusté avec KOH). Elle est utilisée pour les expériences de transformations transitoires de très jeunes plantules d'Arabidopsis.

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

III.A.2 Conditions de culture *in vitro*

III.A.2.1 *Milieux de culture*

Les graines stérilisées sont semées sur milieu ATG gélosé (4,3 g de sels MS (SIGMA) ; 10 g de saccharose ; 0,5 g de MES pH 5,7 (KOH) ; 8 à 10 g de Bacto Agar ; H_2O qsp 1L stérilisé par autoclave) préalablement coulé dans des boîtes de Pétri hautes. Le milieu de culture peut contenir un antibiotique pour la sélection de plantules transformées (sulfate de kanamycine à 50 µg/mL finale, SIGMA). Elles sont ensuite placées à 4°C et à l'obscurité pendant 72 h afin de lever la dormance des graines et obtenir une germination homogène et synchronisée. Elles sont alors cultivées en chambre de culture.

III.A.2.2 *Conditions de culture in vitro*

Les graines sont placées en chambre de culture *in vitro*, réglée dans les conditions suivantes :

cycle jours longs (16h lumière/ 8h obscurité),

intensité lumineuse : environ 70 µmoles de photons / m^2 / s,

température constante maintenue à 24°C,

renouvellement de l'air permanent et hygrométrie non contrôlée.

III.A.3 Conditions de culture en terre

III.A.3.1 *Plantation*

Des plantules peuvent être repiquées, ou des graines semées et cultivées sur du terreau (Nutrilor ou Hydro) imbibé d'eau et autoclavé (20 min à 120°C). Du Temik 10G (nématicide et insecticide systémique) est ajouté à la terre (environ une dizaine de granulés par petit pot) avant d'y placer les plantes ou graines. Les graines sont directement semées en terre sans stérilisation préalable ; les plantes provenant de boîtes de culture sont repiquées. Les pots ou bacs de plantation sont recouverts d'un film en plastique pendant 7 à 10 jours afin de maintenir une atmosphère saturée en eau.

III.A.3.2 *Conditions lumineuses en salle de culture*

Sauf précision contraire, les plantules et plantes d'arabidopsis sont cultivées en conditions de jours longs (16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité) :

- en salle de culture *in vitro*, l'intensité de la lumière est d'environ 100 µmol photons.m^{-2}. sec^{-1}, pour une température constante de 24°C. L'air y est renouvelé constamment et l'hygrométrie non contrôlée.

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

- la majorité des cultures en terre est réalisée en salle de culture aménagée, la température est de 24°C le jour et 21°C la nuit ; l'éclairage est assuré par une combinaison de tubes fluorescents blancs, incandias et horticoles, ainsi que des ampoules halogènes horticoles ; l'hygrométrie est maintenue constante à 60-70 %, et l'arrosage s'effectue par imbibition.

III.A.3.3 *Conditions lumineuses en serre*

L'éclairage de la serre est naturel l'été et artificiel l'hiver de 7 h à 10 h et de 16 h à 23 h (utilisation de lampes à argon) ; les conditions d'humidité et d'arrosage sont les mêmes qu'en salle de culture.

III.A.4 Stockage des graines d'*A. thaliana*

Après leur récolte, les graines sont conservées entre 4 et 10°C jusqu'à leur utilisation.

III.B. Techniques de transformation des plantes

III.B.1 Techniques de transformations transitoires de cellules végétales

Les transformations sont dites transitoire lorsqu'elles n'affectent pas les cellules reproductrices et le patrimoine héréditaire, l'ADN exogène introduit n'est donc pas transmis à la descendance. Elles présentent l'avantage d'obtenir un résultat rapidement, et sont particulièrement intéressante pour déterminer une localisation subcellulaire *in planta* d'une protéine d'intérêt fusionnée en c-terminale avec une protéine rapporteur. Les techniques utilisées sont optimisées pour une plante donnée. Ainsi, la technique d'agroinfiltration de feuilles fonctionne très bien chez le tabac et présente beaucoup moins de réussite chez *Arabidopsis thaliana*. Dominique Pontier a alors mis au point une autre approche plus efficace pour transformer *A. thaliana*, à partir de très jeunes plantules, détaillée plus loin.

III.B.1.1 *Agroinfiltration de feuilles de tabac*

Cette technique de transformation transitoire par *Agrobacterium tumefaciens* consiste à infiltrer des bactéries par les stomates de l'épiderme inférieur des feuilles de tabac (cultivar Samsun NN). Une culture de 2 mL (milieu LB + gentamycine 50 µg/mL, kanamycine 100 µg/mL) est ensemencée à partir d'une colonie sur boîte, et incubée pendant une nuit, à 28°C sous agitation. Les agrobactéries sont sédimentées par une centrifugation lente de 5 min à 5000 rpm (centrifugeuse de paillasse Eppendorf 5417R). Le culot est lavé deux fois avec 1

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

mL de tampon d'infiltration (saccharose 60 mM ; glucose 55,5 mM ; acétosyringone 0,2 mM ; MES 20 mM). Chacun des lavages est suivi d'une nouvelle centrifugation (5 min, 5000 rpm). Le culot de bactéries est finalement repris dans 1 mL de tampon. La suspension est dosée au spectrophotomètre à 600 nm afin d'ajuster la DO finale à 0,8. L'infiltration est réalisée à l'aide d'une seringue stérile de 1 mL appliquée perpendiculairement contre la face inférieure de la feuille. Le tampon utilisé place les bactéries dans des conditions iso-osmotiques et l'acétosyringone augmente la virulence de la souche, réunissant ainsi des conditions propices à la transformation de cellules végétale.

Un échantillon de feuille infiltrée est observé 2 à 4 jours après infiltration entre lame et lamelle en présence de quelques gouttes d'eau.

III.B.1.2 *Transformation transitoire de jeunes plantules d'A. thaliana*

Cette méthode a été mise au point par Dominique Pontier (brièvement décrite dans Lagrange *et al.* 2003). Elle repose sur une co-culture d'*Agrobacterium tumefaciens* avec de très jeunes plantules d'*A. thaliana*.Après 48h de croissance, la radicule vient de percer l'enveloppe de la graine afin de permettre le développement d'une jeune plantule. On peut parfois également observer à ce stade l'émergence des cotylédons. C'est une étape qui crée un stress, et donc, une condition intéressante pour une infection par *Agrobacterium*. Des graines stérilisées sont ensemencées dans des erlens contenant du milieu MS liquide (pour composition voir protocole stérilisation rapide de graines) et incubées pendant 48h sous agitation dans une chambre de culture à température régulée (24°C ; cycle jour/nuit 16h/8h). La culture est transvasée dans une unité de filtration (Nalgene, filtre 0,2 µM) et le milieu éliminé en très grande partie par aspiration à l'aide d'une pompe à vide. Les jeunes plantules doivent cependant encore être recouvertes d'une légère couche de milieu. La suspension d'agrobactéries est ajoutée sur les jeunes plantules, et le tampon légèrement aspiré. Elles sont alors incubées à température ambiante 30 min à 2 heures. Le liquide est alors éliminé en grande partie, en prenant soin tout de même de maintenir les plantules baignées dans du milieu. Les unités de filtration sont alors placées en chambre de culture pendant 2 jours.

III.B.2 Transformation stable d'*A. thaliana*

La méthode utilisée (Clough & Bent 1998) a été obtenue après modification du protocole initial (Bechtold & Pelletier 1998). Elle est basée sur une transformation des inflorescences et nécessite des plantes en fleur et en très bon état physiologique.

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

Les plantes sont amenées au stade de floraison en conditions de jours long (16 h de lumière). Le nombre de hampes florales est augmenté en coupant les premières afin d'obtenir un maximum de bourgeons. Une miniculture d'*Agrobacterium tumefaciens* recombinant, obtenue après une nuit de croissance, est utilisée pour ensemencer 250 mL de milieu LB sélectif (gentamycine 50 $mg.L^{-1}$ et antibiotique de sélection du vecteur; dilution au 1/100). Elle est ensuite incubée à 28°C avec agitation, pendant 20 à 24h (la phase exponentielle de croissance est alors atteinte). Les bactéries sont ensuite sédimentées par centrifugation (15 min, 3000 g, 4°C), puis resuspendues dans un petit volume d'une solution de saccharose 5 % (p/v) (iso-osmotique). La $DO_{600\ nm}$ est alors mesurée contre un témoin saccharose 5%. La suspension est alors diluée dans une solution de saccharose 5% contenant ; silwett L-77 0,05% (v/v) de façon à obtenir une DO_{600nm} = 0,8 pour un volume de 100 à 200 mL final. Cette suspension d'agrobactéries est transférée dans un bécher où sera plongée la partie supérieure des plantes à transformer pendant 2 à 3 secondes, avec une légère agitation pour une meilleure imprégnation (un léger film se dépose alors sur les plantes). Les plantes sont ensuite placées sous un film plastique afin de maintenir une humidité constante, elles doivent également être protégées de toute lumière excessive pendant 2 jours. Le film plastique est alors enlevé et les plantes remises en conditions de culture habituelles jusqu'à maturation des siliques. Les graines sont récoltées et les transformants sélectionnés.

III.C. Observation d'échantillons agroinfiltrés

Des constructions contrôles, fournies par D. Pontier, codant des produits spécifiquement adressés à un compartiment subcellulaire donné, sont également introduits dans la souche GV3121. Elles permettent d'établir des profils témoins de comparaison: une protéine hybride peptide de transit REC A : :GFP (Green Fluorescent Protein) adressée au plaste (décrite dans Lagrange *et al.* 2003) ; la protéine eYFP flanquée à son extrémité C-terminale d'une séquence de localisation nucléaire (NLS) et donc importée au noyau ; et la eYFP à localisation cytosolique et nucléaire.

Les échantillons transformés sont déposés entre lame et lamelle en présence de quelques gouttes d'eau. L'autofluorescence émise par les chloroplastes est également utilisée comme contrôle en imagerie confocale. L'expression transitoire est suivie régulièrement au microscope optique (Nikon eclipse E6000), équipé de filtres sélectionnant spécifiquement la gamme de longueurs d'ondes d'excitation et d'émission de la protéine EYFP (excitation 510/20nm ; émission 560/40nm). Les images fournies sont obtenues au microscope à balayage confocal (TCS.SP2 LEICA) sur la plateforme de microscopie confocale au CEA de

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

Grenoble (D. Grunwald). La préparation des échantillons est identique, avec dépôt d'une goutte d'huile sur la lamelle (objectifs à immersion). Cet appareil repose sur l'utilisation d'un faisceau laser- à une longueur d'onde d'excitation des rapporteurs à déceler- finement focalisé balayant rapidement un plan donné (coupe optique). Un logiciel de traitement et analyse d'images reconstitue à partir des différentes coupes sériées une image informatique tridimensionnelle de l'ensemble de l'objet.

III.D. Dosage de la chlorophylle

La chlorophylle d'une suspension plastidiale (5 à 10 µL) est extrait dans de l'acétone 80% final (qsp 1ml total) puis le mélange est vortexé afin d'isoler les pigments. Les résidus non solubilisés dans l'acétone sont précipités à 14000 rpm pendant 1 min. L'absorbance des chlorophylles totales peut alors être dosée au spectrophotomètre à 652 nm et la concentration calculée en appliquant la formule suivante : [chlorophylle totale] (mg/mL) = A_{652} x d/36, avec d : facteur de dilution de la suspension membranaire dans l'acétone 80% (BRUINSMA 1961).

III.E. Criblage de mutants d'insertion ADN-T par PCR

Les mutants d'insertion d'ADN-T des collections de mutants d'arabidopsis de l'université du Wisconsin (http://www.biotech.wisc.edu/Arabidopsis) et du « Salk Institute », la Jolla, Californie (http://signal.salk.edu) contiennent des ADN-T présentant un gène *nptII* codant la néomycine phosphoryl-transférase, conférant une résistance à la kanamycine (annexe 6). Les pantules transformées peuvent donc être sélectionnées sur milieu gélosé supplémenté en antibiotique (voir milieux de culture *in vitro*). Le criblage de mutants est également effectué par PCR (40 cycles) à l'aide d'un jeu de 3 amorces permettant d'amplifier spécifiquement l'allèle sauvage ou l'allèle muté du gène d'intérêt. L'oligonucléotide choisi dans l'ADN-T, est désigné par les fournisseurs, et situé à l'extrêmité gauche (amorce JL202 et LBb1 respectivement pour mutants du Wisconsin et Salk, voir annexe 2). Utilisé conjointement avec une amorce choisie dans le gène du côté de la bordure gauche de l'ADN-T (LB, legt border), elles amplifient la jonction ADN-T-gène soit l'allèle muté. Un couple d'amorces spécifiques et complémentaires au gène d'intérêt sont également choisies de part et d'autre de l'insertion afin d'amplifier l'allèle sauvage. Il inclue l'oligonucléotide utilisé pour l'amplification de la jonction ADN-T-gène.

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

IV. Méthodes d'extraction de protéines

IV.A. Extraction de protéines totales

IV.A.1 Extraction au phénol

Les protéines totales sont extraites au phénol selon la technique de (Hurkman WJ & Tanaka CK 2005). Le matériel végétal (graines, plantules, feuilles, fleurs, tiges, racines) est broyé dans un mortier en présence d'azote liquide jusqu'à l'obtention d'une fine poudre. 300 mg de poudre sont ajoutés à 600 µL de tampon d'extraction TB (Tanaka Buffer: 0,7 M Saccharose ; 0,5 M Tris HCl pH8 ; 5 mM EDTA ; 0,1 M NaCl ; ainsi qu'ajoutés extemporanément 2% (v/v) β-mercaptoéthanol et 2 mM PMSF). Un volume de phénol (saturé à pH8 dans Tris-HCl 10 mM pH8) est ajouté et l'ensemble est vortexé pendant 20 min à température ambiante. L'extrait est centrifugé à 12000g pendant 5 min. A la phase phénolique (phase supérieure) est ajoutée 5 volumes d'une solution d'acétate d'ammonium (0,1 M AcNH4, dissous dans 100% méthanol (v/v)). Les protéines sont précipitées sur la nuit à -20°C puis centrifugées à 12000 g pendant 5 min. Le culot de protéines est rincé deux fois dans la solution d'acétate d'ammonium/ méthanol. Le culot est repris dans du tampon de dépôt pour gel d'acrylamide dénaturant ou dans une solution de soude 0,1 N. Dans le cas d'extraction de protéines de graines, le culot est repris dans de l'acétone 80% (v/v), et incubé à -20°C pendant 1 à 2 heures. Cette précipitation est achevée par une centrifugation à 20 000 g pendant 15 min. Cette dernière étape peut être répétée encore une fois et le culot final repris dans une solution de soude 0,1 N ou encore dans du tampon de dépôt de protéines sans bleu pour un dosage.

IV.A.2 Extraction rapide de protéines

Cette méthode ne permet pas de doser les protéines avant séparation sur gel d'acrylamide, mais elle est très rapide et efficace pour effectuer un simple contrôle du profil des protéines. Le matériel végétal est finement broyé dans un mortier à l'azote. On récupère une partie de la poudre à laquelle on ajoute 2 volumes de tampon de dépôt 4X. L'échantillon est dénaturé pendant 10 min à 100°C, puis centrifugé brièvement à vitesse maximum (centrifugeuse Eppendorf 5417R). Le surnageant peut être alors utilisé pour une migration électrophorétique.

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

V. Techniques de fractionnement subcellulaire

V.A. Chez l'épinard

V.A.1 Choix du matériel

L'épinard (*Spinacia oleracea* L.) est une plante cultivée de la famille des chénopodiacées, présentant un appareil végétatif en forme de rosette de feuilles à large limbe. Il présente des avantages majeurs pour l'étude des chloroplastes : disponible pratiquement toute l'année, c'est un matériel permettant l'extraction de grandes quantités de chloroplastes, nécessaires pour des analyses biochimiques. Les épinards sont cultivés en plein champ et achetés sur les marchés locaux. Les épinards sont placés une nuit en chambre froide et à l'obscurité afin d'épuiser les stocks d'amidon des chloroplastes.

V.A.2 Isolement de chloroplastes intacts

Les chloroplastes sont extraits à partir de feuilles d'épinard, selon la méthode de (Joyard & Douce 1982). Les feuilles sont tout d'abord triées, la nervure principale est ôtée, puis lavées. La préparation est effectuée à 4°C. Les feuilles sont hachées en présence de milieu de broyage (2 litres pour 1 kg d'épinard ; Sorbitol 0,33 M; pyrophosphate de sodium 20 mM, pH 7,8 ;EDTA 1 mM, DTT 1 mM, BSA 0,1% (p/v)) dans un broyeur à hélice, 2 à 3 fois pendant 2-3 secondes (broyage à vitesse lente). Le broyat est ensuite filtré sur 4 couches de gaze puis sur une toile à bluter (50 µm de vide de maille). Le filtrat est centrifugé pendant 15 min à 4500 rpm (rotor Beckman JA14). Les culots, enrichis en chloroplastes, sont délicatement repris dans du tampon de lavage (Sorbitol 0,33 M ; MOPS/NaOH 20 mM, pH 7,8 ; EDTA 1 mM, DTT 1mM). Cette suspension est déposée sur un gradient discontinu de Percoll (Pharmacia) 40%-80% ((v/v) préparé dans du milieu de lavage) puis centrifugée pendant 25 min à 5 000 rpm (rotor Beckman JS 7.5) afin de séparer les contaminants extra-plastidiaux et chloroplastes cassés des chloroplastes intacts. Le résultat obtenu après centrifugation est présenté dans la figure 8 ci-dessous. Les chloroplastes cassés et contaminants (1) pénètrent peu dans la couche de Percoll 40% (v/v), ils restent en surface, formant une bande supérieure. Les chloroplastes intacts (2), bien démarqués en principe, sont situés au niveau de l'interface des couches de Percoll 40 et 80% (v/v). Afin d'éliminer le Percoll, les chloroplastes intacts sont dilués par 6 à 7 volumes de milieu de lavage et centrifugés 5 min à 3 000g (rotor Beckman JA 25.5). Le culot est récupéré et ce lavage réitéré

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

encore2 fois. Les chloroplastes sont finalement resuspendus dans un volume minimal de tampon de lavage.

Figure 8 : Purification de chloroplastes intacts d'épinard sur gradient discontinu de Percoll 40%/80%.

(1) : chloroplastes cassés et contaminants, (2) : chloroplastes intacts

V.A.2.1 *Séparation de sous compartiments plastidiaux*

La purification de compartiments sous plastidiaux est adaptée de (Douce *et al.* 1973a ; Douce *et al.* 1973b) Les chloroplastes intacts sont placés dans un milieu hypotonique (MOPS/NaOH 10 mM pH7,8 ; $MgCl_2$ 4mM) qui contient des inhibiteurs de protéases (benzamidine/HCl 1mM ; PMSF 1mM). Le volume de milieu hypotonique doit être environ 10 fois supérieur à celui des chloroplastes. La concentration finale en osmoticum est ainsi abaissée brutalement à moins de 0,1M, entraînant une entrée d'eau par osmose dans les chloroplastes qui éclatent. Les ions Mg^{2+} permettent le maintien de l'intégrité des membranes thylacoïdiennes et préviennent ainsi la contamination de l'enveloppe par des vésicules membranaires issues des thylacoïdes. La suspension de chloroplastes cassés est déposée sur un gradient discontinu de saccharose (saccharose 0,6M et 0,93M préparé dans du milieu hypotonique) et centrifugée à 72 000 g pendant 1h (rotor swing out Beckman JS24.38).

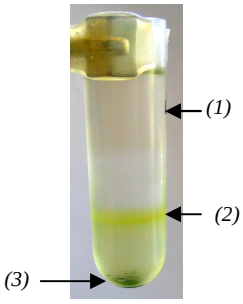


Figure 9 : Séparation des compartiments subplastidiaux obtenue après choc osmotique sur gradient de saccharose discontinu 0,6M/0,93M .

(1): stroma ; (2) : enveloppe intacte ; (3) : thylacoïdes.

Trois fractions sont alors obtenues, et présentées dans la figure 9: une couche supérieure du gradient, légèrement rosée, qui contient les protéines solubles du chloroplaste (1) ; l'enveloppe des chloroplastes, jaune, située à l'interface des couches de saccharose 0,6 et 0,93M (2) ; un culot vert qui contient essentiellement des thylacoïdes (3). Les protéines du stroma peuvent être dosées et utilisées telles quelles pour une immunodétection sur membrane, ou bien concentrées (si nécessaires) par précipitation au TCA (voir partie « concentration de l'échantillon par précipitation au TCA). Le culot de thylacoïdes est lavé dans du milieu hypotonique, et sédimenté par une centrifugation de 5 min à 3 000g (rotor swing out Beckman JS7,5). Ce lavage est répété deux fois. La fraction contenant l'enveloppe

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

est diluée 3 fois dans du milieu de lavage (MOPS/NaOH 10mM pH 7,8 ; benzamidine/HCl 1mM ; PMSF 1mM) puis concentrée par centrifugation à 113 000g pendant une heure (rotor JS24.38). Le culot d'enveloppe peut être repris dans du milieu de lavage ou conservé à sec et directement congelé. Cette fraction est exempte de toute contamination du cytosol ou de thylacoïdes. Seules quelques protéines solubles du stroma (telles que la rubisco, très abondantes dans le chloroplaste) peuvent être présentes dans les fractions de membranes d'enveloppe.

V.A.3 Isolement de mitochondries d'épinard

Ce protocole est adapté de Neuburger *et al.* 1982. Les feuilles d'épinard (3 à 4 kg) sont lavées, et dénervées comme vu précédemment pour la préparation de chloroplastes. Toutes les étapes qui suivent sont préparées à 4°C. Les feuilles sont broyées trois fois pendant une à deux secondes aux broyeur à hélices « Warning Blendor » tournant à faible vitesse, en présence de milieu de broyage froid (2 litres pour 1 kg de matière fraîche : Sorbitol 0,33 M; Pyrophosphate de sodium 20 mM pH 7,5 ; EDTA 1 mM ; PVP 25 (Serva) 0,5 % (p/v) ; BSA 0,2 % (p/v) et DTT 1 mM sont ajoutés juste avant utilisation). Le broyat est filtré sur 4 épaisseurs de gaze et une épaisseur de toile à bluter de 50 µM de vide de maille. La suspension filtrée est ensuite centrifugée 15 min à 1 500 g (rotor JA14, Beckman). Le culot contenant noyaux, chloroplastes et autres débris cellulaires sont éliminés. Le surnageant est centrifugé pendant 20 min à 10 000 g (rotor JA14, Beckman). Le culot est alors remis en suspension dans environ 50 mL de milieu de lavage (Mannitol 0,3 M ; KH_2PO_4 10 mM pH 7,2 ; EDTA 1 mM). La suspension de mitochondries est centrifugée de façon à éliminer les agrégats de membranes plastidiales et les plastes intacts contaminants (1 500 g, 10 min, rotor JA 20 Beckman). Le surnageant est récupéré et centrifugé de nouveau à 12 000 g pendant 20 min (rotor JA25.5 ou JA20 Beckman). On obtient alors un culot de mitochondries brutes encore largement contaminées par des membranes extra-mitochondriales et en particulier par des membranes thylacoïdiennes. Le culot est alors remis en suspension dans un petit volume de milieu de lavage, et les mitochondries sont purifiées par une centrifugation à travers un gradient linéaire de Percoll. Les tubes de centrifugation sont remplis à l'aide d'un générateur de gradient (« gradient maker Hoefer SG50 », Pharmacia) et d'une pompe péristaltique, par mélange progressif de 17 mL de solution A (dite légère : saccharose 0,3 M ; Percoll 28 % (v/v) ; KH_2PO_4 10 mM pH 7,2; EDTA 1 mM) à 17 mL de solution B (dite lourde : raffinose 0,3 M ; Percoll 30 % (v/v) ; KH_2PO_4 10 mM pH 7,2; EDTA 1 mM ; PVP 10 % (p/v)). Trois gradients sont ainsi formés entre le haut et le bas du tube : un gradient 0,3 – 0 M en

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

saccharose ; un gradient 0 – 0,3 M en raffinose ; un gradient 0 – 10 % en PVP. Les mitochondries brutes sont déposées délicatement au sommet du tube. Au cours de la centrifugation à 40 000 g (rotor à angle fixe JA25.5, Beckman) pendant 45 min, le Percoll génère un gradient de densité qui vient s'ajouter aux gradients de raffinose et PVP. Les mitochondries se situent alors entre la fraction des membranes plastidiales restées au sommet et la fraction des peroxysomes au fond du tube. Les mitochondries sont prélevées, diluées 8 à 10 fois dans du milieu de lavage pour éliminer l'excès de Percoll puis centrifugées à 13 000 g pendant 15 min (rotor JA20 ou JA25.5, Beckman). Ce lavage est répété 2 fois. Les mitochondries ainsi obtenues sont alors stockées à – 80°C.

V.A.4 Chez *A. thaliana*

V.A.4.1 *Purification de chloroplastes*

V.A.4.1.1. Extraction rapide

Ce protocole a été mis au point au laboratoire par Florence Courtois, en adaptant à partir de celui présenté dans « *Methods in Molecular Biology* », vol 82 : *Arabidopsis protocols*, 1998 (édité par J. Martinez-Zapater et J. Salinas). Il permet d'obtenir rapidement, et à partir de peu de matière fraîche, une fraction très enrichie en chloroplastes, permettant de réaliser une immunodétection uniquement. Des plantules d'arabidopsis sont cultivées pendant 14 jours sur milieu ATG gélosé (pour 1 litre : MS basalt salts mixture 4,308 g ; MES 0,5g ; sucrose 10 g ; pH 5,7 ajusté avec KOH ; Bactoagar 8 à 10 g) en cycle jours longs 16h lumière / 8h obscurité. 2 à 4 boîtes recouvertes au 2/3 environ suffisent pour fournir le matériel de départ. Elles sont broyées, en chambre froide, à l'aide d'une petit broyeur à hélice (type warning blendor, contenance d'environ 50 mL), en présence de tampon HB (Homogeneisation Buffer : Sorbitol 0,45M ; Tricine-KOH 20 mM, pH8.4 ; EDTA 10 mM ; $NaHCO_3$ 10 mM ; BSA 0,1% (p/v)) à 2 reprises, 2-3 secondes à chaque fois. Le broyat est filtré sur quatre épaisseurs de gaze et sur une toile à blutter de 50 µm de vide de maille; puis centrifugé 3 minutes à 5 000 g (rotor JS 7,5). Le culot de chloroplastes est repris dans 1 mL de tampon RB (Resuspension Buffer : Sorbitol 0,3 M ; Tricine-KOH 20 mM, pH 7,6 ; $MgCl_2$ 5 mM ; EDTA 2,5 mM). Des fractions de cette suspension sont ensuite déposés délicatement des un coussins de Percoll 40% (préparé dans du RB 2X concentré, puis volume ajusté avec de l'eau). Les chloroplastes intacts (2) sédimentent au cours d'une centrifugation de 5 min à 5 000 g, et le résultat obtenu illustré par la figure 10.

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

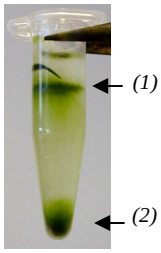


Figure 10 : Purification de chloroplastes intacts d'A. thaliana sur coussin de Percoll.

(1) : chloroplastes cassés et contaminants extra-plastidiaux ; (2) : chloroplastes intacts

Les chloroplastes cassés et autres résidus (1) forment un bande qui dans la partie supérieure du Percoll et entrent à peine dans le coussin. Ces débris et le Percoll sont éliminés. Les culots de chloroplastes sont alors lavés dans 500 µL de milieu RB, puis centrifugés 3 min à 3 000 g. Ce lavage est renouvellé à 3 reprises. Les culots peuvent soit être congelées secs à –80°C, soit être repris dans du tampon RB, rassemblés pour un dosage (chlorophylle ou protéines), soit directement repris dans du tampon de dépôt de protéines 2X concentré.

V.A.4.1.2. Grande préparation de de chloroplastes intacts

Ce protocole est réalisé à partir d'un bac de plantule d'*A. thaliana* de trois semaines, cultivées en semis dense en chambre de culture (conditions optimales 12h/12h jour/nuit). Les hampes florales naissantes sont coupées régulièrement pour favoriser le développement des feuilles. Les bacs sont placés à 4°C et à l'obscurité la nuit précédent l'extraction de chloroplastes afin de se débarrasser de l'amidon accumulé. Le protocole suivi est également adapté de « *Methods in Molecular Biology* », vol 82 : *Arabidopsis protocols* (édité par J. Martinez-Zapater et J. Salinas).

V.A.4.1.3. Séparation des fractions membranaires et solubles plastidiales par choc osmotique

Les chloroplastes sont éclatés par choc osmotique dans 10 volumes de tampon de choc (MOPS/NaOH, 10 mM pH7,8 ; $MgCl_2$ 4 mM et EDTA 2,5 mM ; PMSF 1 mM ; benzamidine.HCl 1 mM ; le magnésium aidant à préserver les membranes intactes). Les membranes plastidiales sont alors sédimentées par une centrifugation de 3 min à 5 000 g (rotor JA 25.5, beckman ou centrifugeuse de paillasse type Eppendorf 5417R pour une extraction miniaturisée). La fraction soluble est prélevée et mise de côté, le culot de membranes est lavé 3 fois puis finalement repris dans le milieu de choc osmotique.

V.A.4.2 *Extraction de noyau de cellules d'A. thaliana*

1 à 5 g de matériel végétal sont broyés dans un mortier refroidi constamment à l'azote liquide jusqu'à obtenir une poudre très fine. 20 mL de tampon d'homogénéisation froid

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

(Hexylène glycol ou 2-Me 2,4 Pentanediol 12,8 % (v/v) ; Hepes / KOH 10 mM pH 7,0 ; $MgCl_2$ 10 mM ; PMSF 1mM, benzamidine HCl 1mM) sont ajoutés à la poudre et le mélange vortexé énergiquement. L'extrait est alors filtré sur une toile à blutter (entre 80 et 150 µM de vide de maille), puis centrifugé 10 min à 3 000 g (rotor à angle fixe JA 25.5 ou JA14, Beckman). Le surnageant contenant les petits organites les moins denses est éliminé. Le culot blanc contient les noyaux, plus denses, il est en outre entouré de vert (chloroplastes). Le culot est repris dans 9 – 10 mL de tampon de lavage (Hexylène glycol ou 2-Me 2,4 Pentanediol 6,4 % (v/v) ; Hepes / KOH 10 mM pH 7,0 ; $MgCl_2$ 10 mM ; PMSF 1mM, benzamidine HCl 1mM). La suspension, essentiellement composée de noyaux, chloroplastes et de gros débris, est centrifugée à nouveau pendant 10 min à 3 000 g. Le culot est resuspendu dans 2 mL de tampon de lavage et déposé délicatement sur un gradient discontinu de Percoll 30 % - 60 % (v/v) (dans du tampon de lavage, 6 et 3 mL respectivement par gradient). Une centrifugation de 30 min à 400 g (rotor swing out JS 7.5 Beckman) permet alors de séparer les chloroplastes cassés et les débris pénétrant peu dans le percoll 30%, des noyaux situés à l'interface des 2 couches du gradient, et dans le Percoll 60%. Les noyaux sont récupérés et dilués dans 10 mL environ de tampon de lavage, puis sédimentés à 3 000 g, 10 min ; permettant ainsi de se débarrasser du Percoll. Le surnageant est éliminé et les noyaux repris dans un petit volume de tampon de lavage ou directement dans du tampon de dépôt de protéines sur gel d'acrylamide dénaturant.

VI. Techniques de détection des protéines

VI.A. Séparation des protéines par électrophorèse sur gel d'acrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)

VI.A.1 Préparation du gel de polyacrylamide et des échantillons

Les gels de séparation et de concentration sont préparés d'après *Molecular Cloning: a Laboratory Manual* (Hu J *et al.* 1991) (chap 18.52). Un gel d'étanchéité est coulé au bas des plaques (1 mL d'acrylamide 37,5/1, 25 µL de PAS, 2 µL de TEMED) afin d'éviter toute fuite du tampon de migration.

Les échantillons de protéines à séparer sont dilués dans du tampon de dépôt 1X final (Tampon 4X : 0,25 M Tris pH 6,8 ; 8 % SDS (v/v) ; 20 % glycérol (v/v) ; 20 % β-mercaptoéthanol ; bleu de bromophénol 0,02% p/v) et dénaturés pendant 10 min à 100°C.

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

VI.A.2 Electrophorèse en conditions dénaturantes

L'électrophorèse est réalisée dans un tampon de migration (Tris 25 mM ; Glycine 250 mM ; SDS 0,1 % p/v), à 100 volts jusqu'à ce que le front de migration arrive en bas du gel (cuve d'électrophorèse « mighty hoefer small », Amersham Pharmacia). Les polypeptides peuvent être colorés (au bleu de Coomassie ou au nitrate d'argent), ou bien transférés sur une membrane de nitrocellulose pour une immunodétection.

VI.B. Techniques de coloration des protéines sur gel

VI.B.1 Coloration au bleu de Coomassie R250

Le bleu de Coomassie permet le marquage des acides aminés aromatiques et offre une sensibilité de détection allant jusqu'à 50-100 ng. Le gel est incubé quelques heures dans une solution de bleu de Coomassie (Isopropanol 25% (v/v); acide acétique 10% (v/v) ; 0,15 % (p/v) Coomassie blue R250). L'excès de bleu de Coomassie est éliminée par deux lavages successifs : un premier lavage de 60 min dans du tampon de décoloration fort (éthanol 40% (v/v) ; acide acétique 10% (v/v)), et un bain de plusieurs heures dans un tampon de décoloration faible (éthanol 10% (v/v) ; acide acétique 7% (v/v) ; glycérol 5% (v/v))., jusqu'à obtenir une décoloration optimale du gel.

VI.B.2 Coloration des protéines sur gel au nitrate d'argent

Il s'agit d'une méthode de coloration des protéines plus fine et sensible que la coloration au bleu de Coomassie (sensibilité de détection : 1-10 ng). Ce protocole est décrit par (Swain & Ross 1995). Chaque étape est réalisée à température ambiante sous une agitation douce. Le gel est rincé pendant 10 min dans un bain éthanol 40 % (v/v) ; acide acétique 10 % (v/v) afin de fixer les protéines (la fixation peut être prolongé sur la nuit). Le gel est rincé 10 min dans de l'eau distillée. Les protéines sont ensuite fixées et la coloration sensibilisée par une incubation de 5 min dans un mélange éthanol 40% (v/v), glutaraldéhyde 0,025% (v/v), formaldéhyde 0,01% (v/v) . Le gel est alors rincé 20 min dans de l'éthanol 40% (v/v) et eau distillée 60 % (v/v), puis de nouveau 20 min dans de l'eau distillée. Le gel est incubé 1 minute dans une solution de thiosulfate de sodium (0,02 % (p/v) dans l'eau distillée), puis rincé à 2 reprises pendant une minute dans de l'eau distillée. Les protéines sont colorées 20 min dans une solution de nitrate d'argent 0,1 % p/v. Le gel est rincé une minute à l'eau. La coloration se développe par l'ajout d'une solution de carbonate de sodium 2,5 % (p/v),

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

formaldéhyde 0,04 %(v/v) (déposer quelques mL sur le gel pendant 1 à 2 min afin d'éliminer l'excès de sels, puis changer le bain). Quand le contraste optimum est atteint, la réaction est arrêtée par l'ajout d'acide acétique 5 % (v/v) pendant 5 min. Le gel peut être conservé dans de l'eau distillée ou dans une solution de carbonate de sodium 0,03 % (p/v).

VI.C. Technique d'immunodétection (Burnette 1981)

VI.C.1 Transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose

Un système de « sandwich» est réalisé à partir d'éponges et papier whatman préalablement imbibés dans du tampon de transfert (Tris 26 mM ; Glycine 190 mM ; SDS 0,037 % (p/v) ; éthanol 20% (v/v)). Le gel est placé au contact d'une membrane de nitrocellulose (Optitran BA-S 85 reinforced NC 0,45 µM, Schleicher & Schuell et compris entre deux feuilles de papier wathman et deux éponges, le tout aux dimensions du gel. IL est orienté vers la cathode et la membrane orienté vers l'anode de la cuve de transfert, permettant ainsi aux protéines, toutes chargées négativement par le SDS dans le gel, de se déplacer suivant les courants (électriques et salins) pour se déposer sur la matrice de nitrocellulose. Le transfert est effectué dans une cuve, remplie de tampon de transfert, pendant 75 min à voltage constant (100 Volts). L'appareil est refroidi par un bloc de glace et le tampon en permanence agité. Pour contrôler la qualité du transfert, la membrane est rincée à l'eau distillée et colorée au Rouge Ponceau (0,5% (p/v) Rouge Ponceau dans 1% (v/v) acide acétique) quelques secondes, puis décolorée à l'eau distillée jusqu'à distinguer nettement les protéines. Le rinçage se poursuit jusqu'à totale disparition du rouge. La membrane est ensuite incubée 5 min dans du TBS afin de neutraliser l'acidité du ponceau. Les sites de la membrane non recouverts de protéines sont saturés par une incubation d'une heure, à température ambiante, ou pendant une nuit à 4°C, dans du lait écrémé 5% (p/v) dans du TBS.

VI.C.2 Immunodétection

La membrane est alors incubée en présence du sérum, contenant l'anticorps primaire dirigé contre la protéine d'intérêt, dilué dans du lait 5% v/v dans TBS-Tween 20 (0,1% v/v). Cette étape peut être effectuée 1 à 3 h à température ambiante ou bien pendant une nuit à 4°C. Les interactions non spécifiques sont éliminées par une série de 6 lavages de 5 min dans du TBS-Tween 0,1% (v/v), sous agitation. Le filtre de nitrocellulose est finalement incubée 1h à 3h à température ambiante avec un anticorps secondaire (BIORAD) dilué au 1 / 3000 dans du lait 5% (v/v) TBS-Tween 0,1% (v/v). Ce dernier est dressé contre les IgG du sérum primaire,

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

et est couplé à une enzyme responsable de la détection de la protéine cible, la HRP (Horse Radish Peroxydase). La membrane est à nouveau lavée 6 fois 5 min dans du TBS-Tween 0,1% (v/v). La membrane est rincée avec un mélange équivolume des 2 substrats de la HRP (1 mL de réactif 1 + 1ml de réactif 2, ECL Western Blotting reagents, Amersham Pharmacia), placée entre 2 couches de film alimentaire dans une cassette à rayon X. La réaction est révélée en chambre noire, sur un film photographique KODAK après des temps d'exposition variables. Le film est placé dans un bain de révélation (révélateur KODAK, dilué au 1/5), jusqu'à apparition du signal, rincé, puis protégé par un bain dans le fixateur (Fixateur KODAK, dilué au 1/5). Le film est finalement rincé et séché.

VII. Méthodes utilisées pour la caractérisation d'anticorps

Les anticorps sont dirigés contre un peptide unique ou des couples de peptides (séquences en annexe 1). Ces anticorps ont été produits par Eurogentec selon leur protocole. Deux lapins sont immunisés par lot de peptides choisis.

VII.A. Détermination de la sensibilité des anticorps sur les peptides antigéniques : « dot blot »

Les peptides fournis sont sous forme lyophilisés. Une solution mère pour chaque peptide est préparée dans du PBS pH 7,4, à une concentration donnée. Des dilutions en cascades sont ensuite effectuées de sorte à obtenir une gamme étalon, permettant de réaliser des dépôts à de petits et volumes égaux sur une membrane de nitrocellulose. La membrane est alors séchée à température ambiante pendant 30 min environ. Les sites exempts de peptides sont finalement recouverts lors d'une incubation d'une heure dans du lait / TBS 5% (p/v). La spécificité de l'anticorps produit pour un peptide antigénique peut alors être observée par immunodétection

VII.B. Détermination de la spécificité des antisera sur protéines recombinantes

VII.B.1 Production de protéines recombinantes

Les protéines recombinantes NIP et NEP sont produites dans plusieurs systèmes d'expression procaryotique (pET, pBAD).

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

VII.B.1.1 *Préparation d'extraits bruts*

Une mini-culture de 1,5 mL (LB + antibiotique) est ensemencée à partir d'une colonie recombinante sur boîte, et incubée pendant la nuit à 37°C sous agitation (180 rpm). Elle est alors inoculée au 1/100 dans 10 mL milieu LB supplémenté en antibiotique. L'induction est démarrée lorsque la DO 600 nm atteint 0,7 à 1, par l'ajout de l'inducteur approprié à des concentrations finales variables. Une suspension est maintenue sans induction pour servir de contrôle. Les cultures sont poursuivies pendant 4h à 37°C et avec agitation (180 rpm). 1 mL est alors prélevé et les bactéries sédimentées par une centrifugation de 10 min à 10 000g. Les culots sont repris dans 100 µL tampon de dépôt de protéines 4X concentré (Tris HCl 250 mM pH 6,8 ; glycérol 20% (v/v) ; 2-mercaptoéthanol 10 mM ; SDS 4% (p/v) ; bleu de bromophénol 0,02% (p/v)) et dénaturées à 100°C pendant 10 min. Après SDS-PAGE, les protéines recombinantes peuvent alors être détectées soit par coloration au bleu de Coomassie ou au nitrate d'argent, soit par immunodétection.

VII.B.1.2 *Préparation de protéines recombinantes purifiées*

Dans cette optique, les suspensions de bactéries utilisées, exprimant la protéine d'intérêt, représentent des volumes plus importants. Une mini-culture de 1,5 mL (LB + antibiotique) est ensemencée à partir d'une colonie recombinante sur boîte, et incubée pendant la nuit à 37°C sous agitation (180 rpm). Elle est alors inoculée au 1/100 dans 10 à 400 mL de milieu sélectif, puis incubée dans les mêmes conditions de croissance jusqu'à atteindre une DO à 600 nm comprise entre 0,5 et 1. L'inducteur est alors ajouté de façon à obtenir une gamme de concentrations finales comprises entre 0 et 2% (p/v) pour l'arabinose et entre 0 et 2 mM pour l'IPTG (solutions stocks d'inducteur diluées dans de l'eau filtrée (0,2 µM), et conservées à – 20 °C). Les cultures sont placées soit à 37°C, soit à 16°C, sous agitation, pendant des temps variables (0 à 16h). Les bactéries sont ensuite sédimentées par une centrifugation de 10 min à 10 000g. Le culot est repris dans 1 à 10 mL de tampon de lyse (composition indiquée dans le manuel d'instruction des fournisseurs, pour les inductions dans le système pBAD/His : potassium phosphate 50 mM pH 7 ,8 ; NaCl 400 mM ; KCl 100 mM ; glycérol 10 % (v/v) ; Triton X100 0,5 % (v/v); 10 mM imidazole, auquel on rajoutera du lysozyme à une concentration finale de 1 mg/mL). La lyse est poursuivie à 4°C sous agitation pendant 1h. L'échantillon est alors soniqué (4 fois pendant 3-4 secondes avec une puissance 4-5, et un réglage compris entre 40 et 50% d'efficacité). Les corps insolubles sont sédimentés par une centrifugation de 20 à 30 min à vitesse maximum dans une centrifugeuse de paillasse réfrigérée. Les protéines de la phase soluble peuvent être alors soit séparées par SDS-PAGE,

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

pour une analyse des profils protéiques (coloration et/ou une immunodétection), soit purifiées par chromatographie d'affinité sur une résine fixant du Nickel (Ni-NTA, selon les instructions du fabricant (Invitrogen). Les protéines de fusion sont éluées par compétition avec des solutions d'imidazole en concentrations croissantes. Les fractions riches en protéines sont repérées par fractionnement des polypeptides par SDS-PAGE puis coloration au bleu de Coomassie. Elles sont alors rassemblées et finalement dialysées pour éliminer l'excès de sels.

VII.C. Purification des anticorps par chromatographie d'affinité sur peptides

La matrice de cette chromatographie d'affinité doit être préparée. Cette résine est constituée d'agarose (Affi-gel de BIORAD) possédant des groupes fonctionnels actifs de type N-hydroxysuccimide. Ces groupements réagissent spontanément avec les groupements amines primaires de l'antigène, assurant un couplage covalent de ligands protéiques ou peptidiques rapide et efficace. L'Affi-gel utilisé est fonction du pI de l'antigène à fixer (Affi-gel 10 pour un PI compris entre 6,5 et 10, et Affi-gel 15 pour un pI < 6,5). Ce gel présente une capacité de fixation de protéines allant jusqu'à 35 mg/mL, et supporte une pression maximale de 1 bar. La purification est réalisée en suivant les instructions du fournisseur.

VIII. Méthodes d'étude des protéines

VIII.A. Analyse de la topologie membranaire

VIII.A.1 Lavages de thylacoïdes intacts d'épinard

Les thylacoïdes intacts doivent être fraîchement préparés. La suspension de thylacoïdes est ajusté à une concentration de 1 mg/mL de chlorophylle (voir partie « dosage de la chlorophylle ») dans du tampon de choc (MOPS 10 mM pH 7.8 ; $MgCl_2$ 4 mM ; PMSF et benzamidine-HCl 1mM chacun). Au volume équivalent de 1 mg de chlorophylle, sont ajoutés soit une solution de NaCl (1 M final) soit de NaOH (0,1 N final). Ces lavages sont incubés 1h à 4°C, en agitation ou en rotation très douce. Les fractions insolubles sont précipitées par une centrifugation de 30 min à 35 000 rpm (rotor TL 100 à angle fixe, Beckman) à 4°C. Le culot est repris dans du tampon de choc, et la concentration en chlorophylle est à nouveau déterminée et ajustée à 1 mg/mL.

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

VIII.A.2 Traitement de thylacoïdes intacts par la thermolysine

La thermolysine est une protéase de *Bacillus thermoproteolyticus* particulièrement utile pour analyser les polypeptides situés sur la face externe de compartiments membranaires. Elle peut donc ainsi aider, d'une part à déterminer si une protéine est extrinsèque (périphérique ou associée à une membrane) ou intrinsèque (intégrale, intégrée dans une membrane), et d'autre part aider à l'analyse topographique d'une protéine membranaire. Cette métalloprotéase va couper tout polypeptide se trouvant a la surface d'une membrane. Elle nécessite la présence d'un cofacteur, le Ca^{2+}, pour être active, son action peut être par conséquent inhibée (et contrôlée) en présence d'un agent chélatant. Les thylacoïdes intacts utilisés pour cette expérience doivent être fraîchement préparés. Le protocole suivi a été adapté de Joyard *et al.* 1983, mis au point initialement sur des chloroplastes intactes. La suspension de thylacoïdes (ajustée à une concentration finale: 1 mg/mL de chlorophylle) est incubée 1h à 4°C dans un milieu contenant du MOPS/NaOH 10 mM, pH7.8 ; $MgCl_2$ 4 mM ; $CaCl_2$ 10 mM , et 25 000 unités de thermolysine (Boehringer). La réaction est arrêtée par ajout d'EGTA (20 mM final). Deux réactions sont réalisées, en présence ou non d'un inhibiteur, l'EGTA (20 mM). En parallèle, un contrôle est effectué en présence d'EGTA 20 mM dès le début de la réaction. Les thylacoïdes sont alors centrifugés 10 min à 5 000 g, puis lavés 2 fois dans du MOPS/NaOH 10 mM pH7.8 ; $MgCl_2$ 4 mM. Le culot est repris dans le même tampon.

VIII.B. Méthodes d'analyse des protéines

VIII.B.1 Solubilisation de complexes membranaires

Les membranes plastidiales sont obtenues par choc osmotique comme vu précédemment. La solubilisation de complexes membranaires est adaptée de Sazanov et al. 1998. Cette dernière est essentielle à une séparation par chromatographie. Elle requière l'utilisation de détergents, dont les propriétés doivent être appropriées à l'étude réalisée. Dans le cadre de l'analyse de complexes, ce traitement est réalisé dans les conditions les plus natives possible afin de conserver au mieux ces ensembles quaternaires. Les membranes sont sédimentées 30 min à 35 000 g (rotor JA 25,5, Beckman) puis lavées dans la solution de choc contenant du sel (NaCl 15 mM). Elles sont de nouveau centrifugées dans les mêmes conditions et resuspendues dans le milieu de choc, NaCl 15 mM, glycérol 10% (v/v). La suspension doit être alors ajustée à 2mg/mL de chlorophylle. La solubilisation dépend du

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

rapport protéine/détergent, mais la chlorophylle étant plus rapide à doser, la concentration de la suspension est ajustée en fonction de ce paramètre. Les protéines membranaires sont solubilisées par l'ajout goutte par goutte d'un détergent doux, le n-dodécyl lauryl maltoside (Sigma) à une concentration mère de 5 % (p/v), sous agitation régulière, jusqu'à arriver à une concentration finale de 1 % (p/v). La solubilisation se poursuit sous agitation constante à 4°C pendant 30 min. Le matériel non solubilisé est éliminé par une centrifugation de 30 min à 35000g. L'extrait en suspension peut alors être séparé par chromatographie.

VIII.B.2 Séparation des protéines par chromatographie d'exclusion

VIII.B.2.1 *Caractéristiques et préparation de la colonne*

La chromatographie d'exclusion permet de séparer des molécules en fonction de leur taille et de leur forme. Une première chromatographie a été réalisée avec une colonne de matrice agarose, la superose 6 HR10/30 (Amersham Pharmacia), permettant une séparation des protéines comprises dans une gamme très large. Cet essai a permis d'affiner le choix d'une autre colonne afin de mieux cibler fenêtre de séparation pour le complexe d'intérêt. La colonne utilisée alors régulièrement, la superdex 200 HR10/30 (Amersham Pharmacia), est constituée d'une matrice composite de dextran et agarose. Les chromatographies sont réalisées dans le système ÄKTA Purifier d'Amersham Pharmacia, guidé par informatique. Ce contrôle est assuré par le logiciel UNICORN.

	Préparation et définition des paramètres de la chromatographie :			
Caractéristiques des colonnes	**Volume total de la colonne (mL)**	**Pression maximale Mpa)**	**Débit (mL/min)**	**Gamme de fractionnement (kDa)**
Superose6 HR10/30	**24**	**1,2**	**0,3-0,5**	**5 - 5 000**
Superdex 200 HR 10/30	**24**	**1,5**	**0,25 – 0,75**	**10 – 600**

Tableau 3 : Paramètres de chromatographies sur Superose 6 et Superdex S200.

Toutes les solutions utilisées doivent être préalablement filtrées (filtre 0,2 µm). La colonne est stockée dans l'éthanol 20%. Il est éliminé par un lavage de 2 volumes de colonne (vc) d'eau. Elle est alors prête à être équilibrée avec un tampon approprié. Le volume d'échantillon injecté ne doit pas excéder 1 à 3% du volume de la colonne. Après séparation

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

d'un échantillon, la colonne est lavée avec au moins 2 vc d'eau et conservée dans de l'éthanol 20% (v/v) (2 vc) à 4°C.

VIII.B.2.2 *Etalonnage de la colonne*

Les colonnes sont étalonnées avec des marqueurs de masse moléculaire standard (catalase,.240 kDa ; 2 mg/mL et gel filtration standards de BIORAD: thyroglobuline bovine 670 kDa ; γ-globuline bovine 158kDa ; ovalbumine de poulet 44kDa ; myoglobine de cheval 17kDa ; vitamine B_{12} 1,35 kDa. La courbe étalon déduite est spécifique de la colonne et des conditions expérimentales utilisées lors de la chromatographie. Le volume mort (V_0). De la colonne est estimé via l'utilisation du bleu de dextran (2000 kDa ; à 1 mg/mL).

VIII.B.2.3 *Elution des échantillons*

Les colonnes sont équilibrées par 2 vc de tampon de choc osmotique ; NaCl 15 mM, lauryl maltoside 0,1% (p/v). L'échantillon est injecté manuellement et élué par 1,5 vc de tampon de choc; NaCl 15 mM ; lauryl-maltoside 0,1%. Les chromatogrammes sont établis en fonction de l'absorbance des protéines (280 nm) et de l'absorbance de la chlorophylle totale et/ou caroténoïdes (652 nm et 450 nm respectivement) au cours de l'élution.

VIII.B.3 Analyse des fractions obtenues par gel filtration par SDS-PAGE

VIII.B.3.1 *Concentration des échantillons par précipitation au TCA*

Une aliquote des fractions collectées est précipité dans la glace pendant 30min à 1h en présence d'1/10 de volume final de TCA. La sédimentation des protéines est accélérée par une centrifugation de 10 min à 20 000 g. Le culot est lavé à l'acétone 80% (v/v), puis séché. L'échantillon est alors repris dans du tampon de dépôt de protéines, et dénaturé 10 min à 100°C.

VIII.B.3.2 *Séparation et détection des protéines*

Les extraits des fractions précipités sont alors séparés par électrophorèse en conditions dénaturantes. Les dépôts sont réalisés en double afin de pouvoir d'une part, observer le profil d'élution et la séparation des protéines, et d'autre part, détecter la ou les protéines d'intérêt au cours de l'élution par immunodétection .

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

VIII.B.4 Etude d'interactions protéine-protéine la surface des membranes

VIII.B.4.1 *Pontage chimique*

Le pontage chimique est réalisé suivant plusieurs cinétiques sur des membranes plastidiales d'épinard et d'arabidopsis obtenues directement après choc osmotique des chloroplastes (comme vu précédemment). Il faut cependant exclure, lors de la préparation de membranes, l'utilisation de tout tampon source de groupements amines, ainsi que l'utilisation d'agent réducteur dans les tampons. Des cinétiques sont réalisées jouant sur la concentration de DSP, la quantité de matériel à ponter, et la durée de réaction afin d'optimiser les conditions expérimentales. Le volume de DSP utilisé ne doit pas excéder 10% du volume réactionnel. La réaction se fait dans un volume de 1ml, comprenant : des membranes de chloroplaste (quantité ajustée en fonction de la quantité de chlorophylle, entre 0,5 et 2 mg) ; le DSP (concentrations comprises entre 0,5 et 2mM) ; le volume final étant ajusté à 1mL avec du tampon de choc. La réaction se déroule à température ambiante, sous agitation, pendant 15 à 60 min. Elle est stoppée par l'ajout de Tris pH7.5 à 50 mM final, durant 15 min. Les réactions optimales sont déterminées comme indiqué dans la partie suivante. Elles seront ensuite solubilisées et fractionnées par chromatographie d'exclusion.

Les produits de ces réactions sont tout d'abord séparés par SDS-PAGE et les complexes d'intérêt analysés par immunodétection afin de contrôler la spécificité d'action du DSP. Les échantillons déposés sur gel sont cependant préparés différemment. Pour chaque réaction, les dépôts sont doublés sur gel afin de contrôler l'action du DSP. Deux aliquotes de chaque réaction sont dilués dans deux tampons de dépôt de protéines (2X ou 4X concentrés) contenant ou non du ß-mercaptoethanol, devant représenter 5% (v/v) du volume total de l'échantillon à dénaturer 5 min à 100 °C. L'utilisation de tampon sans agent réducteur permettra de distinguer l'effet du pontage chimique. La présence de ß-mercaptoethanol, au cours de la dénaturation, permettra de dissocier les ponts disulfures engendrés par le DSP, et de retrouver la protéine cible à l'état de monomère ou individualisée. Ces deux traitements assurent la spécificité de l'action du DSP. Après séparation par SDS-PAGE, les polypeptides sont transférés sur membrane de nitrocellulose et la protéine d'intérêt détectée par anticorps.

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

RESULTATS

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

CHAPITRE 1

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

RESULTATS

Chapitre 1 : Analyse d'une nouvelle famille de gènes et protéines chez *A. thaliana*

Le but de ce travail de thèse est d'étudier une nouvelle famille de protéines d'Arabidopsis, identifiée par une approche double hybride chez la levure, comme facteurs de transcription potentiels interagissant avec les ARN polymérases NEP. Il a fallu tout d'abord effectuer une analyse bio-informatique afin de récolter quelques renseignements pouvant nous guider dans nos recherches.

Ce premier chapitre présente les données disponibles dans les banques *in silico*, ainsi que les recherches effectuées avec des outils bio-informatiques.

I. Analyse des gènes *NIP* chez *A. thaliana*

I.A. Organisation des gènes *AtNIP*

Les ADNc *AtNIP1* et *AtNIP2* ont été isolés à partir du crible double hybride effectué en utilisant SoRPOT ;2 comme appât. Une première recherche dans les séquences génomiques d'Arabidopsis disponibles à l'époque a mis en évidence un troisième gène très homologue aux deux précédents, appelé *AtNIP3*. Récemment, une recherche avec des critères de sélection moins stringents (recherche blastn sur http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ avec des scores supérieurs à 100) a permis d'identifier un quatrième gène pouvant s'apparenter aux gènes *AtNIP*, nommé *AtNIP4*. Les gènes *AtNIP1*, *AtNIP2*, *AtNIP3*, *AtNIP4* sont respectivement localisés sur les chromosomes IV, II, V et I. Les données bio-informatiques concernant l'annotation de ces gènes sont présentées dans le tableau 3.

Ces gènes *NIP* d'*A. thaliana* sont caractérisés par une grande identité de séquence nucléotidique au niveau de leurs séquences codantes. Les exons des gènes *AtNIP1* et *AtNIP2* présentent environ 80% d'identité. *AtNIP3* est quant à lui plus proche de *AtNIP2* que de *AtNIP1* (49% d'identité contre 34%). Le gène *AtNIP4* est le plus éloigné puisqu'il ne présente pas de similarité significative au niveau des séquences codantes avec les trois autres gènes. La comparaison des séquences du génome et des ADNc *NIP1* et *NIP2* (comparaison blastn sur http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) a permis de positionner leurs introns. En fait, les

quatre gènes de cette famille présentent la même organisation en 5 exons et 4 introns suggérant une origine commune.

	AtNIP1	AtNIP2	AtNIP3	AtNIP4
Locus	At4g35840	At2g17730	At5g66070	At1g74410
Clone	AL031986	t17a5	K2A18	F1M20
Longueur de séquence codante Met-Stop (pb) (1)	711	723	666	672
Accession EMBL	AK118022	AK118593	x	AY050433
identité nucléotitidique sur séquences codantes (%) (2) AtNIP1	100	80	34	Non significatif
AtNIP2		100	49	Non significatif
AtNIP3			100	Non significatif
AtNip4				100X

Tableau 3 : Récapitulation des données génomiques de la famille NIP chez A. thaliana.

(1) La séquence codante est définie par la phase de lecture ouverte la plus grande. (2) Les identités de séquences sont estimées à l'aide du programme « bl2seq » sur ***http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi****, permettant de comparer un couple de séquences d'intérêts (nucléotidiques ici). Elles sont finalement rapportées sur la longueur de la séquence primaire la plus grande.*

Seul le début de l'exon 1 se distingue par une plus grande variabilité de séquence – excepté pour le couple *NIP1*/*NIP2* - avec seulement 19% d'identité entre *NIP1*/*NIP3* et 25% entre *NIP2*/*NIP3* d'après le programme « bl2seq » (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi) (résultats non montrés).

Cette famille de gène *AtNIP* comporte donc trois membres particulièrement proches, suggérant des fonctions similaires. Le dernier gène identifié *AtNIP4* est plus distant.

Etant donné que les ADNc *AtNIP1* et *AtNIP2* ont été isolés dans une banque d'ADNc de rosettes, nous allons rechercher dans la partie suivante si les gènes *NIP* sont exprimés dans d'autres parties de la plante ainsi que dans d'autres organismes.

I.B. Analyse des EST («Expressed Sequence Tag »)

La présence d'EST peut donner des indications sur le degré et le profil d'expression tissulaire d'un gène. Nous allons d'abord rassembler les ESTs disponibles dans les banques de données chez *A. thaliana* puis nous allons élargir cette recherche aux autres organismes afin d'identifier des homologues.

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

I.B.1 Analyse des EST chez *A. thaliana*

Les recherches d'EST (« Expressed Sequence Tag ») sont faites par comparaison de séquence à l'aide de l'ADNc ou gène d'intérêt sur l'ensemble des banques d'EST disponibles (programme blastx, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/ et http://mips.gsf.de/proj/thal/db). Au début de mes travaux de thèse, seul *NIP2* présentait une EST détectée dans une banque établie à partir d'ARNm totaux de racines d'Arabidopsis (écotype Columbia Col-0). Toutes les EST de cette famille apparues depuis sont rassemblées dans le tableau 4.

Nous constatons que les EST *NIP2* sont les plus nombreuses, et semblent présentes dans tous les tissus, et dans tous les stades : de la graine aux feuilles sénescentes. Les transcrits *NIP4* sont détectés dans les rosettes ainsi que dans un mélange de tissus de plantules étiolées ou non. Les EST *NIP1* sont détectées uniquement dans des extraits issus d'organes reproducteurs et *NIP3* semble lui être détecté majoritairement dans les banques obtenues à partir d'extraits racinaires. Le profil d'expression n'est sans doute pas complet car l'accumulation des messagers peut être en dessous du seuil de détection des transcrits lors de la fabrication d'une banque d'EST.

EST (Numéros d'accession) Organes ou tissus sources	AtNIP1	AtNIP2	AtNIP3	AtNIP4
RACINES		AV539195 AV551599	AI996823 AV539195 AV551599	
FLEURS ET SILIQUES	AU230118 AU238872	AU239462 AU230771		
GERMINATION à GRAINE MATURE		AV808117.1		
FEUILLES SENESCENTES		CD534166		
ORGANES AERIENS (2 à 6 semaines)		AV521888		
MELANGE DE TISSUS (1)				T21251 AA395606
ROSETTES				AV784006

Tableau 4 : EST NIP trouvées dans les banques de données chez A. thaliana.

(1): plantules étiolées 7 jours + racines + rosettes + organes aériens (tiges, fleurs et siliques).

Alors que le gène *AtNIP2* semble être exprimé de façon ubiquitaire, les gènes *AtNIP1* et *AtNIP3* s'accumulent apparemment davantage dans les fleurs/siliques et racines respectivement.

I.B.2 Recherche d'EST homologues

Un crible large d'EST a mis en évidence des EST homologues aux transcrits d'Arabidopsis chez d'autres organismes. Quelques EST sont regroupées dans le tableau 5. Elles sont présentes exclusivement chez les végétaux, et jusqu'ici, aucune EST n'a été identifiée chez les végétaux inférieurs tels que les mousses et les algues.

Les homologies peuvent s'étendre depuis le milieu de l'exon 1 jusqu'au codon stop. Certaines EST débutent à un codon codant une méthionine, et présentent une phase ouverte de lecture paraissant complète. Elles sont retrouvées dans tous types d'organes et de stade de développement (des graines au fruit). Les EST les plus représentées suggèrent l'existence de deux gènes chez les plantes monocotylédones, notamment le riz. Cette observation est confirmée aujourd'hui grâce au séquençage complet du génome nucléaire du riz. Les séquences *NIP* identifiées chez *Arabidopsis thaliana*, sont présentes exclusivement chez les végétaux supérieurs. Elles correspondent à des gènes exprimés dans différentes espèces et organes, à divers stades de développement.

II. Analyse bioinformatique des séquences primaires des protéines NIP

II.A. Comparaison globale des séquences primaires d'*A. thaliana* et l'épinard

Les gènes *AtNIP1*, *AtNIP2*, *AtNIP3*, *AtNip4*, *SoNIP* codent des polypeptides de 236, 241, 221, 223, 235 résidus respectivement. Les protéines NIP sont donc de petites protéines d'environ 25 kDa. Elles sont caractérisées par une grande identité de séquence primaire (figure 11). Les protéines NIP1 et NIP2 sont les membres les plus proches de cette famille avec 89% d'acides aminés identiques.

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

Espèce		Origine de la banque d'EST	Stade de développement ou traitement	Numéro d'accession
Malus x domestica (pomme)		Fruit	Différents stades de développement	CV085140 .1
				CV083744.1
				CO541112.1
				CN995346.1
Vitis vinifera (vigne)		fruits		CB981280.1
				CB981214.1
				CF373044.1
		feuilles	Jeunes feuilles	CF204100.1
Lycopersicon esculentum (tomate)		feuilles	Plantes de 4 semaines	AI771987.1
		racines	Déficit en nutriments (1)	BF09412.1
		ovaires	5 jours pré-anthèse	AI484098
		Méristème +plantules		BG126900
Gossypium	hirsutum	Fibres immatures	6 j post-anthèse	AI729483
	arboreum	fibres	7 à 10 j post-anthèse	BQ406243
	raimondii	plantule	1ère paire de feuilles	CO094618
Nicotiana	tabacum	Cellules BY-2	Divers stades de la courbe de croissance	BP134837
	attenuata	plantules	rosettes	CA591726
Oryza sativa (riz)		feuilles	Plantes âgées de 3 semaines	CB658098
				CB652459
				CB658099
				CB670349
Brassica napus		graines		CD813120
Saccharum officinarum		feuilles	Après l'induction florale	BQ534995
		transition tige - racines	Jeunes plantes	CA152732
Zea mays		Mélange de tissus	Divers stades	BG874017
			Idem avec traitement hormonal	BM350726
				BM334459
				BM335855
		Endosperme		BM268656
		Graines germées + plantules		BM337671

Tableau 5 : EST homologues à la famille de gènes NIP d' A. thaliana

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

(1) : déficit en Al ou Zn, ou P, ou K, ou Fe, ou N.

La comparaison des séquences montre que les protéines sont particulièrement proches entre les résidus 52 et 149 (91% d'identité, relatif à NIP2) et à l'extrémité C-terminale (résidus 195 à 239 soit 93% d'identité, relatif à NIP2) si on se base sur la séquence AtNIP2 (figure 11). La protéine AtNIP4 est la plus éloignée des trois autres protéines identifiées initialement, avec seulement environ 30 % d'identité (tableau 6). Ce pourcentage ne paraît pas important, cependant, comme en témoigne l'alignement de leurs séquences primaires dans la figure 11, les résidus identiques s'étendent sur toute la séquence primaire et en particulier sur les deux blocs bien conservés au sein de la famille (résidus 52 à 149 et 195 à 239, voir figure 11).

La protéine NIP d'épinard présente à peu près les mêmes identités de séquence avec les trois protéines d'Arabidopsis, NIP1, NIP2 ou NIP3 (tableau 6). Cependant, un petit motif (surligné en gris sur la figure 11) riches en acides aminés basiques (N), compris entre les positions 177 à 181 sur la séquence primaire de SoNIP, est retrouvé chez les protéines NIP1 et NIP2, et absent chez les protéines NIP3 et NIP4 d'Arabidopsis. Cette observation suggère que la protéine d'épinard est l'orthologue des protéines NIP1 ou NIP2 d'Arabidopsis. Les protéines AtNIP1, AtNIP2, AtNIP3 et SoNIP sont particulièrement proches, sur toute la séquence primaire et dès les 20 à 30 premiers résidus. Deux blocs sont particulièrement conservés (52-149 et 195-239). Nous observons également sur l'alignement de la protéine AtNIP2 avec d'autres orthologues que ces deux blocs sont bien conservés chez d'autres espèces (figure 12). Les alignements des séquences primaires (figures 11 et 12) montre une conservation de résidus entre les paralogues AtNIP et entre les orthologues. Nous allons maintenant analyser l'organisation des protéines NIP et rechercher si ces deux domaines conservés correspondent à des motifs connus.

Identité (%) acides aminés	AtNIP1	AtNIP2	AtNIP3	AtNIP4	SoNIP
AtNIP1	100	89	75	31	69
AtNIP2		100	73	26	70
AtNIP3			100	28	71
AtNIP4				100	33
SoNIP					100

Tableau 6 : Identité des séquences primaires des paralogues NIP d'A. thaliana et chez l'orthologue d'épinard.

Les pourcentages sont établis sur la longueur complète des protéines, et non sur des régions limitées de la séquence primaire.

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

```
                    10        20        30        40        50        60
                     |         |         |         |         |         |
AtNIP1      -----MASSRFQSGFCPISSCPSLENFIERIKDACRFTLSAVLGTILSAVLTFFFALVGT
AtNIP2      MASSSSSSYRFQSGSYPLSSSPSLGNFVERIKDACHFLVSAVLGTIISAILTFFFALVGT
AtNIP3      -----------MDGYYSLSPISVL----HRIKDSFHFAVSALLANLFSALFTFFFALVGT
AtNIP4      -----------------MDTTLSPAVEAEQIADSTIDTVSRLIAGVFSGALTGIFAMAGA
SoNIP       -----MEFYSYPSQRIA-SSSSILCDLGEKIRGTLSFAVSVTLGSLFSAFFTFCFALVGT

                    70        80        90       100       110       120
                     |         |         |         |         |         |
AtNIP1      LLGALTGALIGQETESGFIRGAAVGAISGAVFSIEVFESSLVLWKSNESRFGCLLYLIDV
AtNIP2      LLGALTGALIGQETESGFIRGAAIGAISGAVFSIEVFESSLDLWKSDESGFGCFLYLIDV
AtNIP3      LLGALTGALIGQETESGFIRGAAVGAISGAVFSIEVFESSLLLWQSDESGIGCLLYLIDV
AtNIP4      FTGAVTGAVAGRAAQYGVLRGAALGAVAGAILSVEVLEASRAYWYLELSGSRGPSSMADF
SoNIP       LLGAMTGALIGQETESGFVRGAAIGAISGAVFSIEVFESSVVLWRSDESGIGCILYLIDV

                   130       140       150       160       170       180
                     |         |         |         |         |         |
AtNIP1      IVSLISGRLVRERIGPAMLSAVQSQMGAVDSTFEELSSIFDTGGSKGLTGDLVDKIPKIK
AtNIP2      IVSLLSGRLVRERIGPAMLSAVQSQMGAVDTAFDDHTSLFDTGGSKGLTGDLVEKIPKMT
AtNIP3      IASLLSGRLVRERIGPAMLSAVQSQMGAVESQFQDHTDIFDTAISKGLTGDSLNRIPKVR
AtNIP4      VEQLFRGRLVDEQLMSTMINSHHWQLRISDVSYEEREDVYGELEARGLSGDSLRKLPCYI
SoNIP       IASLLSGRLVRERIGPAMLSAVQSQMGAVETNFEDITNIFDTGSVKGLSGDLVEKIPKIK

                   190       200       210       220       230       240
                     |         |         |         |         |         |
AtNIP1      ITGKNNLDASGNKDSCSVCLQDFQLGETVRSLPHCHHMFHLPCIDNWLFRHGSCPMCRRD L--
AtNIP2      ITGNNNTDASENTDSCSVCLQDFQLGETVRSLPHCHHMFHLPCIDNWLLRHGSCPMCRRD I--
AtNIP3      IT-----DTSPEIVSCSVCLQDFQVGETVRSLPHCHHMFHLPCIDKWLRRHASCPLCRRH L--
AtNIP4      MSSE---MVRRQVTHCTICLQDIKTGEITRSLPKCDHTFHLVCVDKWLIRHGSCPICRQA VKD
SoNIP       ITKNNNNDASGERVSCSVCLQDFQIGETVRSLPDCHHLFHLPCIDKWLLKHASCPLCRRD L--
```

Figure 11: Comparaison des séquences primaires des protéines NIP d'Arabidopsis et d'épinard

L'alignement est établi à l'aide du programme Multialin de NPSA (http://npsa-pbil.ibcp.fr). Les résidus identiques au sein de l'ensemble des protéines sont représentés en rouge ; un acide aminé identique sur trois ou quatre protéines est indiqué en vert. Les positions présentant des acides aminés à propriétés similaires sur une position conservée sur toutes les protéines sont indiquées en bleu. Le motif surligné en gris est conservé entre AtNIP1, AtNIP2 et SoNIP.

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

```
                         10        20        30        40        50        60
                          |         |         |         |         |         |
AtNIP2          MASSSSSSYRFQSGSYPLSSSPSLGNFVERIKDACHFLVSAVLGTIISAILTFFFALVGT
O.sativa_chr6   ----------MDPSGAFFHAAPRSGSNVSLASLARTAGGRRMMHRVFRGVITFIFAIAGL
O.sativa_chr10  -------MDASPSSSSSSPVAPEVVQWAGGADGFGSAAIGFAC-RVLCAVATCVFAAVGS
L.esculentum    xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxFALVGT
T.aestivum      xxxxxxxxxxxxxxRHESSSAPEPRQWAGGRPGLGSAALELAS-KVLCVVATCAFAAVGS

                         70        80        90       100       110       120
                          |         |         |         |         |         |
AtNIP2          LLGALTGALIGQETESGFIRGAAIGAISGAVFSIEVFESSLDLWKSDESGFGCFLYLIDV
O.sativa_chr6   FLGAVTGGLIGLATESGLFRGTGIGAITGALVSIEVVDSSIRVWRSRRSGISSICYVLNV
O.sativa_chr10  VVGAVTGSAIGLATESGMLRGAGIGAISGAVFSIEVAESSRDLWHSSDSAVWCLVYMVDI
L.esculentum    LLGAMTGALIGQETESGFVRGAAVGAISGAVFSLEVFESSLLLWQSDESGIGCLLYLIDV
T.aestivum      LVGAVSGSVIGLATESGVVRGAGIGAISGAVFSIEVAESSRDLWHTSDSSVWSVLFMVDI

                        130       140       150       160       170       180
                          |         |         |         |         |         |
AtNIP2          IVSLLSGRLVRERIGPAMLSAVQSQMGAVDT-AFDDHTSLFDTGGSKGLTGDLVEKIPKM
O.sativa_chr6   IYSLLTGRLVREKVDPAVQRVVRSQMNAVDSSPFRESPDLFEIEGTNGMPRASIDKLPEV
O.sativa_chr10  ISSLLSGRLVREKVGPAVQSAVQSQISAISS-PFAETSDLFETGGTKGLPADTLRRLPAI
L.esculentum    IASLLSGRLVRERIGPAMLSAVQSQMGAIES-AYDEFPNIFDVGGAKGLPGDSVEKIPKI
T.aestivum      ILSLLSGRLVCEKVGPAVQSAVQSQISAISS-PFTEPSDLFETGGARGLPAHALRRLPAI

                        190       200       210       220       230       240
                          |         |         |         |         |         |
AtNIP2          TITGNNNTDASENTDSCSVCLQDFQLGETVRSLPHCHHMFHLPCIDNWLLRHGSCPMCRR DI
O.sativa_chr6   RITEEYRRNAIGDLSGCSVCLQDFQTGEKVRSLPDCWHVFHVPCIDGWLIKHGSCPLCRR KL
O.sativa_chr10  KITGDNAVDSAGEPICCSVCLQDFRVGEMARRLPSCRHVFHVPCIDCWLVRHGSCPLCRR DI
L.esculentum    VITNDNDVDDSGERVSCSVCLQDFQRGETARCLPQCHHMFHLPCIDTWLLRHGSCPLCRR DL
T.aestivum      KVGADTAVDEAGEALCCSVCLQDLEVGESARRLPGCRHVFHAPCIDRWLVRHASCPLCRR DI
```

<u>*Figure 12 : Comparaison des séquences primaires déduites de certaines EST orthologues NIP avec la protéine AtNIP2 .*</u>

L'alignement est établi avec le programme Multialin de NPSA (http://npsa-pbil.ibcp.fr). Les séquences sont déduites des EST comportant les phases de lecture les plus longues. Les séquences débutant avec une méthionine sont complètes. Les EST utilisées sont, chez le riz (Oryza sativa) : EST (C28330, cals de riz), gène correspondant dans le chromosome 6 (Chr6) ; et EST (AK119332) avec le gène correspondant dans le chromosome 10 (chr10) ; chez la tomate (Lycopersicon esculentum) : EST253087 ; chez le blé (Triticum aestivum) : EST20810778. Les positions présentant des résidus identiques au sein de l'ensemble des protéines sont représentées en rouge ; un acide aminé identique retrouvé sur aux moins trois protéines pour une même position est indiqué en vert. Les positions comportant des acides aminés à propriétés similaires sont représentées en bleu.

II.B. Organisation structurale de la famille NIP chez *A. thaliana* et épinard

Nous allons ici analyser les régions conservées d'un point de vue fonctionnel.

Les protéines NIP présentent un modèle d'organisation conservé entre diverses espèces (figure 13). Elles sont divisées en 3 domaines : une région N-terminale présentant les caractères d'une séquence d'import vers un organite; une région centrale membranaire; et une extrémité C-terminale comportant un motif RING finger.

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

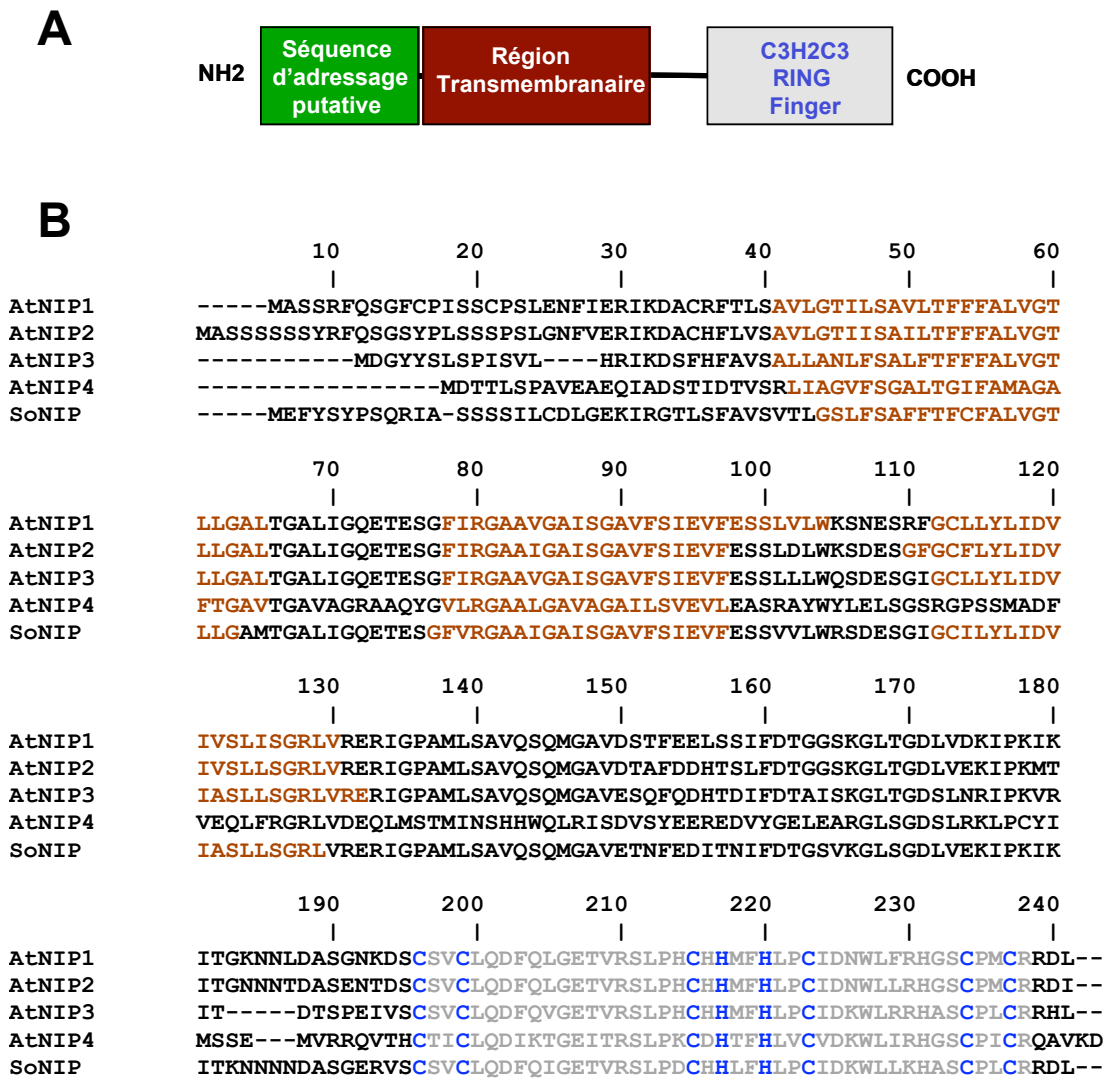


Figure 13 : Organisation structurale des protéines NIP

A : Schéma d'organisation des protéines ; B : Motifs conservés. B : alignement des séquences primaire réalisées sur NPSA. Les domaines transmembranaires sont présentés en rouge, avec en amont une séquence d'adressage putative, le motif RING finger est représenté en gris et ses résidus critiques invariants en bleu.

II.B.1 Région N-terminale: bloc 1

Les séquences primaires des régions N-terminales peuvent permettre de prédire la localisation subcellulaire de protéines. Les régions N-terminales des protéines NIP sont relativement divergentes au sein de cette famille. Elles peuvent correspondre à des séquences d'import organellaires. Les séquences AtNIP1, AtNIP2 et SoNIP sont riches en acides aminés hydroxylés, et contiennent quelques résidus chargés, essentiellement basiques, propriété typique des peptides de transit.

Les protéines AtNIP3 et AtNIP4 ne remplissent pas ce dernier critère, en outre elles présentent des séquences N-terminales plus divergentes par rapport à celles des deux autres

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

protéines. AtNIP1 et AtNIP2 semblent, elles, rassembler toutes les caractéristiques des séquences d'import plastidiales énumérées par Peeters et Small (Peeters & Small 2001), soit,
une richesse en acides aminés hydroxylés,
quelques acides aminés basiques,
très rarement des résidus acides,
et pas de leucine dans les dix premiers aminoacides.

Ces séquences polypeptidiques ont été étudiées à l'aide de divers logiciels de prédiction de localisation subcellulaire (tableau 7). Le programme ChoroP conclut à une localisation plastidiale si le score est au dessus de 0,5. Il est très restrictif n'attribuant que très rarement des scores conséquents (par exemple, score de 0,572 attribué à la petite sous unité de la rubisco *RBCS*). Le programme Predotar est lui surtout optimisé pour discriminer parmi les protéines organellaires (mitochondrie et plaste).

Le programme Psort annonce NIP1 et NIP2 respectivement dans la mitochondrie et le plaste. L'ensemble des autres programmes utilisés confirme la localisation plastidiale de la protéine NIP2. La tendance générale prédit que ces quatres protéines sont associées à des compartiments membranaires. Mais ces informations ne sont pas homogènes et probablement pas assez significatives, et nécessitent bien sûr d'être confirmées expérimentalement.

II.B.2 Région centrale: bloc 2

Le logiciel TMpred (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html) indique l'existence d'hélices transmembranaires localisées dans la première moitié N-terminale de la famille de protéines NIP. Elles sont localisées dans le premier bloc conservé, vu dans la comparaison globale des séquences primaires NIP (bloc 52 à 149 par rapport à AtNIP2). Une topologie à 3 hélices transmembranaires (figure 13B), est proposée pour les protéines AtNIP1, AtNIP2 et AtNIP3, et seulement deux hélices pour AtNIP4. Les scores attribués par TMpred aux modèles proposés sont présentés dans le tableau 8.

Cette région, présentant plutôt un profil hydrophobe, est la mieux conservée au sein de la famille NIP d'Arabidopsis et dans d'autres organismes végétaux. Par conséquent, elle pourrait constituer un domaine fonctionnel important.

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

	AtNIP1	AtNIP2	AtNIP3	AtNIP4	SoNIP
Psort Score	Membrane interne mitochondrie 0,704 Membrane plasmique 0,6 Thylacoïdes 0,467 Golgi 0,4	Membranes thylacoïdiennes 0,97 Membrane interne mitochondrie 0,767 Stroma 0,704 Espace thylacoïdien 0,704	Membrane plasmique 0,6 Golgi 0,4 Réticulum endoplasmique 0,3 Thylacoïdes 0,26	Membrane plasmique 0,6 Golgi 0,4 Réticulum endoplasmique 0,3 Peroxysome 0,3	Membrane plasmique 0,6 Membrane interne mitochondrie 0,465 Golgi 0,4 Réticulum endoplasmique 0,3
ChloroP Score	Non chloroplastique 0,488	Chloroplaste 0,541	Chloroplaste 0,514	Non chloroplastique 0,476	Chloroplaste 0,525
TargetP Score	ID 0,516	Chloroplaste 0,323	ID 0,687	ID 0,966	ID 0,702
Predotar Score	ID 0,82	chloroplaste 0,57	ID 0,92	ID 0,99	chloroplaste possible 0,26

Tableau 7 : Prédictions d'adressage des protéines NIP

Les prédictions ont été faites avec les logiciels Psort, ChloroP TargetP et Predotar (http://psort.nibb.ac.jp;http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/;http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/;http://genoplant-info.infobiogen.fr/predotar/predotar.html). Les résultats principaux pour chaque protéine sont surlignés en gris. ID : localisation indéterminée.

	AtNIP1	AtNIP2	AtNIP3	AtNIP4
Position Hélice 1 score	36 – 60 2621	41 – 65; 2621	26 – 50; 2584	25 – 48; 2002
Position Hélice 2 score	73 – 99 ; 1321	78 – 97; 1256	63 – 82; 1314	61 – 80; 1462
Position Hélice 3 Score	107 – 125 ; 832	110 –130; 1149	95 – 115; 989	X

Tableau 8 : Modèles d'organisation des hélices transmembranaires de la famille NIP d'Arabidopsis

Ce tableau présente le positionnement des hélices transmembranaires suggéré par TMpred (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html) pour les protéines AtNIP ainsi que les scores associés. Seuls les scores au dessus de 500 sont considérés comme significatifs par le logiciel.

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

II.B.2.1 *Région C-terminale: bloc 3*

La région C-terminale est marquée par une signature de type C3H2C3 RING finger ou RING-H2 Finger (Pfam PF00097 ; voir figures 13 et 14). Les acides aminés invariants de ce motif sont rigoureusement conservés (Jackson *et al.* 2000):

Cys-X2-**Cys**-X(9-39)-**Cys**-X(1-3)-**His**-X(2-3)-**Cys** ou **His**-X2-**Cys**-X(4-48)-**Cys**-X2-**Cys**.

Ce consensus riche en cystéines coordonne la fixation de 2 ions zinc en adoptant une géométrie tétrahédrique (motif de fixation d'ion zinc, InterPro ID : IPR001841). Ces motifs RING (Lovering *et al.* 1993) sont classés en 2 catégories suivant la nature du résidu (Cystéine ou Histidine) en position 5: C3**HC**4 appelé aussi RING-**HC**, et C3**H2**C3 ou RING-**H2**. Kosarev P et collaborateurs ont réalisé une étude à grande échelle passant en revue toutes les prédictions de protéines à motif RING finger chez *A. thaliana*. Afin de certifier la discriminer les « vraies » signatures RING finger d'autres domaines proches, ils ont établi 4 niveaux de confiance basés sur les données structurales récentes d'arrangements structuraux métal-ligand de protéines RING finger bien caractérisées (Kosarev *et al.* 2002).

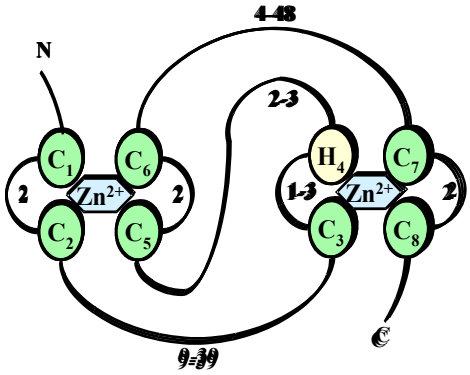


Figure 14 : Représentation schématique de structures RING finger, et ici, un domaine RING-HC.

Un domaine RING finger de type HC comporte une histidine à la place d'une cystéine, en position des résidus invariants. Les paires 1 et 3 (vert) ligand métalliques coordonnent le premier ion zinc (bleu) et les paires 2 et 4 le second, suivant un arrangement dit en « bras croisé ». Les espacements entre ces résidus critiques sont également indiqués. N et C désignent respectivement les orientations N-terminale et C-terminale.

Les domaines des protéines AtNIP1, AtNIP2, AtNIP3 répondent à trois critères de certitude sur quatre, et AtNIP4 remplit tous les critères, ils sont donc estimés par ces auteurs comme des véritables signatures RING-H2 finger.

Le 3ème domaine identifié est un motif RING finger connu pour intervenir dans les interactions protéine/protéine. Il pourrait donc être impliqué dans la reconnaissance de

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

SoRPOT ;2, ce qui est à vérifier bien sûr expérimentalement. Au début de ces travaux, la caractérisation de 3 facteurs potentiels de sélectivité associés à 3 ARN polymérases organellaires de type phagiques chez Arabidopsis laissaient envisager une duplication parallèle des gènes codant pour l'enzyme et le facteur putatif associé. Mais la situation est plus complexe, et il vient s'ajouter finalement une quatrième protéine.

De récents travaux sur les protéines à RING finger associent la présence de ces motifs à une activité ubiquitine E3 ligase (Jackson *et al.* 2000) ; (Freemont 2000). En effet, les protéines à RING finger jouent un rôle critique dans de nombreux processus cellulaires tels que le cycle cellulaire, la balance apoptose/prolifération (Tao & Levine 1999), la régulation du niveau de protéines de la membrane plasmique et trafic cellulaire, la réparation de l'ADN, la régulation de l'activité de facteurs de transcription nucléaires (Matsuda *et al.* 2001), ainsi que dans le développement de la jeune plantule chez Arabidopsis (COP1) (Hardtke & Deng 2000). Les E3 ligases sont chargées de l'étiquetage spécifique à l'ubiquitine de substrats protéiques spécifiques, soit destinés à une dégradation par le protéasome, soit présentant une activité régulée par l'ajout d'ubiquitine. Le protéasome est uniquement localisé dans les compartiments nucléaire et cytosolique. Les protéines NIP pourraient donc éventuellement jouer un rôle autre que facteur de transcription vis à vis de la polymérase.

En résumé, les protéines NIP sont spécifiques des végétaux supérieurs. La famille NIP chez *A. thaliana* comporte quatre protéines, deux d'entre elles, AtNIP1 et AtNIP2, les plus identiques (89 % identité de séquence primaire) ont été identifiées au laboratoire par crible double hybride, et seraient susceptibles d'interagir avec l'ARN polymérase SoRPOT ;2 chez la levure. Les deux autres protéines, AtNIP3 et AtNIP4, ont été mises en évidence par bioinformatique. L'organisation structurale des protéines de la famille NIP est conservée. Les logiciels prédisent clairement un adressage de la protéine AtNIP2 dans le chloroplaste et une insertion membranaire pour les 4 protéines (TMpred). Les protéines AtNIP possèdent en outre un motif d'interaction protéine-protéine RING finger. Les séquences polypeptidiques déduites des EST homologues montrent une conservation relativement importante des régions membranaires potentielles ainsi qu'une conservation stricte de la séquence RING finger à l'extrémité C-terminale. Cependant, ces prédictions *in silico* ne sont que des indications et nécessitent d'être confirmées expérimentalement, comme nous allons l'exposer dans les chapitres suivants.

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

CHAPITRE 2

Chapitre 2 : Caractérisation des anticorps anti-NIP et anti-NEP

Des anticorps ont été produits chez le lapin contre les protéines du système transcriptionnel NEP, et NIP. Nous avons pris le soin de caractériser les antisera NIP et NEP, car ils constituent des outils importants sur lesquels repose une grande partie du travail effectué pour la suite de l'étude ; notamment lors de la détermination des localisations subcellulaires, ainsi que lors d'analyses biochimiques dédiées à l'étude des interaction avec les protéines cibles. Nous allons, tout d'abord présenter ces outils dans ce chapitre.

I. Caractérisation des anticorps anti-NIP

I.A. Préparations des anticorps

Dans un premier temps, nous avons essayé de produire des anticorps dirigés contre les protéines recombinantes AtNIP1 et AtNIP2. La production de protéines recombinantes AtNIP1 et AtNIP2 a été faite par P. Jaiswal durant un séjour post-doctoral dans notre laboratoire. Les ADNc AtNip1 et AtNip2 ont donc été tout d'abord clonés dans des vecteurs d'expression procaryotes de protéines recombinantes de type pET (voir Matériels et Méthodes). Les protéines recombinantes obtenues ne sont pas détectables dans les extraits bactériens bruts ou purifiés, séparés par SDS-PAGE, et colorés au bleu de Coomassie ou au nitrate d'argent. En outre, les anticorps monoclonaux reconnaissant les étiquettes (motif poly-histidines) ajoutées aux protéines recombinantes révèlent par immunodétection une accumulation des protéines recombinantes dans des corps d'inclusion. Pour contourner ces difficultés, P. Jaiswal a introduit l'ADNc AtNIP2 dans un vecteur de type pBAD-His. Ce système pBAD permet d'exercer un contrôle négatif sur l'expression du transgène avant induction. Il peut ainsi aider à limiter l'accumulation des protéines NIP dans les fractions insolubles. Finalement, le taux d'expression des protéines AtNIP2 n'a pas été suffisamment augmenté pour permettre l'immunisation des lapins.

Etant donné qu'il n'a pas été possible de produire en quantité suffisante les protéines recombinantes AtNIP1 et AtNIP2, des peptides de 14 et 15 acides aminés ont été utilisés pour immuniser les animaux.

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

a) Choix des antigènes

Les peptides ont été choisis à l'aide du logiciel « Peptide structure ». Ils sont présentés et cartographiés par rapport à la séquence primaire sur la figure 15. Deux lapins ont été immunisés pour chaque couple de peptides. Les antisera sont récapitulés dans le tableau 9. Les protéines NIP ne comportent qu'une seule région à pouvoir antigénique localisée près de l'extrémité C-terminale, très conservée dans cette famille. Il est par conséquent nécessaire de vérifier la spécificité des sera obtenus.

	Immunisation	
Protéine cible	**Couples de peptides antigènes**	**Antisera produits**
AtNIP1	**Peptides 52 + 53**	**Antisérum SE581**
	Peptides 52 + 53	**Antisérum SE582**
AtNIP2	**Peptides 54 + 55**	**Antisérum SE583**
	Peptides 54 + 55	**Antisérum SE584**

Tableau 9: antisera produits chez des lapins, dressés contre des peptides des protéines AtNIP1 et AtNIP2

Choisies sur AtNIP1 et AtNIP2, les séquences des peptides sont proches de leurs homologues situées sur les autres protéines NIP d'Arabidopsis et d'épinard. Seules les régions correspondantes de la protéine AtNIP4 sont plus distantes avec des identités de séquences de 1/15, 8/15, 1/15, et 0/15 respectivement par rapport aux peptides 52, 53, 54, 55.

I.B. Spécificité et sensibilité des antisera dirigés contre NIP

I.B.1 Détermination de la sensibilité des antisera

La sensibilité des antisera a été déterminée par immunodétection sur des quantités croissantes de peptide (voir Matériels et Méthodes). Les résultats ne sont pas reportés ici. Testés sur des quantités importantes de peptides antigènes, les sera pré-immuns ne produisent aucune réaction. Les antisera anti-AtNIP1 et anti-AtNIP2 reconnaissent spécifiquement les peptides utilisés lors de leur immunisation. De plus, l'antisérum SE581 AtNIP1 ne détecte qu'un seul des deux peptides utilisés lors de l'immunisation : le peptide 53.

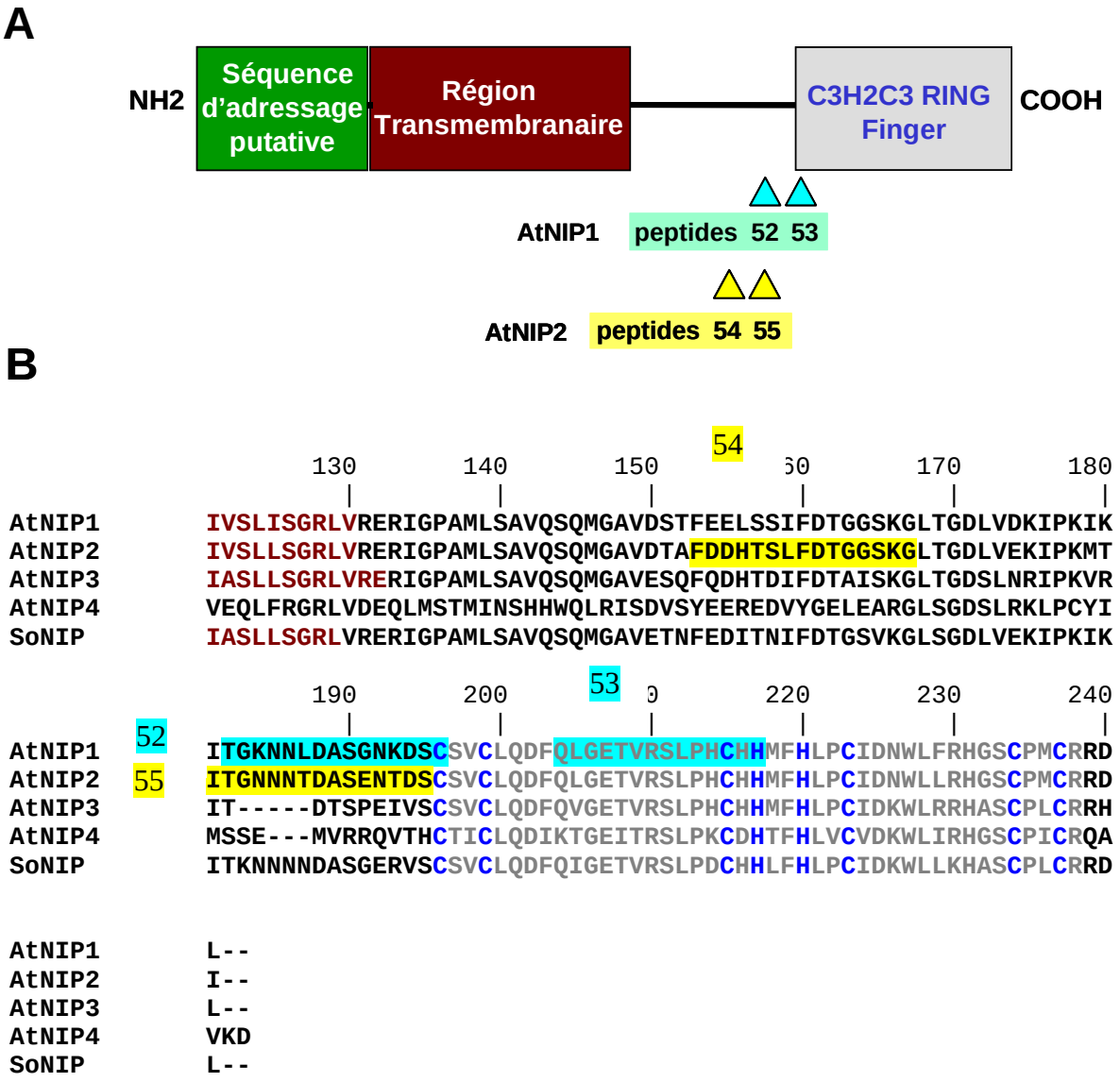


Figure 15 : Position des peptides antigènes correspondant aux protéines AtNIP1 et AtNIP2

A : Les peptides choisis sont localisés sur un schéma d'organisation des protéines AtNIP1 et AtNIP2. B : Séquences primaires des peptides sur un alignement de la partie C-terminale des protéines NIP. Les peptides AtNIP1 et AtNIP2 sont respectivement surlignés en bleu et jaune. Les résidus prédits dans les membranes sont présentés en marron, les résidus constituant le domaine RING finger sont représentés en gris, et les résidus critiques en bleu.

Le sérum anti-AtNIP1 SE582 reconnaît, lui, uniquement le peptide 52, choisi juste en amont du motif RING Finger. Il est par ailleurs beaucoup plus sensible que le premier sérum SE581 car il peut détecter jusqu'à 5 ng de peptide. L'antisérum SE583 dirigé contre AtNIP2 peut détecter jusqu'à 20 ng de peptide 54 et 200 ng de peptides 55, alors que le second sérum anti-AtNIP2 SE584, reconnaît exclusivement le peptide 55, dans les conditions utilisées.

D'après ces résultats, les antisera SE582 dirigé contre AtNIP1 et SE583 dirigé contre AtNIP2 semblent plus sensibles. Ils seront donc utilisés le plus souvent dans la suite de notre étude.

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

I.B.2 Vérification de la spécificité des antisera AtNIP1 SE582 et AtNIP2 SE583 par rapport aux protéines cibles

La spécificité et la sensibilité de détection des antisera SE582 et SE583, dirigés contre les protéines AtNIP1 et AtNIP2, ont été déterminées par immunodétection sur les protéines recombinantes.

L'expression des protéines recombinantes a été tout d'abord contrôlée par détection avec des anticorps monoclonaux produits chez la souris et dirigés contre les étiquettes poly-histidines fusionnées aux protéines AtNIP1 et AtNIP2. Ces résultats, obtenus par P. Jaiswal, sont présentés dans la figure 16 A. Ils révèlent un polypeptide de masse moléculaire attendue dans les fractions induites, soit environ 25-27 kDa pour les clones pET28a ::*AtNIP1* et pBAD/HisC ::At*NIP2*, et environ 40 kDa pour le clone pET32a ::*AtNIP1*. Ce signal est spécifique car aucun polypeptide n'est reconnu dans les extraits de bactéries Top10 et dans les clones recombinants non induits. Les anticorps anti-histidines réagissent bien avec des polypeptides de masse moléculaire attendue, et confirment par conséquent la production de la protéine recombinante AtNIP1 et AtNIP2 par les clones testés.

Au vu de ce résultat, les protéines recombinantes AtNIP1 ou AtNIP2 sont exprimés en quantité suffisante dans les extraits induits pour permettre alors le contrôle de la spécificité des antisera SE582 et SE583 (Figure 16 B).

Nous avons par la suite utilisé les protéines recombinantes AtNIP1 et AtNIP2 purifiées par P. Jaiswal pour déterminer la spécificité des antisera SE582 AtNIP1, SE583 AtNIP2. (Figure 16B). Les deux seras SE582 et SE583 détectent un polypeptide de masse moléculaire attendue, proche de 25 kDa, dans des extraits contenant la protéine purifiée correspondante. Ce polypeptide n'est pas reconnu par les prélèvements pré-immuns. Chacun de ces antisera semble donc reconnaître sa protéine cible. De plus, l'antisérum AtNIP2 SE583 ne détecte pas la protéine recombinante AtNIP1 dans les conditions de l'expérience. L'antisérum AtNIP1 SE582, quant à lui, peut reconnaître la protéine recombinante AtNIP2 ; Nous pouvons donc utiliser l'antisérum SE582 pour détecter à la fois les protéines AtNIP1 et AtNIP2. Finalement nous avons vérifié que ce polypeptide de 25 kDa est également reconnu dans les extraits protéiques brutes d'*E. coli*. Ce contrôle, présenté à la figure 16C, a été obtenu avec

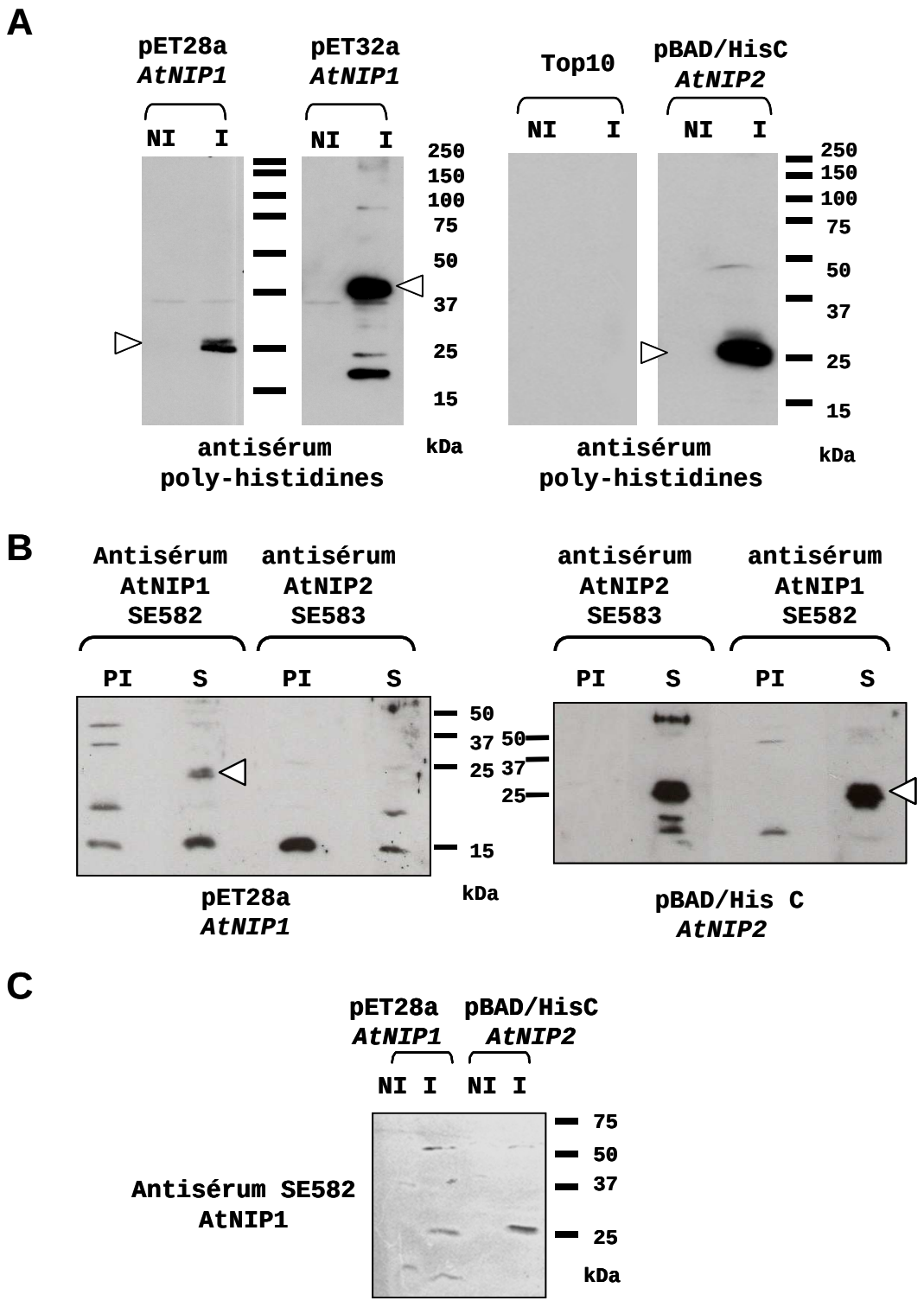


Figure 16 : Immunodétection des protéines recombinantes AtNIP1 ou AtNIP2 produites chez E. coli par les sera spécifiques.

Conditions d'induction : clones pET28a ::AtNIP1 / pET32a ::AtNIP1 : 2 mM d'IPTG ; clone pBADHisC :: AtNIP2 : 2% (p/v) L-arabinose, pendant 4h à 37°C ;. Clone pET28a ::AtNip1 : IPTG 1,5 mM ; clone pBAD/HiSC ::AtNIP2 : O,1 % L-arabinose. Immunodétection des protéines recombinantes AtNIP1 et AtNIP2 en utilisant , A : un anticorps dirigé contre l'étiquette poly-histidines dilué au 1/3000 ; B : les antisera SE582 (dilution 1/5000) et SE583 (dilution 1/3000) ; C :l'antisérum AtNIP1 SE582 (dilution 1/3000) ▷ : polypeptide correspondant à NIP produit. NI : extraits bactériens Non Induits et I : extraits induits et purifiés.

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

l'antisérum AtNIP1 SE582, sur des fractions brutes non induites et induites de bactéries transformées avec pET28a ::*AtNIP1* et pBAD/HisC ::*AtNIP2*.La réaction ne révèle pas de polypeptide d'environ 25 kDa dans les extraits non induits. Nous pouvons donc conclure que le polypeptide observé est spécifiquement exprimé lors de l'induction et détectable dans les extraits bruts. L'antisérum SE582 reconnaît donc bien les protéines recombinantes AtNIP1 et AtNIP2.

Finalement, contrairement au sérum AtNIP2 SE583, le sérum SE582 semble assez peu spécifique de sa protéine cible, AtNIP1. Nous allons donc utiliser le serum SE582 pour rechercher, dans la partie suivante, une éventuelle réaction croisée sur les autres protéines NIP: AtNIP3 et SoNIP.

I.B.3 Détermination de réactions croisées de l'antisérum SE582 sur les protéines AtNIP3 et NIP d'épinard

L'ADNc codant la protéine AtNIP3 a été cloné dans le vecteur pBAD/HisB. La protéine de fusion AtNIP3-$(His)_6$ produite est détectée avec un anticorps monoclonal dirigé contre cette étiquette (Figure 17A). Il révèle clairement un polypeptide de masse moléculaire attendue, soit environ 25 kDa, exclusivement dans les extraits bactériens induits. La protéine recombinante est donc bien produite. Nous pouvons alors vérifier si l'antisérum SE582 est également capable de reconnaître la protéine AtNIP3. Comme le montre l'immunodétection (Figure 17A), cet antisérum ne révèle aucun polypeptide de 25 kDa dans les extraits induits. La figure 17B présente le résultat de l'immunodétection effectuée avec l'antisérum AtNIP1 SE582 et le sérum pré-immun correspondant, sur des bactéries transformées avec le vecteur pBAD ::SoNIP. L'antisérum détecte un polypeptide de masse moléculaire attendue, proche de 25 kDa, spécifiquement dans les extraits induits, et ceci, dès 3h d'induction. Le signal de détection augmente avec le temps d'induction. De plus, le sérum pré-immun ne présente aucune réaction sur les extraits bactériens induits pendants 16h. Nous pouvons donc penser que l'antisérum SE582 reconnaît la protéine SoNIP recombinante. Cette dernière expérience a été réalisée en collaboration avec JP. Alcaraz. Ce résultat concorde avec le fait que l'anticorps AtNIP1 SE582 reconnaît uniquement le peptide 52 conservé dans les protéines AtNIP1, AtNIP2 et SoNIP, comme le montre un alignement des séquences primaires de ces protéines (Figure 15).

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

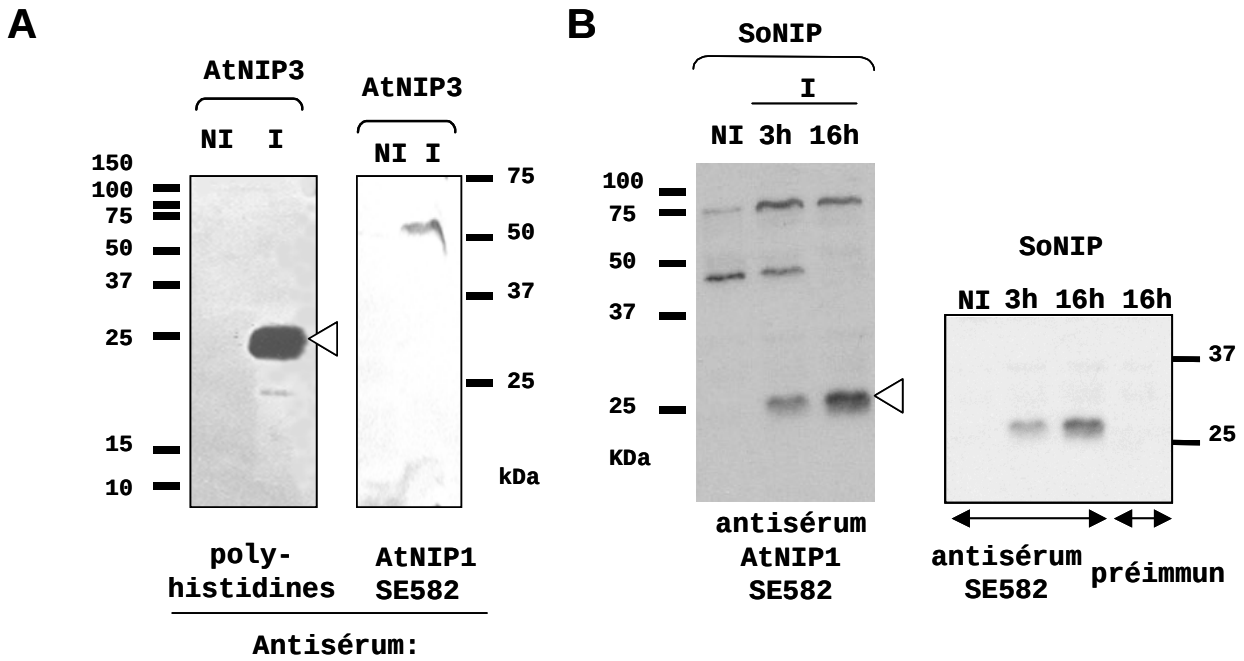


Figure 17 : Test de spécificité des anticorps anti-AtNIP1 SE582 sur les protéines recombinantes AtNIP3 (A) ou SoNIP (B).

Conditions d'induction : pBAD/HisB ::AtNIP3 : 4h à 37°C et L-arabinose 0,1 % (p/v); pQE30 ::SoNIP : IPTG 1 mM pendant 3 et 16h à 16°C. : NI : Extraits non induits ; I : induits. Immunodétections réalisées avec le sérum SE582, dilué au 1/5000:Protéine recombinante : A : AtNIP3 et B : SoNIP. ◁ : protéine NIP détectée.

En conclusion, l'antisérum AtNIP1 SE582 reconnaît les protéines NIP1 et NIP2 d'Arabidopsis et d'épinard. Nous nous limiterons donc souvent lors des analyses menées chez les plantes à l'utilisation de cet anticorps anti-NIP1 SE582.

Ainsi, nous avons vérifié dans cette étude que les antisérum AtNIP1 SE582 et AtNIP2 SE583, préparés à partir de peptides, reconnaissent les protéines cibles dans les extraits bactéries exprimant les protéines recombinantes correspondantes. Nous allons maintenant déterminer leur profil de réaction dans des extraits végétaux.

I.B.3.1 *Immunodétection sur des extraits protéiques totaux*

Les réactions produites par les antisera dirigés contre les protéines AtNIP1 et AtNIP2, ainsi que par les sera pré-immuns, sur des protéines totales extraites de feuilles d'Arabidopsis et d'épinard sont rassemblées sur la figure 18. Nous constatons l'absence de réaction avec les sera pré-immuns sur les extraits d' *A. thaliana*. (Figure 18A). Chez l'épinard, ils ne produisent pas non plus de réaction avec des polypeptides proches de la masse moléculaire attendue, soit 25 kDa (Figure 18B).

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

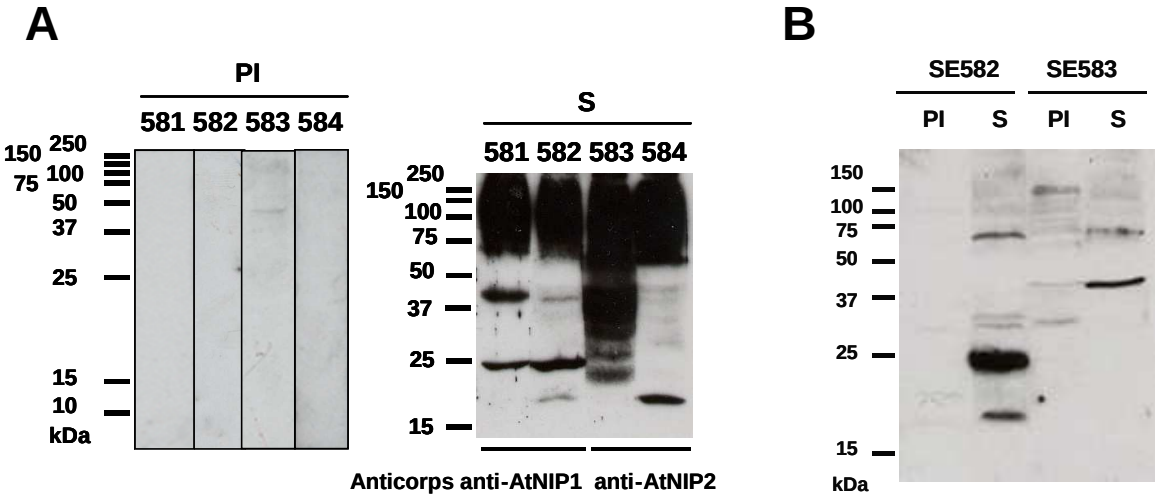


Figure 18 : Profil de réaction des antisera dirigés contre les protéines AtNIP1 et AtNIP2, sur des extraits totaux de feuilles d'A. thaliana et d'épinard

Les protéines totales extraites de feuilles d'A. thaliana (A ; 30 µg) ou d'épinard (B ; 40 µg) sont séparées par SDS-PAGE (acrylamide 12%.). Après transfert, les pistes des membranes sont découpées puis incubées soit avec un antisérum (S) dirigé contre AtNIP1 (SE581 et SE582) ou AtNIP2 (SE583 et SE584) ou avec les prélèvements pré-immuns (PI) correspondants (dilution au 1/5000).

Les antisera SE581 et SE582 contre AtNIP1, reconnaissent un polypeptide de masse moléculaire attendue voisine de 25 kDa, chez les protéines totales Arabidopsis (Figure 18A) et d'épinard (Figure 18B). Comme nous l'avons vu dans la partie précédente, l'antisérum AtNIP1 SE582 reconnaît les protéines recombinantes AtNIP1 et AtNIP2 exprimées par des bactéries transformées. Or, les séquences de ces protéines AtNIP ne diffèrent que de quelques résidus (Figure 15), l'identité de la protéine détectée par les anticorps SE582 chez les extraits végétaux ne peut donc être définie. Aucun polypeptide de taille attendue n'est en revanche mis en évidence par les antisera AtNIP2 SE583 et SE584 dans les protéines totales isolées à partir des feuilles d'*A. thaliana* et d'épinard.

Par conséquent, les anticorps dirigés contre AtNIP2, SE583 et SE584, ne détectent pas, dans les conditions utilisées, la protéine cible dans des extraits totaux végétaux. Les antisera SE581 et SE582 AtNIP1 reconnaissent un polypeptide de 25 kDa environ chez Arabidopsis et l'épinard. Le sérum SE582 sera donc préférentiellement utilisé au cours de cette étude. Etant donné que nous ne pouvons pas distinguer entre NIP1 et NIP2 à l'aide des anticorps, nous nommeront par la suite le sérum SE582 « sérum anti-NIP ».

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

II. Caractérisation des anticorps dirigés contre les NEP d'épinard

Plusieurs antisera ont été produits contre les NEP d'épinard et d'Arabidopsis. Nous nous limiterons ici à l'étude des ARN polymérases de type phagique d'épinard.

II.A. Préparation des anticorps

Afin de s'assurer la spécificité des antisera vis à vis de leur protéine cible, des peptides ont également été choisis pour immuniser des lapins. Ils ont été sélectionnés par S. Mache à l'aide du logiciel « Peptide structure ». Nous disposons de deux lots de *sera* dirigés contre chacune des ARN polymérases plastidiales RPOT ;2 et RPOT ;3 obtenus après immunisation avec soit avec un peptide unique, soit avec un couple de peptides (antisera noté alors « 2P »).

a) Choix des antigènes

Les peptides antigènes sont choisis dans la région N-terminale des ARN polymérases monomériques d'épinard. Leurs séquences primaires et leurs positionnements au sein des protéines sont présentés sur un alignement des séquences primaires des NEP (Figure 19). Nous pouvons constater sur cet alignement, qu'au sein d'une même espèce, les régions N-terminales des NEP présente une grande variabilité de séquence. Des peptides antigènes choisis dans cette partie des protéines peuvent donc potentiellement permettre de discriminer les ARN polymérases au sein d'une même espèce. Pour une polymérase donnée, tous les antisera disponibles détectent un même polypeptide dans des extraits protéiques totaux de plantes séparés par SDS-PAGE. Cependant, nous allons uniquement nous focaliser sur la caractérisation des antisera les plus utilisés afin de constituer des outils solides pour ce travail (Tableau 10).

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

```
AtRPOT;2 1  MSSAQTPLFL ANQTKVFDHL IPLHKP-FIS SPNPVSQSFP MWRN-IKQAI SRS---AARL 60
SoRPOT;2    MSSSNISSFP AVLSQNFDPY IQIYKSRSNF LINPCFDSTI MWRNFAKQAI SRTPNLCLRK
AtRPOT;3    MASŃAAAASP SLSLNPTSHF QHQTSLVTWL KPPPSSALFR --RKTLPFFE RHSLPISASS
SoRPOT;3    MSS--TASFS PIPQVQIQKQ WRKPLKSHKK ASKTTHFSLF IPLSSKQLRI EHPLFPSSSS
   T7       ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
AtRPOT;2    NVSSQTRGLL VSSPESIFSK NLSFRFPVLG SPCHGKGFR- ---CLSGITR EEFSKSERCL 120
SoRPOT;2    FSISRSYSFL GGTHDCGFSD RLKFRPFELG -FCKNRSFSE VGFCREGGSL VKEGIGERPV
AtRPOT;3    SSSSSSSTSL SVHEKPISNS VH-FHGNLIE ------SFŠ- ----ENQDSS YAGTIKGASL
SoRPOT;3    SSNSFPSTLS LPSLTPKLGK TSFFQ----- ---------- ----PSPQSQ IILDSPEEEL
   T7       ---------- ---------- ---------- ---------- ----MNTINI AKNDFSDIEL
                       SoRPOT;2 2P,692
AtRPOT;2    SGTLAR---- ------GYTS VAEEEVLS-T DVEEEP---- EVDELLKEMK KEKKRESHRS 180
SoRPOT;2    SGCLGNRLNF NVVCPKGYAS VVEAEVDSST DLEDDVSVFD EIQELVEEMR KEEKRAKWRE
AtRPOT;3    IEELEN---- ------PVER NG-LSGRRRL FMQDPP---- WISALFLKGL SKMVDQTLKI
SoRPOT;3    AEKMDG---- ------HFRN SDKIKGSSRI FMQDPP---- WVNTLFMKGL VDSNTG-LRL
   T7       AAIPFN---- ---------- ---------- ---------- ---TLADHYG ERLAREQLAL

AtRPOT;2    WRKKQDŃ-QF GMGRTKFQNL WRRQVKIETE EWERAAAEYM ELLTDMCEQK LAPNLPYVKS 240
SoRPOT;2    SHQRQQKMVA GMPLYKYQKL RNRQIKLETE SWQQAANEYK ELLADMCKLK LAPNLPYVKS
AtRPOT;3    ERKDID---- ---KRKFDSL RRRQVKEETE AWERMVDEYR DLEKEMCEKN LAPNLPYVKH
SoRPOT;3    EFKEIE---- ---REKYNLL RRRQIKAETE AWESMVEEYR EFVREMRDKK LAPNLPQVKA
   T7       EHESYEMG-- ---EARFRKM FERQLKAGEV ADN------- ----AAAKPL ITTLLPKMIA

AtRPOT;2    ŠLLGWFEPLR GDAIAKDQEL Y-RLGKSKAT YAHYLDQLPA DKISVITMHK LMGHLMTG-- 300
SoRPOT;2    LFLGWFEPFR DSIIEDQELI Š-RQGKCRGA YGTYFDQLPA DMMAIITMHK LMGMLMTGSG
AtRPOT;3    MFLGWFQPLK DVIEREQKLQ KNKSKKVRAA YAPHIELLPA DKMAVIVMHK MMGLVMSGHE
SoRPOT;3    LFLGWFEPLK KAIEKEQKSQ Š-RSRKQKAI YGYHIDMLPA DKMAVIVMHK MMSLLMVGND
   T7       RINDWFEEVK AKRGKRPTAF ---------- --QFLQEIKP EAVAYITIKT TLACLTSA--
                       SoRPOT;3 786
```

Figure 19 : Peptides immunogènes utilisés dans la production des anticorps spécifiques des ARN polymérases RPOT ;2 et RPOT ;3 d'épinard et d'Arabidopsis

Alignement des régions N-terminales des séquences primaires des NEP. Les peptides anti-RPOT ;2 et anti-RPOT ;3 choisis sont surlignés respectivement en bleu et en rose.

	Propriétés des antisera	
Protéine cible	**Nom de l'antisérum**	**Peptides antigènes**
SoRPOT ;2	**692-2P (grand prélèvement ou saignée finale utilisés)**	**Peptide 23 GFC**
		Peptide 24 VVE
SoRPOT ;3	**786 (saignée finale ou antisérum purifié sur peptide)**	**Peptide LKD**

Tableau 10 : Antisera, produits chez le lapin, et dirigés contre les ARN polymérases SoRPOT ;2 et SoRPOT ;3

Afin de faciliter leur identification, les trois premiers acides aminés de chaque peptide antigène sont indiqués.

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

II.B. Spécificité et sensibilité des antisera dirigés contre SoRPOT ;2 et SoRPOT ;3

II.B.1 Détermination de la sensibilité des antisera

Les peptides utilisés lors de l'immunisation des lapins sont déposés sur membrane de nitrocellulose (technique du « dot blot », voir Matériels et Méthodes, partie V). Ces résultats ne sont pas montrés. Après immunodétection, ils sont reconnus spécifiquement par les deux antisera SoRPOT ;2 692-2P et SoRPOT ;3 786, avec un seuil de détection de 5 ng pour une dilution de 1/1000. Les sera pré-immuns ne produisent aucune réaction sur ces peptides. En outre, dans cette expérience, l'antisérum SoRPOT ;2 692-2P ne reconnaît qu'un seul peptide antigène (peptide 23-GFC). Les deux antisera ne reconnaissent pas de façon croisée les peptides appartenant à la protéine NEP non ciblée.

En fait, au vu de ces résultats, chaque antisérum ne détecte qu'un seul peptide antigène de la protéine cible uniquement. Nous allons maintenant déterminer si l'antisérum SoRPOT ;2 692-2P reconnaît la protéine recombinante.

II.B.2 Vérification de la spécificité des antisera sur les protéines cibles

II.B.2.1 *Immunodétection sur les protéines recombinantes produites chez E. coli*

Un fragment ADNc, codant environ le premier tiers de la protéine SoRPOT ;2, soit la région N-terminale comprenant les deux peptides antigènes, est cloné dans un vecteur d'expression procaryote : pBAD/ThioTopo. Ce clone doit générer un polypeptide d'environ 50 kDa après SDS-PAGE. Le profil de séparation des polypeptides, colorés au Rouge Ponceau sur la membrane de nitrocellulose après transfert (Figure 19A) ne montre aucune accumulation notable de la protéine (résultat identique avec un gel coloré au bleu de Coomassie, non montré ici). Le polypeptide est sans doute très faiblement accumulé.

L'expression de la protéine recombinante est dans un premier temps contrôlée avec des anticorps dressés contre une étiquette thioredoxine (environ 10 kDa) adjointe au polypeptide d'intérêt (37 kDa environ ; Figure19B). Ils réagissent spécifiquement, dans les extraits bactériens induits, avec un polypeptide de masse moléculaire attendue, voisine de 50 kDa. La protéine recombinante étant bien présente dans ces extraits, nous pouvons alors

vérifier si l'antisérum SoRPOT ;2 692-2P reconnaît bien sa protéine cible. Or nous observons sur la figure19C que le profil polypeptidique révélé par ce sérum se superpose à celui révélé par le sérum anti-thioredoxine (Figure19A), soit un polypeptide proche de 50 kDa, et un polypeptide de 37 kDa, probablement issu de la dégradation de la protéine recombinante.

Le sérum anti-SoRPOT ;2 révélant un polypeptide à environ 50 kDa, nous pouvons conclure que ces anticorps reconnaissent la protéine cible exprimée chez *E. coli*. Nous allons maintenant vérifier le profil de détection des antisera 692-2P et 786 sur des extraits totaux végétaux.

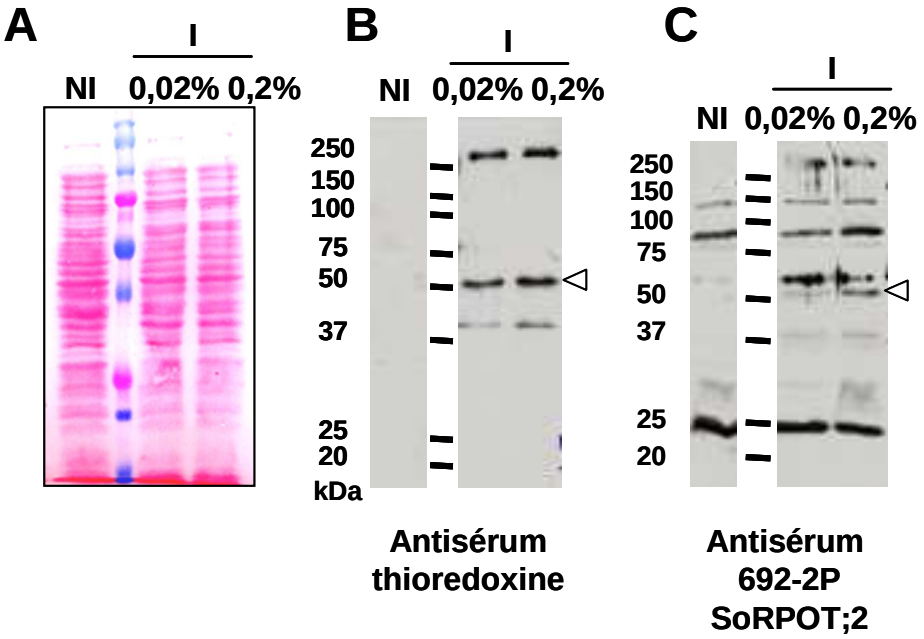


Figure 20 : Vérification de la spécificité de l'antisérum SoRPOT ;2 692-2P sur des extraits bactériens bruts exprimant un polypeptide N-terminal SoRPOT ;2.

A. Coloration au Rouge Ponceau d'extraits bactériens bruts (clone pBADThiotopo :SoRPOT ;2 N-ter) induits (I) et non induits (NI) transférés sur membrane de nitrocellulose après séparation par SDS-PAGE. Les marqueurs moléculaires de 75 et 25 kDa sont colorés en rose. B : Immunodétection réalisée avec les anticorps monoclonaux dirigés contre l'étiquette thioredoxine (Invitrogen), dilués au 1/5000. C : Immunodétection réalisée avec l'antisérum de lapin 692-2P dirigé contre des peptides de la protéine SoRPOT ;2 (grand prélèvement) dilué au 1/2000. Les bactéries sont induites pendant 4h à 37°C avec 0,02% ou 0,2% de L-arabinose (p/v).

II.B.2.2 *Immunodétection sur des extraits totaux de feuilles d'épinard*

Les immunodétections, obtenues sur des protéines totales de feuilles d'épinard après SDS-PAGE, avec les antisera SoRPOT ;2 692-2P, SoRPOT ;3 786 et avec les sera pré-immuns correspondants sont présentées dans la Figure 21.

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

Le prélèvement pré-immun 692-2P ne détecte aucun polypeptide parmi ces extraits totaux (Figure 21A). Le sérum pré-immun 786 (Figure 21B) révèle un seul polypeptide à environ 66 kDa, reconnu également par l'antisérum 786. Les deux antisera SoRPOT ;2 692-2P et SoRPOT ;3 786 reconnaissent un polypeptide de 100 à 130 kDa environ (Figure 21), correspondant à la masse moléculaire attendue des ARN polymérases de type phagique. Une immunodétection réalisée avec l'antisérum 786 purifié sur peptide (voir Matériels et Méthodes) confirme ces observations (résultat non montré).

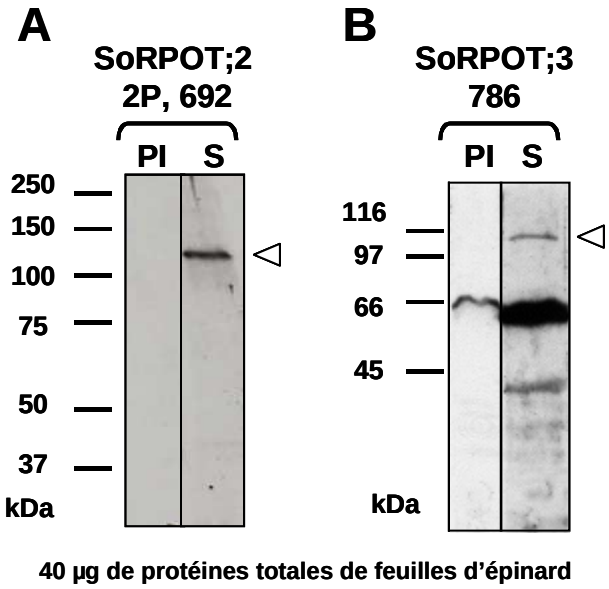


Figure 21 : Réactivité des sera pré-immuns et des antisera SoRPOT ;2 692-2P et SoRPOT ;3 786 sur des extraits totaux de feuilles d'épinard.

A : Immunodétection S : SoRPOT ;2 692-2P dilué au 1/1000 ; PI : sérum pré-immun correspondant. B : Immunodétection S : sérum SoRPOT ;3 786 dilué au 1/1000 ; PI : pré-imun correspondant. Les protéines totales (40 µg) de feuilles d'épinard sont séparées par SDS-PAGE puis transférées sur nitrocellulose

Par conséquent, les antisera SoRPOT ;2 692-2P et SoRPOT ;3 786 reconnaissent un polypeptides de masse moléculaire correspondant à celle des protéines cibles, exprimées chez des bactéries (SoRPOT ;2) et chez les végétaux.

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

CHAPITRE 3

Chapitre 3 : Etude de l'expression des gènes *AtNIP*

Nous allons étudier dans ce chapitre l'expression des gènes *NIP* chez Arabidopsis, en étudiant l'accumulation des transcrits et des protéines correspondantes. Les profils d'expression de gènes seront établis chez la plante au cours de son développement, ou bien en modulant les paramètres de croissance. Nous utiliserons des approches ciblées, par RT-PCR semi-quantitatives et immunodétections, ainsi que des études plus larges du transcriptome par analyse *in silico* de résultats de puces à ADN.

I. Expression des gènes *AtNIP* en fonction des organes

I.A. Accumulation des transcrits

La première approche que nous avons adoptée consiste à analyser l'accumulation dans différents organes des messagers *AtNIP*, à l'aide de sondes spécifiques (technique du « northern blot » ; Matériels et Méthodes). Les messagers *AtNIP* sont très faiblement accumulés, et cette technique ne s'est pas révélée suffisamment sensible. Nous avons alors opté pour la technique de RT-PCR permettant l'amplification de matrices très peu représentées. Cette technique a uniquement été appliquée à l'étude des transcrits *AtNIP1*, *AtNIP2* et *AtNIP3*, car le gène *AtNIP4* n'a été identifié que très récemment.

I.A.1 Analyse ciblée par RT-PCR semi quantitative

L'analyse des transcrits *AtNIP* chez la plante a été réalisée avec des expériences de RT-PCR semi-quantitative sur les ARN totaux extraits de divers organes d'Arabidopsis. La transcription inverse est effectuée à partir d'une seule amorce poly dT (poly dT_{18}), s'hybridant à la séquence poly A en 3' des ARNm nucléaires. L'efficacité de la réaction de transcription inverse s'affranchit donc de toute variation liée à l'hybridation d'amorces différentes, le taux d'ADNc est alors uniquement proportionnel à la quantité de messagers présents. En outre, l'analyse de l'expression de plusieurs gènes peut être réalisée à partir d'une même réaction, et donc d'une même source d'ADNc.

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

Les profils d'expression des gènes *NIP* chez divers organes d'*A. thaliana* (rosettes, feuilles, tige, siliques, racines et fleurs) sont rassemblés sous forme de deux séries de RT-PCR, dont les résultats sont présentés dans la Figure 22. L'accumulation des ADNc du gène *APT1* amplifiés (Adénine phosphoryl transférase), constitutif et ubiquitaire, est utilisée ici comme contrôle de charge (Cowling *et al.* 1998).

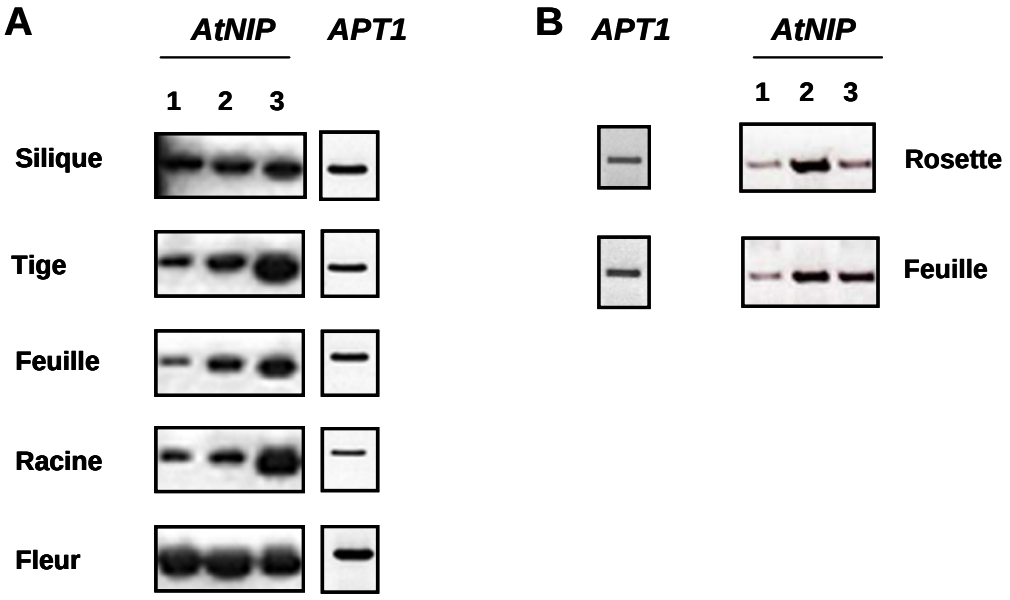


Figure 22 : Profil d'accumulation des transcrits AtNIP dans différents organes d'A. thaliana.

Les résultats sont obtenus à partir de deux expériences indépendantes, A et B. Les organes sont prélevés sur des plantes matures cultivées en terre. 2 µg d' ARN totaux extraits de siliques, de tiges, de feuilles caulines, de racines, de fleurs, et de rosettes entrant en sénescence sont amplifiés par RT-PCR (30 cycles ; amorces indiquées en annexe 2 « tableau des amorces »). Les amplicons sont séparés sur gel d'agarose 0,8 %. APT1 : Adénine Phosphoryl Transférase 1.

Les transcrits *AtNIP1*, *AtNIP2* et *AtNIP3* sont détectés dans tous les organes analysés (siliques, tiges, fleurs, feuilles caulines, racines et rosettes entrant en sénescence). Les trois messagers s'accumulent de façon importante dans un organe reproducteur, la fleur, et dans la silique. Les transcrits *AtNIP3* sont, en outre, plus abondants que *AtNIP1* et *AtNIP*2, en particulier dans les tiges et racines. Les ARNm *AtNIP2* se distinguent par une accumulation dans les feuilles caulines et les rosettes. Nous constatons également que les quantités de messagers *AtNIP1* sont, globalement, un peu plus faibles par rapport à celles des deux autres transcrits.

Au vu de ces résultats, nous concluons que les transcrits *AtNIP1* et *AtNIP2* analysés s'accumulent préférentiellement dans les fleurs. Par ailleurs, ces profils d'expression présentent quelques particularités. Ainsi, les transcrits *AtNIP3* sont les plus abondants dans tous les organes étudiés, et en particulier dans les racines et les tiges. Les ARNm *AtNIP2* sont

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

préférentiellement détectés dans les tissus verts, notamment dans les organes foliaires. Les transcrits *AtNIP1* sont présents en plus faible quantité, excepté dans les fleurs et siliques.

I.A.2 Etude large du transcriptome

L'équipe de Gruissem a effectué des études très larges du transcriptome nucléaire, dans différentes conditions. Nous disposons des données obtenues par analyse de populations d'ARNm d'Arabidopsis hybridés sur une puce à ADN, regroupant l'ensemble des gènes nucléaires (https://www.genevestigator.ethz.ch, (Zimmermann *et al.* 2004; Zimmermann *et al.* 2005). Ces données fournissent des profils d'expression d'un ou plusieurs gènes d'intérêt, dans un choix important de paramètres variables.

Les résultats de l'analyse transcriptomique présentée ici (Figure 22) proviennent de la puce « Gene Atlas ». Elle permet de savoir comment un gène est exprimé dans les tissus ou organes d'Arabidopsis. Chaque organe est décomposé en sous parties. Les données présentées sont multiples. Par exemple, les résultats disponibles sur l'organe « fleurs » ou « inflorescences » rassemblent les données de puces hybridées avec les ARN de l'organe entier et les données de puces hybridées avec des ARN extraits de chacune de ses sous parties : étamines, sépales, pétales, carpelles et pédicelles. En revanche, chaque sous-partie ne contient que les données de puces qui lui sont propres, obtenues uniquement avec les ARN de ces sous parties.

Les données récoltées pour les gènes *AtNIP1*, *AtNIP2*, *AtNIP3* et *AtNIP4* sont regroupées sur la figure 22 (A à E). Les profils d'accumulation des transcrits *NIP* dans les divers organes de la plante *A. thaliana*, montrent que ces gènes sont faiblement exprimés dans toute la plante, si on compare aux valeurs obtenues avec un gène nucléaire fortement exprimé (voir *RBCS* en annexe 3). Chaque valeur définie provient d'au moins trois réplicats.

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

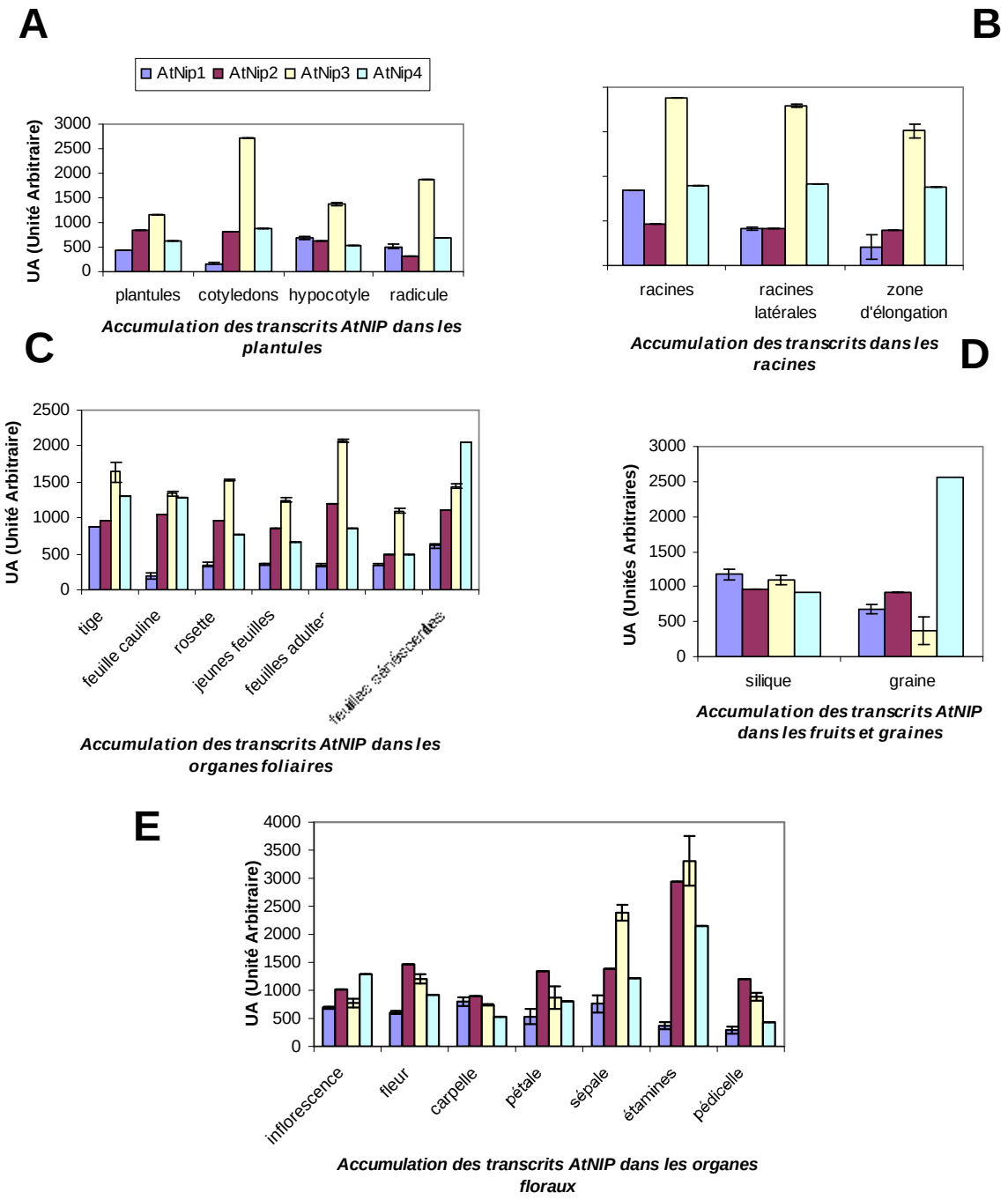


Figure 22 : Profils d'accumulation des transcrits AtNIP dans les différents organes d'Arabidopsis thaliana établis avec des puces à ADN

Les résultats sont obtenus sur les puces à ADN Genevestigator, dans la catégorie Gene Atlas (https://www.genevestigator.ethz.ch). Les données fournies correspondant à au moins trois réplicats effectués pour chaque tissu A : plantules; B : racines ; C : feuilles ; D : fruits et graines ; E : organes floraux.

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

L'allure générale des profils montre que les transcrits de la famille d'ARNm *AtNIP* s'accumulent préférentiellement dans les organes reproducteurs, en particulier dans les étamines. Les niveaux d'accumulation des messagers *NIP* diffèrent en fonction de l'organe et du développement de la plante. En effet, les messagers *AtNIP3* et *AtNIP4* sont plus abondants que les transcrits *AtNIP1* et *AtNIP2*. Leurs profils d'accumulation présentent en outre plus de variabilité. Hormis les organes reproducteurs, l'ARNm *AtNIP3* est plus abondant dans les organes apparaissant dans des stades précoces du développement (cotylédons et radicule), ainsi que dans les feuilles matures et dans tous les extraits racinaires. L'accumulation des transcrits *AtNIP4* se différencie nettement des autres dans les graines et feuilles sénescentes, soit au début et à la fin du cycle de vie de la plante. Le gène *AtNIP*1 est faiblement exprimé, mais le messager est présent dans tous les organes de la plante. Les transcrits *AtNIP2* sont globalement plus abondants que les ARNm *AtNIP1*, en particulier dans les feuilles.

Par conséquent, les observations sont en accord avec les résultats de nos expériences menées par une approche de RT-PCR semi quantitative. Nous constatons une accumulation préférentielle des transcrits de cette famille dans les fleurs, et les hybridations sur puces permettent de préciser dans les étamines en particulier. En outre, des transcrits *AtNIP3* et *AtNIP4* sont les plus abondants. Les messagers *AtNIP3* s'accumulent préferentiellement dans les racines, et les ARNm *AtNIP4* dans les graines et les feuilles sénescentes. Les résultats issus de l'analyse transcriptomique sur « Gene Atlas » montrent que les deux autres transcrits *AtNIP1* et *AtNIP2*, s'accumulent moins, mais tous les messagers *AtNIP* sont retrouvés de façon ubiquitaire. Le profil d'accumulation des ARNm *AtNIP2* est plutôt spécifique des feuilles.

Cependant, l'accumulation des transcrits ne reflète pas toujours le profil d'expression des protéines. Nous allons donc maintenant nous focaliser sur l'accumulation des protéines NIP chez Arabidopsis.

I.B. Expression tissulaire des protéines AtNIP

Les protéines totales sont extraites de différents tissus d'Arabidopsis et séparées par SDS-PAGE (Figure 23). Après coloration au bleu de Coomassie (Figure 23A), nous constatons, comme attendu, que les profils polypeptidiques varient considérablement en fonction de l'exposition du tissu à la lumière. En effet, ils sont très différents entre les organes aériens (fleurs, feuilles, siliques et tiges) et les organes ou plantules (racines et plantules étiolées) développées à l'obscurité.

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

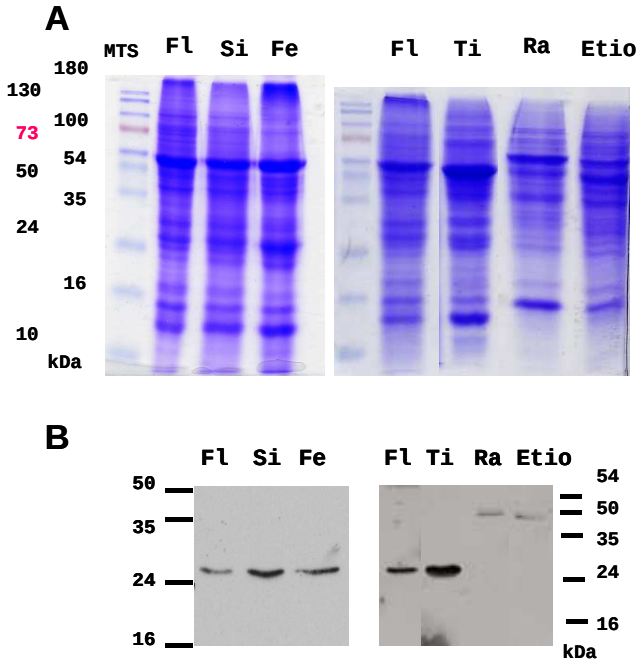


Figure 23: Expression des protéines NIP reconnues par l'antisérum SE582 dans divers organes de la plante d'A. thaliana

A : Coloration au bleu de Coomassie de 30 µg protéines totales de divers organes d'A. thaliana (Fl : fleurs ; Si :siliques ; Fe : feuilles ; Ti :tiges ; Ra : racines ; Etio : plantules étiolées âgées de 3 semaines) séparées par SDS-PAGE. B : Immunodétection réalisée avec l'antisérum AtNIP1 SE582, (dilution 1/3000). Ces observations sont issues de deux expériences différentes, le dépôt « fleurs » est répété comme contrôle

Un polypeptide de masse moléculaire attendue pour les protéines AtNIP, soit proche de 25 kDa, est détecté par l'antisérum AtNIP1 et/ou AtNIP2 SE582, uniquement dans les organes exposés à la lumière (Figure 23B) : feuilles, fleurs, siliques et tiges. Ce polypeptide n'est pas détecté dans les racines et plantules étiolées, ce qui suggère une régulation post-transcriptionnelle des transcrits *AtNIP1* et/ou *AtNIP2*.

Après cette étude de l'expression des gènes *AtNIP* chez *A. thaliana*, nous allons observer comment les transcrits *NIP* et protéines correspondantes se mettent en place au cours du développement de la plante.

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

II. Expression des gènes *AtNIP* au cours du développement de la plante

II.A. Accumulation des transcrits

II.A.1 Analyse grâce à une étude large du transcriptome

Les résultats de puces à ADN « Gene Chronologer », disponibles sur « Genevestigator » (https://www.genevestigator.ethz.ch), fournissent également une vue d'ensemble des transcriptomes analysés au cours du développement de la plante. « Gene Chronologer » permet de déterminer si un gène d'intérêt est préférentiellement exprimé à des stades particuliers de la croissance d'Arabidopsis.

Les analyses ont été effectuées avec des ARN extraits à partir de l'organisme entier pour chaque stade de développement étudié. Le cycle de vie de la plante a été divisé en dix stades allant de la germination de la graine jusqu'à la sénescence de la plante. Les profils d'accumulation des gènes *NIP* au cours du développement de la plante sont représentés sur la figure 24.

Nous pouvons remarquer tout d'abord que les transcrits *AtNIP3* et *AtNIP4* sont globalement plus abondants. Leurs profils d'expression au cours du développement de la plante sont complémentaires. Alors que les transcrits *AtNIP3* s'accumulent plutôt au cours de la croissance et chez la plante mature, les messagers *AtNIP4* sont majoritairement détectés durant les premiers stades de développement et à la fin du cycle de vie d'Arabidopsis. Le pic de détection des transcrits *AtNIP2* et *AtNIP3* apparaît lorsque les organes reproducteurs se forment (stade d'apparition des boutons floraux, Figure 24). Les messagers *AtNIP2* sont également abondants dans la très jeune plantule. L'accumulation des ARNm *AtNIP1* varie peu, elle tend à augmenter légèrement après la fécondation, lorsque les plantes portent des siliques.

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

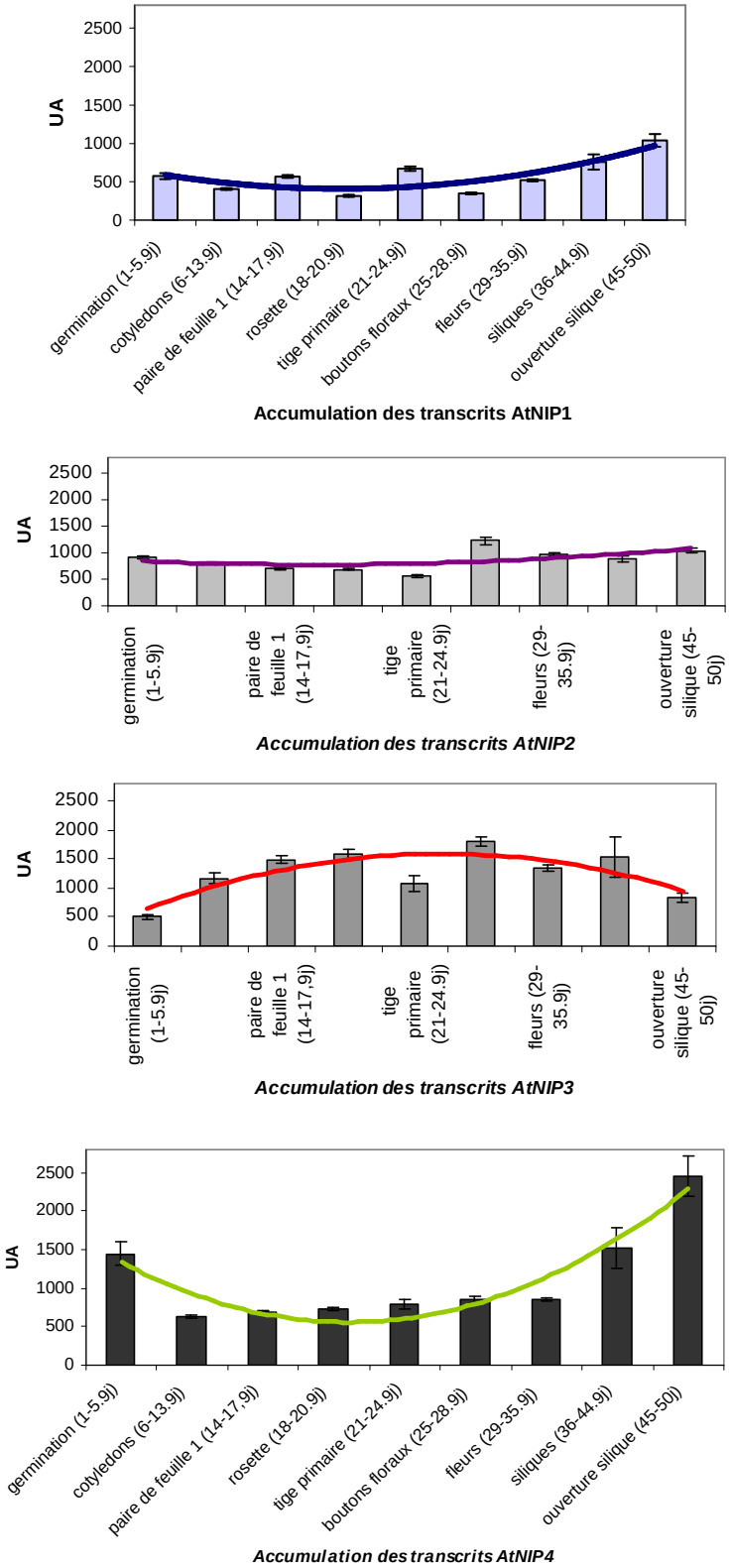


Figure 24 : Accumulation des transcrits AtNIP au cours du développement de la plante, établis par puce à ADN

Ces résultats sont issus des puces annotées sur « gene Chronologer » (Genevestigator) (courbe AtNIP1 bleue, courbe AtNIP2 violette, courbe AtNIP3 rouge et courbe AtNIP4 en vert). UA : Unité Arbitraire ; j : jours. Les analyses ont été effectuées avec des ARNm extraits à partir des plantes entières. Les mentions portées en abscisses indiquent le stade de développement de la lante symbolisé par l'apparition d'un organe donné.

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

Ces observations confirment ce qui a été observé dans la partie précédente (Figures 22 et 23). Il semble par conséquent que les transcrits *AtNIP* présentent des profils d'accumulation relativement différents. Les messagers *AtNIP1* sont les moins abondants, leur profil d'accumulation varie peu au cours du développement de la plante. Les transcrits *AtNIP2* sont majoritaires dans les très jeunes plantules. Les messagers *AtNIP3* et *AtNIP4* sont globalement les plus abondants. Ils sont également caractérisés par des profils d'accumulation complémentaires.

II.B. Expression des protéines AtNIP au cours de la formation de la jeune plantule

Les polypeptides sont extraits de graines sèches, graines imbibées et plantules entières après 0 à 8 jours de croissance. Le premier jour, la radicule émerge de la graine. Le jour suivant, la radicule sort davantage, et on devine parfois une partie des cotylédons. Au stade J3, les cotylédons sont complètement formés et fonctionnels.

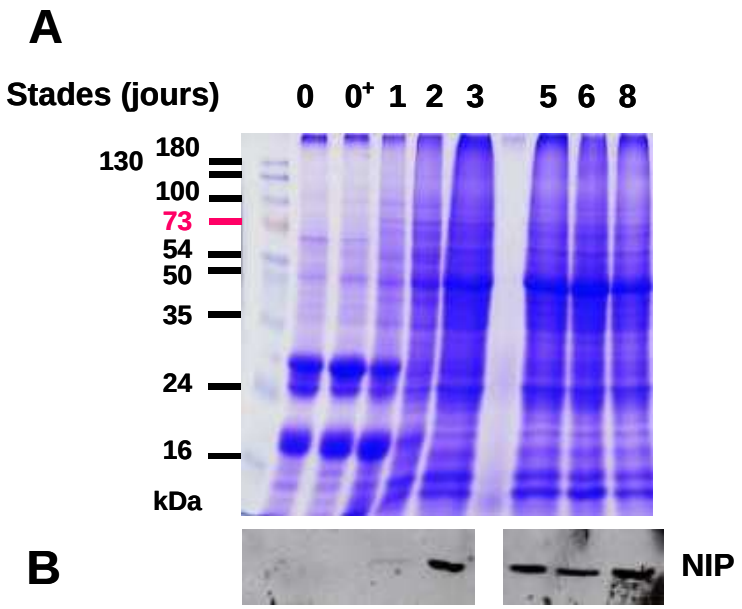


Figure 25: Biosynthèse des protéines AtNIP au cours des stades précoces du développement de la plantule

A : Coloration au bleu de Coomassie de protéines totales (30 µg) de graines et plantules à divers stades, après séparation par SDS-PAGE. Les jours sont décomptés dès la mise en chambre de culture avec stade 0 : stade graine sèche ; stade O^+ : stade graine imbibée. B : Immunodétection obtenue avec le sérum anti-AtNIP1 SE582 (dilution 1/3000). Afin de synchroniser au mieux la germination, les graines sont imbibées et vernalisées pendant 72h à 4°C et à l'obscurité sur boîte, puis incubées en chambre de culture (cycle 16h jour/ 8h nuit à 24°C). Les prélèvements sont effectués à la même heure.

Nous pouvons remarquer, sur la figure 25A, une modification drastique du profil polypeptidique total après 1 jour de culture. En effet, les échantillons prélevés aux stades 0, 0^+

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

et, 1 jour, contiennent majoritairement des protéines de maturation de la graine, dont les protéines LEA (Late Embryogenesis Abundant proteins ; Wise & Tunnacliffe 2004) comprises entre 35 et 16 kDa (Figure 25A). L'exposition de la plantule à la lumière se traduit dans le profil polypeptidique dès J2 par l'apparition des protéines impliquées directement ou indirectement dans la photosynthèse (protéines D1 et D2 du photosystème II, Rubisco). Ces protéines deviennent très abondantes dès le troisième jour alors que les cotylédons se développent.

Les protéines AtNIP ne sont détectables qu'à partir du deuxième jour de culture, au moment où les cotylédons sortent de la graine et sont exposés à la lumière. Ces résultats suggèrent que la synthèse des protéines AtNIP est liée à la lumière. Nous allons donc approfondir ce point dans la partie suivante. en étudiant l'accumulation des transcrits *AtNIP* des protéines en faisant varier les conditions lumineuses au cours de la croissance de la plante.

III. Expression des gènes *AtNIP* en fonction des conditions d'éclairement

Nous allons étudier l'influence de la lumière sur le profil d'expression des gènes *AtNIP* au cours du développement de la jeune plantule. Une analyse des transcrits par RT-PCR semi-quantiative fournira les premières indications, affinées par la suite par l'analyse effectuée sur puce (« Response viewer », Genevestigator).

III.A. Analyse de l'accumulation des transcrits *AtNIP* selon les conditions d'éclairement

III.A.1 Analyse de l'accumulation des messagers par RT-PCR semi-quantitatives.

Les profils d'accumulation des transcrits *AtNIP1*, *AtNIP2* et *AtNIP3* sont analysés par RT-PCR semi-quantitative, chez des plantules âgées de 7 jours ou 3 semaines, développées à l'obscurité ou à la lumière après normalisation (Figure 26). Nous remarquons que les messagers semblent plus abondants dans les plantules âgées de 3 semaines que dans les plantules de 7 jours. Les messagers sont alors plus exprimés ou plus stables dans les stades tardifs du développement.

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

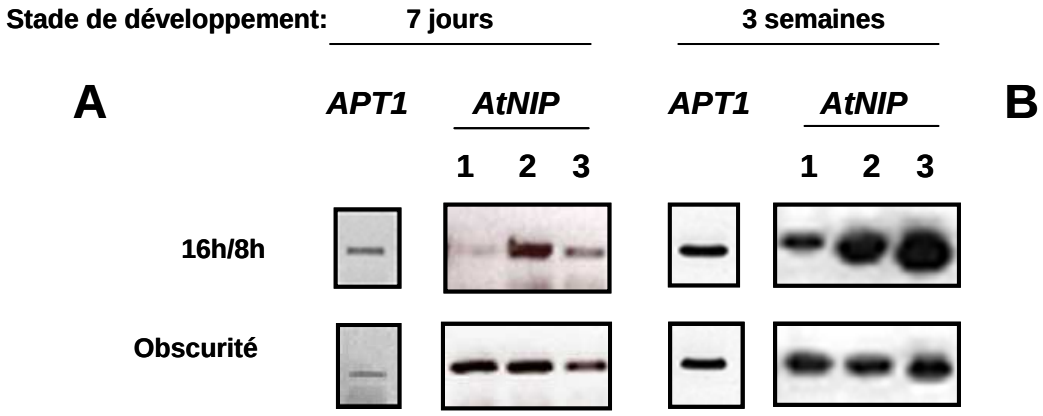


Figure 26 : Accumulation des transcrits AtNIP chez Arabidopsis selon les conditions d'éclairement

Les résultats sont obtenus à partir de deux expériences indépendantes. Les plantules sont cultivées in vitro pendant 7 jours ou 3 semaines sur du milieu supplémenté en sucre 1% (p/v). Les RT-PCR (30 cycles) sont réalisées sur 2 µg d'ARN totaux extraits à partir de plantules entières. APT1 : Adénine Phosphoryl Transférase ; utilisé comme contrôle de charge.

Nous constatons que les messagers *AtNIP2* sont majoritaires dans les plantules photosynthétiques développées avec une photopériode de 16h lumière/ 8h obscurité pendant 7 jours. Après trois semaines de croissance, les transcrits *AtNIP3* sont les plus abondants. En revanche, le profil d'accumulation des transcrits *AtNIP* varie peu au sein de cette famille. L'expression des gènes *AtNIP* est plutôt constitutive chez des jeunes plantules et des plantes de trois semaines se développant à l'obscurité.

III.A.2 Analyse des profils d'accumulation des ARNm *AtNIP* en fonction des spectres lumineux

Les résultats de puces à ADN «response Viewer » fournissent les premières indications sur les variations éventuelles du profil d'accumulation d'un transcrit selon de différents paramètres. Ils permettent d'approcher *in silico* le rôle de la protéine en étudiant les variations de son expression. Nous nous sommes focalisés sur les analyses effectuées avec à partir de plantules développées dans diverses conditions lumineuses (faible intensité, lumière bleue, spectre rouge lointain, lumière rouge, blanche, et UV-A, UV-AB). Les résultats fournis correspondent aux valeurs obtenues à partir de plantes éclairées pendant leur croissance rapportées à des plantes développées à l'obscurité (Tableau 12).

Les variations des taux d'ARNm observées sur ces puces reflètent une modification de l'expression génique, au niveau transcriptionnel, et/ou au niveau post-transcriptionnel, en

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

jouant notamment sur la stabilité des transcrits. Par conséquent, nous sommes, dans cette étude, dans l'incapacité de discerner l'influence de chacun de ces deux niveaux de régulations sur les résultats observés. De plus, toutes les modifications peuvent résulter d'un effet indirect.

TRAITEMENTS	AtNip1	AtNip2	AtNip3	Réplicats
lumière, intensité : faible	0,67	0,91	0,98	6
lumière, spectre : bleu	0,67	0,99	1,05	6
lumière, spectre : rouge lointain	0,63	1,16	0,98	6
lumière, spectre : rouge	0,63	1	0,96	6
lumière, spectre : UV-A	0,77	1,06	0,96	6
lumière, spectre: UV-AB	0,65	0,91	1,37	6
lumière, spectre : blanc	0,7	0,93	0,98	6

Tableau 12: Accumulation des transcrits AtNIP dans des plantules d'A. thaliana cultivées dans diverses conditions d'éclairement.

Les valeurs présentées correspondent aux rapports des valeurs obtenues à partir de plantules développées en présence de divers spectres de lumière sur celles obtenues à partir de plantules développées à l'obscurité. Les rapports inférieurs ou égaux à 0,7 sont surlignés en vert, et les rapports supérieurs à 1,3 en jaune. UV-A et UV-AB : Ultraviolets A et Ultraviolets AB.

Nous remarquons une diminution significative de la quantité de messagers *AtNIP1* lorsque Arabidopsis se développe en présence de lumière. Cette observation est indépendante du spectre utilisé. Nous pouvons donc penser que, soit les transcrits *AtNIP1* sont plus stables à l'obscurité, soit le gène correspondant est plus exprimé en l'absence de lumière. Cet effet de la lumière est spécifique des ARNm *AtNIP1*, puisque l'accumulation des autres messagers de la famille ne montre pas de variations aussi homogènes. En effet, nous constatons que l'accumulation de transcrits *AtNIP2* et *AtNIP3* semble être peu modulée. En fait, la quantité d'ARNm *AtNIP3* augmente uniquement (x1.37) lors d'une exposition aux UV-AB.

Nous pouvons donc conclure que les taux de transcrits *AtNIP1* sont les plus sensibles aux conditions d'éclairement appliquées au cours de la croissance d'Arabidopsis. L'accumulation des messagers *AtNIP1* est diminuée lorsque le développement de la plante s'effectue en présence de lumière. Ces variations peuvent bien sûr résulter d'effets indirects.

Nous allons maintenant vérifier si les conditions d'éclairement peuvent également influencer la synthèse des protéines NIP.

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

III.B. Accumulation des protéines AtNIP en fonction des conditions lumineuses

Des plantules d'Arabidopsis sont mises en culture dans différentes conditions d'éclairement : obscurité, cycle 16h lumière / 8h obscurité ou combinaison de ces deux conditions, pendant 7 jours ou 15 jours. Les polypeptides extraits à partir des plantules entières sont séparés par SDS-PAGE, puis soit colorés au bleu de Coomassie, soit transférés sur membrane de nitrocellulose (Figure 27). Le sérum SE582 est utilisé pour réaliser une immunodétection. Un polypeptide de masse moléculaire voisine de 25 kDa correspondant à NIP est détecté dans les plantules après 7 jours (Figure 27A) et 15 jours (figure 27B) de croissance en présence de lumière. Ce polypeptide n'est pas détecté dans les plantules étiolées, mais le retour de la lumière s'accompagne de l'induction de la synthèse du polypeptide AtNIP. Il faut cependant noter que ce polypeptide semble être très stable, puisqu'après 72 h à l'obscurité, le polypeptide est toujours détecté.

Il semblerait donc que la synthèse ou la stabilité des polypeptides NIP reconnus par le sérum SE582 soit régulée par la lumière confirmant ainsi les observations faites sur l'étude de l'accumulation des protéines dans les organes de la plante (Figure 23). Nous ne pouvons conclure dans cette expérience quant au rôle direct ou indirect de la lumière dans l'expression des protéines AtNIP.

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

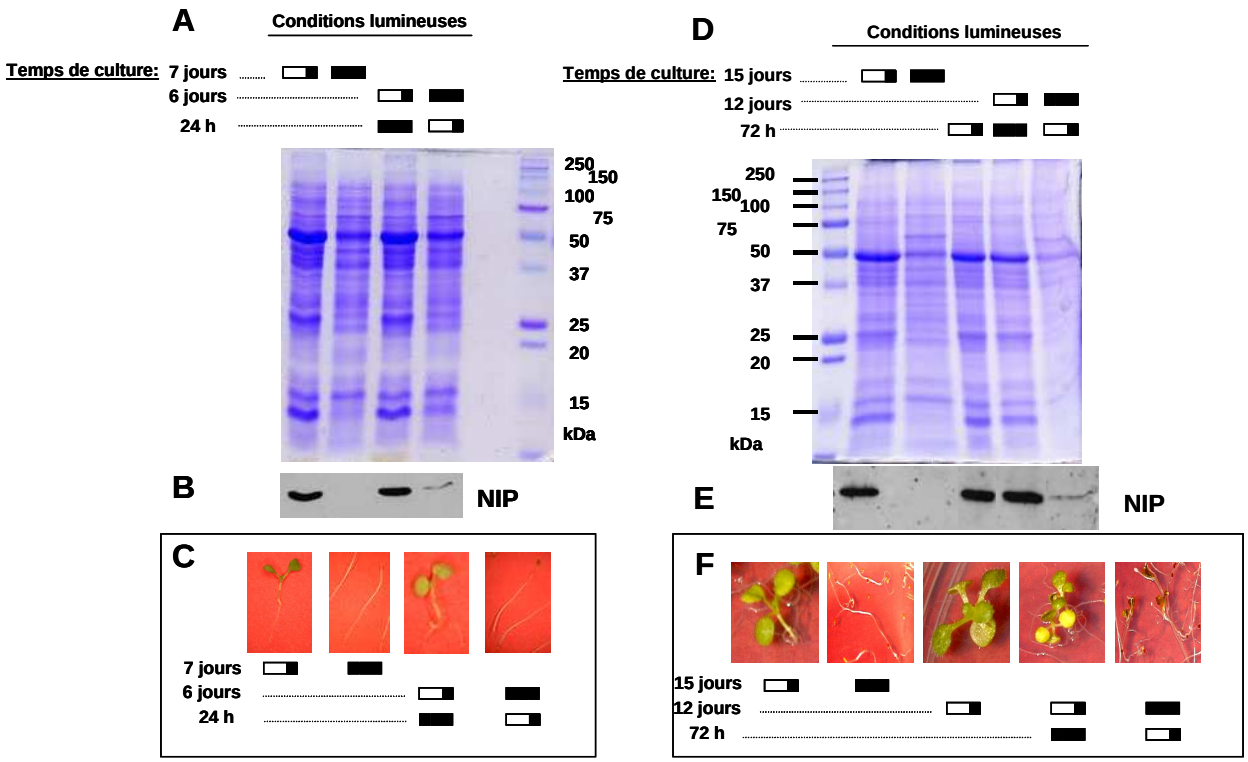


Figure 27 : Profil d'accumulation des protéines AtNIP dans des plantules cultivées avec des conditions d'éclairement variables

A et D : Profils de séparation par SDS-PAGE des polypeptides, extraits à partir de plantules entières, colorés au bleu de Coomassie ; B et E : Immunoblot obtenu avec le sérum anti-AtNIP1 SE582 ; C et E : Photos des plantules correspondantes. Des plantules sont développées in vitro sur milieu supplémenté en sucre 1% (p/v) pendant 7 jours (A,B,C) et 15 jours (D,E,F). Les photopériodes appliquées sont schématisées ,■□ : Croissance en cycle jours long (16h lumière/8h obscurité) ; ■■ croissance à l'obscurité.

En conclusion, bien que les messagers *AtNIP* soient présents dans tous les organes analysés et au cours du développement d'Arabidopsis, leurs profils d'accumulation comportent quelques spécificités. Les résultats obtenus par RT-PCR semi-quantitative et par une approche génomique sur puces (« gene atlas » et « gene chronologer ») montrent que les messagers *AtNIP3* et *AtNIP4* sont les plus abondants. Leurs profils d'accumulation sont les plus variables au sein de cette famille. Ils sont en entre outre complémentaires au cours du développement de la plante. Les ARNm *AtNIP3* sont majoritairement détectés dans les racines, fleurs (étamines et sépales en particulier), et dans les organes foliaires. Les transcrits *AtNIP4* s'accumulent préférentiellement dans les graines et les siliques.

Ces deux approches révèlent aussi que les messagers *AtNIP1* sont les moins abondants. Ils s'accumulent essentiellement dans les stades tardifs du développement, après fécondation. (« gene chronologer »), ainsi que dans les siliques et graines. Les analyses plus ciblées (RT-PCR semi-quantitatives) suggèrent en outre une accumulation dans les fleurs.

De plus, les études réalisées avec différentes conditions d'éclairement ont mis en évidence une baisse de l'expression du gène *AtNIP1* ou de la stabilité des transcrits

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

correspondant. Le taux de messagers AtNIP1 est nettement diminué lorsque la plante se développe à la lumière.

Les transcrits *AtNIP2* sont les plus exprimés chez la très jeune plantule (moins de 7 jours). Ils s'accumulent principalement dans les feuilles et fleurs, et en particulier, dans les étamines. Ils sont en revanche peu détectés dans les racines.

Cette étude a été élargie à l'analyse de l'accumulation des protéines NIP reconnues par le sérum SE582. Les protéines NIP sont détectées préférentiellement dès que la plante est exposée à la lumière. Nous les retrouvons dans les organes aériens (rosette, feuilles caulines, tiges, fleurs et siliques), et à partir du deuxième jour de croissance, soit dès que les cotylédons émergent de la graine. L'expression des protéines NIP est induite lors d'une exposition de plantules étiolées à la lumière. L'expression de cette famille de gènes *AtNIP* semble donc être modulée par la lumière, au niveau de l'accumulation des ARNm et des protéines.

Nous allons dans le chapitre suivant tenter d'approcher davantage le rôle des ces protéines en vérifiant en particulier leur interaction avec l'ARN polymérase SoRPOT ;2 *in vivo*.

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

CHAPITRE 4

Chapitre 4 : Etude fonctionnelle des protéines NIP

Les protéines NIP ont été identifiées par test double hybride en utilisant comme appât l'ARN polymérase SoRPOT ;2. Nous avons vu dans le chapitre 1 que les protéines AtNIP1 et AtNIP2 pourraient comporter une séquence d'import vers un organite. En outre, cette famille présente un domaine d'interaction protéine-protéine de type RING Finger. Ces deux informations nous conduisent tout d'abord à contrôler si les protéines NIP sont effectivement retrouvées dans les organites. Puis, nous consacrerons une partie de cette étude à vérifier l'interaction des protéines NIP et NEP par une approche différente, en utilisant les anticorps caractérisés au chapitre 2. Ces expériences biochimiques nous permettent d'établir un modèle structural et de présenter l'organisation des protéines étudiées. Nous finirons en présentant la production et les prémisses d'analyse des mutants affectés dans l'expression des gènes *AtNIP* afin de comprendre le rôle des protéines correspondantes.

I. Localisation subcellulaire des protéines NIP et NEP chez *A. thaliana* et chez épinard

Les protéines NIP ont été mises en évidence par leur interaction *in vitro* avec l'ARN polymérase organellaire SoRPOT ;2. Cette interaction est doublement hétérologue, puisque nous avons utilisé une polymérase d'épinard pour isoler des ADNc codant des protéines d'Arabidopsis dans la levure. Pour cette raison il est nécessaire de vérifier l'interaction NIP/NEP par une autre approche. De plus, il s'agit d'une expérience *in vitro* qu'il est nécessaire de vérifier. Un premier point à déterminer dans cette perspective, consiste à définir la localisation subcellulaire de cette nouvelle famille de protéines, chez Arabidopsis et chez l'épinard.

I.A. Approche par transformation transitoire *in planta*

Une approche souvent utilisée pour déterminer la localisation subcellulaire d'une nouvelle famille de protéines, est une approche *in planta*. La méthode utilisée repose sur une manipulation du système de parasitage génétique offert par *Agrobacterium tumefaciens*. Cette bactérie du sol est capable de transférer et d'insérer aléatoirement un fragment d'ADN linéarisé, l'ADN-T (ADN de Transfert) dans le génome nucléaire de la plante infectée. Ces propriétés sont détournées afin d'exprimer dans une cellule végétale cible, des constructions chimériques, fusionnant des séquences codant pour une protéine d'intérêt à un gène

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

rapporteur. Ce dernier, s'il est exprimé, permet d'observer la répartition de la protéine hybride dans la cellule transformée. Le rapporteur utilisé ici est la protéine fluorescente eYFP (« enhanced Yellow Fluorescent Protein », version 4, CLONETECH).

I.A.1 Constructions des vecteurs binaires recombinants

Le site de coupure d'une séquence d'import ne pouvant être prédit de façon certaine par un logiciel, nous avons préféré produire plusieurs constructions *AtNIP* respectant l'organisation structurale des protéines. Afin de tester le potentiel d'adressage des régions N-terminales des protéines NIP, des constructions tronquées des ADNc *NIP*, ainsi que l'ADNc entier, ont éte fusionnées au gène *eYFP*. Finalement, elles sont introduites dans le vecteur binaire EL103 au niveau des sites des restriction 5'BamHI / 3'XbaI, situés en amont de l'ADNc *eYFP* cloné en 5'XbaI / 3'SstI, afin de générer une fusion traductionnelle au niveau du messager hybride (annexes 5).

Pour cela, les différents fragments *AtNIP* sont amplifiées par PCR à partir des vecteurs pBluescript (annexes 5), contenant les ADNc entiers correspondants. Les oligonucléotides utilisés comprennent un site de restriction adapté à leur extrémité 5' (séquences : voir annexe 2). Ils sont, tout d'abord, introduits et amplifiés dans le vecteur pBluescript. Les séquences clonées sont contrôlées par séquençage automatique à partir des amorces universelles sur les promoteurs T7 et T3 du plasmide, avant l'insertion finale dans EL103. La fusion est également vérifiée par séquençage en utilisant des amorces 5' pour les fragments *NIP* partiels (constructions A, B et C, Figure 28) ou une amorce interne pour les ADNc *NIP* entiers (construction D, Figure 28). Les différentes étapes de clonage sont réalisées chez *E. coli* avant d'introduire les plasmides binaires recombinants dans *Agrobacterium tumefaciens*.

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

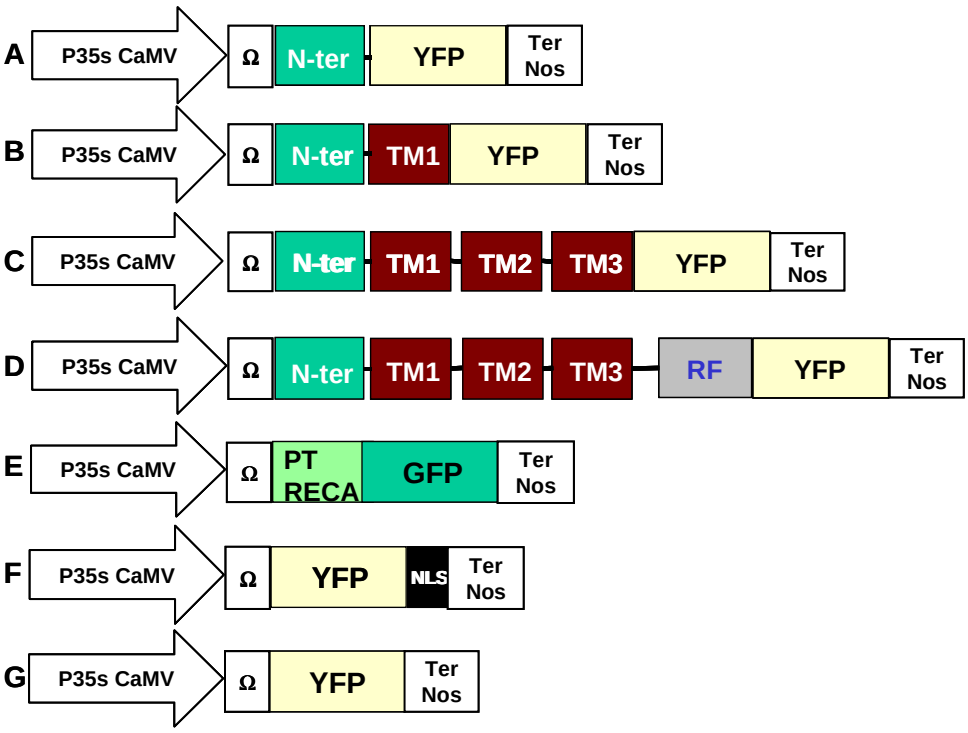


Figure 28 : Cartes des constructions hybrides AtNIP ::eYFP produites

A à D : cartes des fragments ADN-T comportant un ADNc AtNIP1, AtNIP2 et AtNIP3. E, F et G : cartes des ADN-T contrôles de l'efficacité de transfection et comme profils de localisation subcellulaire témoin (fournies par Dominique Pontier). P35S : promoteur 35s CaMV (Cauliflower Mosaic Virus) ; Ter Nos : terminateur Nopaline Synthase. En vert : région correspondant à l'extrémité N-terminale; en marron : TM1, TM2 et TM3, hélices transmembranaires 1, 2 et 3 ; en bleu : région RING finger ; PT RECA : peptide de transit de la protéine RECA ; NLS : séquence de localisation nucléaire.

Un premier jeu de constructions testées (Figure 28A) correspond à une courte région 5' des ADNc codant pour un peptide de transit putatif situé juste en amont de la première hélice transmembranaire (Figure 13). Des fragments plus longs comprenant également la première hélice transmembranaire prédite par le logiciel Tmpred sont également produits et fusionnés au gène rapporteur (Figure 28). Un dernier lot de constructions partielles inclut la séquence codant l'intégralité des domaines transmembranaires (Figure 28C). Les ADNc *NIP* complets sont également introduits dans le vecteur EL103 en amont de *eYFP* (Figure 28D).

Nous disposons de trois constructions contrôles dans le vecteur binaire EL103 (Figure 28, E, F et G), bien caractérisées et fournies par Dominique Pontier (Matériel et Méthodes), exploitant des régions ou motifs connus, nous permettant d'établir des profil témoins en microscopie à fluorescence ainsi que de tester l'efficacité de la transformation. Ainsi, la construction E permet d'importer la GFP dans les chloroplastes (Figures 28E et 28A) ; les noyaux sont observés en flanquant une séquence de localisation nucléaire à l'extrémité C-terminale (NLS) du rapporteur eYFP (Figures 28F et 28B) ; la protéine eYFP seule se répartit dans le cytosol et le noyau (Figures 28G et 28C).

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

I.A.2 Détection des protéines hybrides AtNIP::eYFP *in planta*

Les figures 29 et 30 présentent les images confocales observées au microscope à fluorescence, de feuilles de tabac transformées et exprimant ces constructions témoins. Les jeunes feuilles de tabac (cultivar Samsun NN) sont transformées par agroinfiltration (Matériels et Méthodes) et les zones infiltrées observées au microscope à fluorescence 48h plus tard. Les bactéries entrent grâce aux stomates de l'épiderme inférieure, par conséquent, ce sont principalement les cellules épidermiques qui sont transformées par cette méthode. Elles sont identifiées par une forme caractéristique en « puzzle », observée sur la figure 29C.

Ces observations, répétées à chaque nouvel essai de transformation en parallèles des clones hybrides *AtNIP*, montrent de façon reproductible les images attendues (chloroplastes sur figure 29A ; le noyau sur la figure 29B ; et le cytosol et noyau en 29C). La technique de transformation transitoire est donc validée. En revanche il ne nous a pas été possible d'observer une accumulation significative d'un signal dans un compartiment précis en utilisant les constructions *AtNIP ::eYFP* présentées sur la figure 30.

Les images confocales présentées dans la figure 30 représentent les résultats obtenus en utilisant les constructions A et C (Figure 28) respectivement pour AtNip2 et AtNip3. La fluorescence de la GFP co-localise avec l'autofluorescence de la chlorophylle (Figure 30A). Cependant, le signal émis est faible par rapport à ce qui est habituellement obtenu lors de transformations transitoires. La construction C AtNip3, comprenant les trois hélices transmembranaires, présente un profil indéterminé (Figure 30B) dans une cellule comportant peu ou pas de chloroplastes (Figure 30B, volet (b)). Nous ne pensons pas qu'il s'agisse de mitochondries car la surface est finement délimitée et nous n'observons aucun filament.

Nous avons finalement décidé de revenir à un système homologue pour tenter de déterminer la localisation subcellulaire des protéines NIP. Des transformations transitoires ont été effectuées sur de très jeunes plantules d'Arabidopsis (voir Matériels et Méthodes), cultivées en milieu liquide pendant 48h. Les plantules sont mises en présence d'un petit volume de suspension d'agrobactéries pendant 30 à 48h sur une unité de filtration, en chambre de culture. Elles sont alors observées au microscope à fluorescence. Des constructions témoins identiques à celles utilisées plus haut sont testées en parallèle. Cette technique présente un taux de transformation élevé puisque entre 80 et 90% des cellules émettent un signal fluorescent avec les constructions témoins. Cependant, il ne nous a pas été possible d'obtenir de résultats concluants.

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

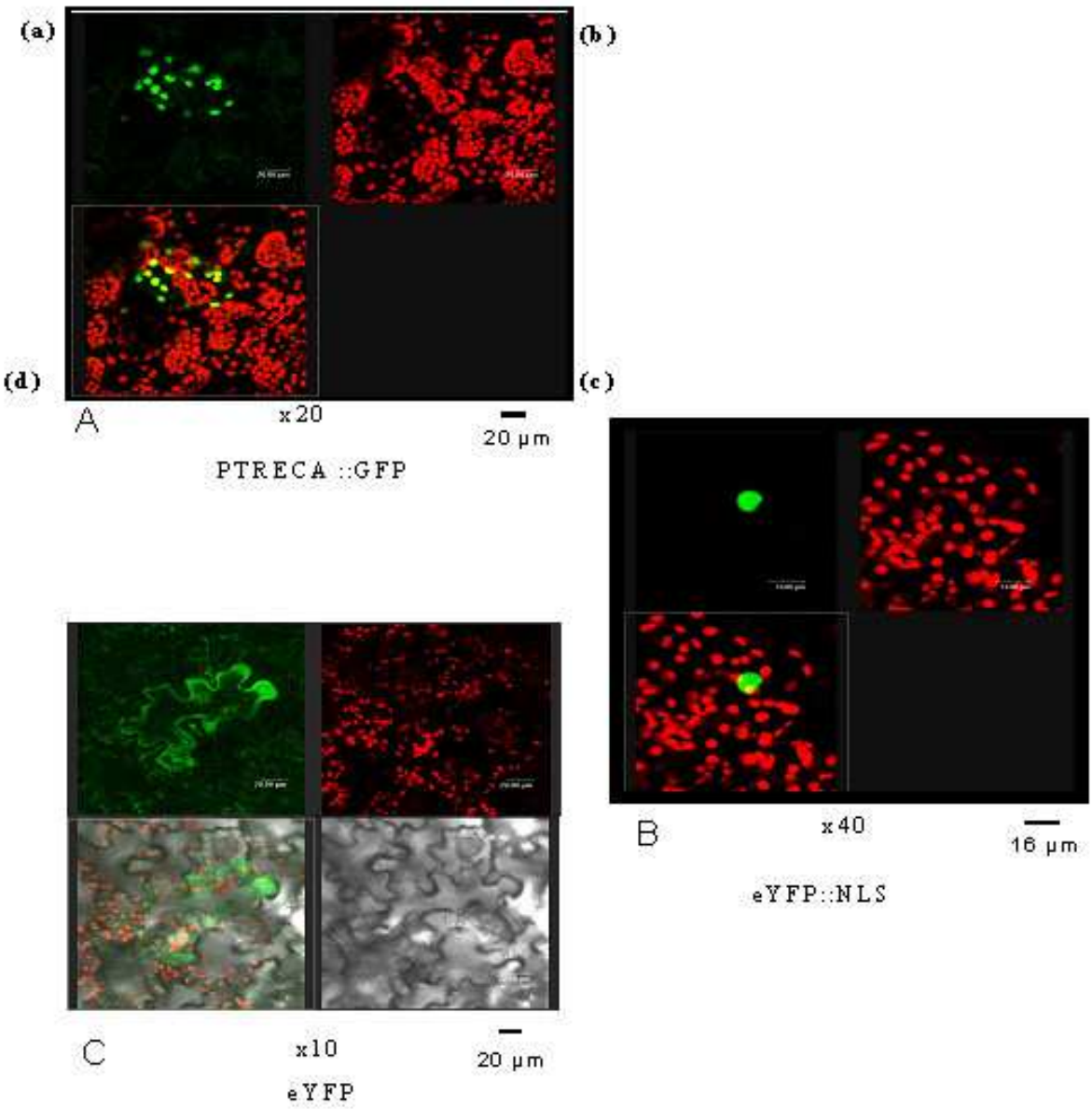


Figure 29 : Observation en microscopie confocale de feuilles de tabac après agroinfiltration

Cellules épidermiques exprimant : A : RECA ::GFP ; B : eYFP ::NLS ; C : eYFP. (a) : fluorescence de la GFP ; (b) : autofluorescence de la chlorophylle ; (c) : vue en transmission; (d) : superposition). Le grossissement de l'objectif et les échelles sont indiquées sous les images.

Par conséquent, l'expression de protéines de fusion *in planta* ne permet pas d'établir de façon claire un profil de distribution cellulaire des protéines NIP. Aucune détection claire n'a été observée avec les constructions comprenant AtNIP1 et AtNIP3. Les 40 premiers acides aminés d'AtNIP2 pourraient conduire le rapporteur dans les chloroplastes mais le signal émis est trop faible pour conclure. L'efficacité de la méthode employée ne peut être remis en question puisque les transformations effectuées avec les constructions contrôles ont toujours conduit aux résultats attendus.

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

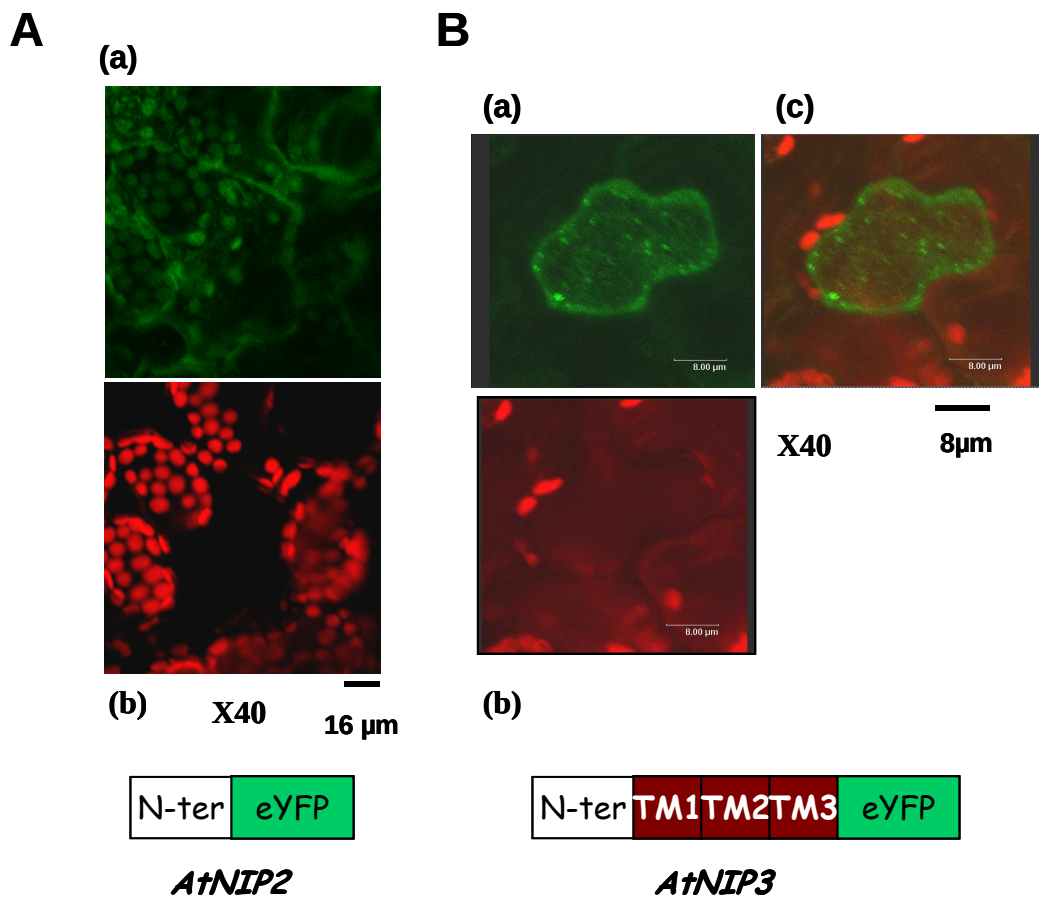


Figure 30 : Localisation des protéines AtNIP2 et AtNIP3 in planta chez le tabac

A : Image confocale obtenue avec la construction A (figure 28) pour AtNIP2, représentative de trois expériences ; B : Image confocale obtenue avec la construction C (figure 28) AtNIP3, représentative de deux expériences. (a) : fluorescence émise par le rapporteur eYFP ; (b) : autofluorescence de la chlorophylle ; (c) : vue superposée des deux images précédentes. Le grossissement et les échelles sont indiqués sous les images.

Les essais de localisation subcellulaire *in planta* présentées n'ayant pas été concluants, une seconde approche est mise en place. Les protéines NIP et NEP sont détectées, grâce aux anticorps dressés contre ces protéines, dans des extraits subcellulaires purifiés chez les deux organismes : Arabidopsis et l'épinard.

I.B. Localisation des protéines NIP et NEP déterminées par une approche de fractionnement subcellulaire

I.B.1 Localisation subcellulaire des protéines NIP et SoNEP

Nous avons vu précédemment (Chapitre 1), que les prédictions bioinformatiques suggèrent que les protéines AtNIP1 et AtNIP2, en particulier, pourraient comporter une séquence d'import vers les organites, les deux autres ne présentant pas de localisation claire.

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

Les protéines NIP appartiennent en outre aux protéines RING finger, connues pour être localisées dans le noyau, cytosol et dans les membranes des peroxysomes (Fan *et al.* 2005). Ces protéines n'ont pas encore été détectées dans les organites semi-autonomes. Etant donné que l'antisérum SE582 est susceptible de reconnaître les protéines AtNIP1 et AtNIP2 (voir Chapitre 2), nous pouvons contrôler si l'une d'entre elles est détectée dans les extraits nucléaires et de chloroplastes d'Arabidopsis (Figure 31A).

Le sérum SE582 révèle un polypeptide de masse moléculaire attendue, environ 25 kDa, dans des extraits totaux et plastidiaux. Nous constatons l'absence de réaction dans les extraits nucléaires. Une immunodétection effectuée avec un antisérum produit contre la protéine ribosomale L4 de chloroplastes d'épinard (Trifa *et al.* 1998), permet de contrôler une éventuelle contamination des protéines nucléaires par des protéines plastidiales. Une coloration au bleu de Coomassie des profils polypeptidiques totaux et nucléaires montrent un enrichissement en protéines histones, fournissant ainsi un contrôle de qualité des extraits nucléaires. Nous n'observons pas de contamination des noyaux par des protéines chloroplastiques.

Au vu de ces résultats, les protéines NIP s'accumulent uniquement dans les chloroplastes. Nous allons maintenant vérifier si les protéines NIP peuvent également être adressées aux mitochondries. L'antisérum SE582 est utilisé sur des protéines des membranes mitochondriales de cellules d'Arabidopsis (Jouhet *et al.* 2004; Zimmermann *et al.* 2005) ainsi que sur les extraits totaux de cellules et de plantules totales (Figure 31 B et C). La souche de cellules, fournie par le laboratoire de « Physiologie Cellulaire végétale » (CEA Grenoble), est peu photosynthétique, et particulièrement riche en mitochondries. La figure 31B montre une différence dans la charge en protéines. Alors que les extraits totaux de plantules et mitochondriaux sont présents en quantités équivalentes, la quantité de protéines totales de cellules déposée est plus faible. Le sérum SE582 révèle un polypeptide de masse moléculaire proche de 25 kDa dans les extraits totaux de plantules et dans les extraits mitochondriaux (Figure 31C).

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

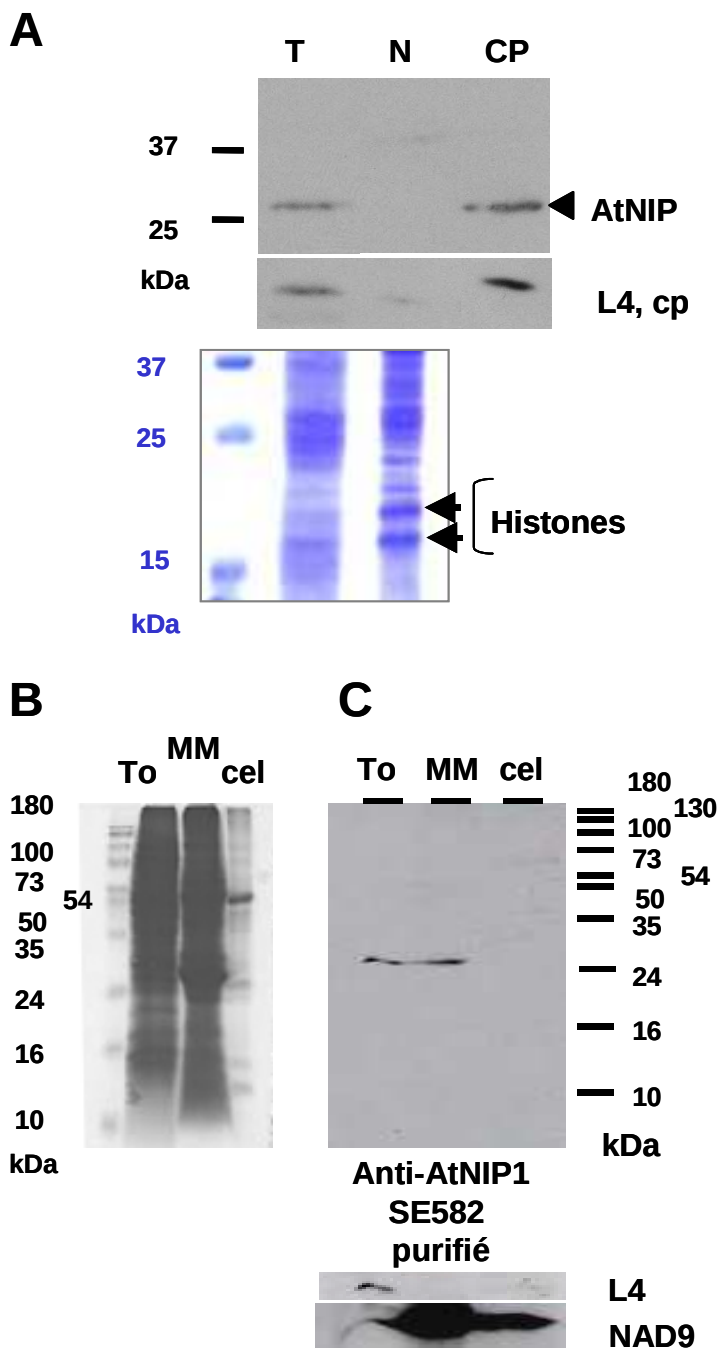


Figure 31 : Immunolocalisation subcellulaire des protéines NIP chez A. thaliana

A : Immunodétection des protéines NIP avec le sérum SE582 sur des protéines totales (T), nucléaires (N) et chloroplastiques (CP) d'A. thaliana séparées par SDS-PAGE puis transférées sur membrane de nitrocellulolose.En parallèle, les extraits totaux et nucléaires sont colorés au bleu de Coomassie : Les protéines histones sont indiquées par des flèches. L4 : immunodétection avec un antisérum produit contre la protéine ribosomale d'épinard (1/1000). B: Profils polypeptidiques de mitochondries (MM), et d'extraits totaux de plantules (To) et de cellules d'A. thaliana (cel), séparées par SDS PAGE et colorés au bleu de Coomassie. C : Immunodétection des protéines NIP obtenue avec l'antisérum SE582 NIP (1/3000) ; avec l'antisérum produit contre la protéine NAD9 de l'enveloppe mitochondriale (1/10000) ; et l'antisérum produit cotre la protéine ribosomique L4 (1/1000.

L'absence de détection de polypeptide NIP, en particulier dans les protéines cellulaires totales peut être liée à une quantité insuffisante de protéines déposées, située en dessous du seuil de détection des anticorps SE582 (Figure 31B). Le sérum produit contre la protéine L4

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

reconnaît la protéine cible dans les extraits totaux de plantules. Il révèle également, mais plus faiblement, le polypeptide cible dans les protéines de cellules. En revanche, aucun signal n'est détecté dans les extraits mitochondriaux, suggérant que ces derniers ne sont pas contaminés par des protéines plastidiales. L'antisérum dirigé contre la protéine membranaire NAD9 reconnaît également sa protéine cible dans les extraits totaux et mitochondriaux.

Ces résultats pourraient indiquer une localisation des protéines NIP dans les mitochondries d'*A. thaliana*, mais cette expérience reste à confirmer avec des dépôts de protéines équivalents en charge, ou sur des protéines mitochondriales ou par une troisième approche : des tests d'import *in vitro*.

Nous allons maintenant contrôler la localisation subcellulaire des protéines NIP et SoRPOT ;2 chez l'épinard. L'épinard offre notamment la possibilité de purifier des mitochondries à partir des feuilles, contrairement à Arabidopsis, et donc de rester avec le même matériel utilisé pour isoler les chloroplastes. Les antisera NIP SE582 et SoRPOT ;2 692-2P sont utilisés sur des extraits totaux, de chloroplastes et de mitochondries d'épinard (Figure 32). Les IgG dressés contre NIP détectent clairement un polypeptide de masse moléculaire attendue, voisine de 25 kDa, dans les fractions totales et chloroplastiques. Nous pouvons également constater un enrichissement du signal produit avec les protéines plastidiales par rapport aux protéines totales. Ce sérum réagit également dans les extraits mitochondriaux, mais le signal produit par la détection est plus faible que celui observé dans les extraits totaux, et probablement dû à une contamination des protéines mitochondriales. L'antisérum 692-2P dirigé contre l'ARN polymérase SoRPOT ;2 révèle un polypeptide de masse moléculaire attendue, comprise entre 100 et 130 kDa, dans les extraits plastidiaux uniquement. Les profils de charges des protéines sont contrôlés par une coloration des protéines sur les membranes au Rouge Ponceau, présentés sur la figure 32A et 32B. Les anticorps dirigés contre la protéine plastidiale KARI (Kétol Acid Reducto Isomérase; Dumas *et al.* 1991), localisée dans le stroma, sont utilisés comme témoins de charge des fractions plastidiales. Ils permettent également de contrôler la contamination des extraits mitochondriaux d'épinard par des protéines plastidiales. Nous constatons la présence de KARI dans la fraction mitochondriale, confirmant ainsi ce qui a été observé avec les IgG SE582, ce qui signifie que la détection de NIP observée dans la même fraction peut être due à une contamination par des protéines plastidiales. En revanche, le sérum produit contre la protéine T mitochondriale met en évidence un enrichissement important des protéines mitochondriales dans la fraction purifiée par rapport aux extraits totaux (Vauclare *et al.* 1996).

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

Il montre en outre, que les chloroplastes ne sont pas contaminés par des protéines mitochondriales.

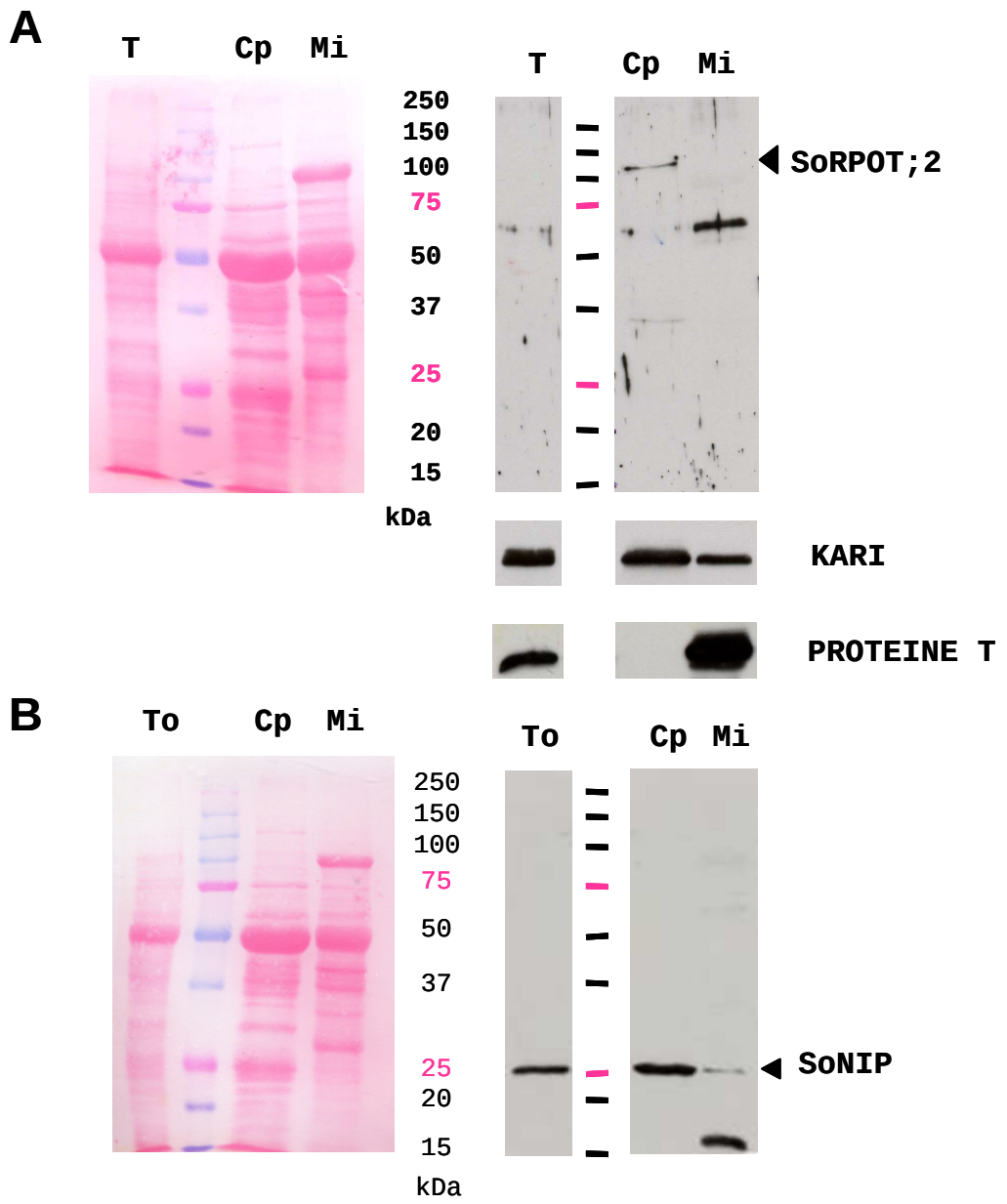


Figure 32 : Localisation subcellulaire des protéines NIP et RPOT ;2 chez l' épinard.

A et B : A gauche, coloration au Rouge ponceau de protéines totales (T), des protéines extraites de chloroplastes (CP), et de mitochondries (Mi) d'épinard transférées après séparation par SDS-PAGE. à droite, immunodétection des protéines SoRPOT ;2 (A) et NIP (B) d'épinard avec les antisera SoRPOT ;2 692-2P et AtNIP1 SE582 (dilutions 1/3000 et 1/2000). KARI : Ketol Acid Reducto Isomerase (1/10000) ; T : protéine T du complexe de la glycine décarboxylase (1/3000).

Nous pouvons donc conclure que chez l'épinard, SoNIP et l'ARN polymérase SoRPOT ;2 sont détectées dans le même compartiment subcellulaire, c'est à dire dans le chloroplaste. Cette localisation de SoRPOT ;2, obtenue par immunodétection, ne correspond pas à ce qui a été observé chez *A. thaliana*, par transformation *in planta* avec des constructions exprimant des fusion de polypeptides N-terminaux avec un rapporteur

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

fluorescent. Cette approche a conduit à des résultats différents et assez mitigés. En effet, les travaux de Hedtke et collaborateurs (Hedtke *et al.* 2000) ont aboutit à un double localisation de la protéine dans le chloroplaste et la mitochondrie, grâce à deux codons, codant une méthionine, en phase, susceptibles d'initier la synthèse de deux polypeptides précurseurs. Récemment, une équipe japonaise (Kabeya & Sato 2005) a mis en évidence que la région 5' transcrite non traduite peut influer la nature du polypeptide formé et donc sur la localisation subcellulaire de la polymérase. Ainsi, ils en ont déduit une localisation mitochondriale exclusivement. Finalement, la localisation de l'ARN polymérase AtRPOT ;2 ne paraît pas encore bien claire chez Arabidopsis.

Par ailleurs, il semble par conséquent, au vu des difficultés rencontrées par expression des hybrides NIP ::eYFP *in planta*, et étant donné que le sérum SE582 puissent reconnaître plusieurs protéines NIP, la localisation subcellulaire précise de chacune des protéines NIP ne peut être définie que par une autre approche : import *in vitro* ou encore par immunodétection après fractionnement subcellulaire de transformants d'*A. thaliana* exprimant une protéine NIP fusionnée à une étiquette pouvant servir d'épitope (étiquette poly-histidines ou HA).

Nous allons désormais affiner la localisation subplastidiale des protéines NIP et NEP, et vérifier si elles concordent à nouveau.

I.B.2 Localisation subplastidiale des protéines NIP et NEP

Les protéines NIP sont localisées clairement dans les chloroplastes. Afin de vérifier s'il s'agit effectivement de protéines associées aux membranes, l'antisérum SE582 est utilisé pour détecter les protéines NIP dans les fractions subplastidiales, séparées et purifiées chez *A. thaliana* (Awai *et al.* 2001) et chez l'épinard (Figure 33). Ces anticorps révèlent un polypeptide unique, de masse moléculaire attendue voisine de 25 kDa, dans les chloroplastes et membranes plastidiales (Figure 33B) chez l'épinard. Ils ne réagissent pas dans la fraction soluble du chloroplaste. Ne constatant aucune réaction du prélèvement pré-immun sur ces extraits, cette détection est donc bien spécifique. Les protéines SoNIP sont par conséquent retrouvées dans un sous compartiment membranaire du plaste. Ce résultat confirme également les prédictions faites par analyses bioinformatiques (logiciel TMpred, Chapitre 1).

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

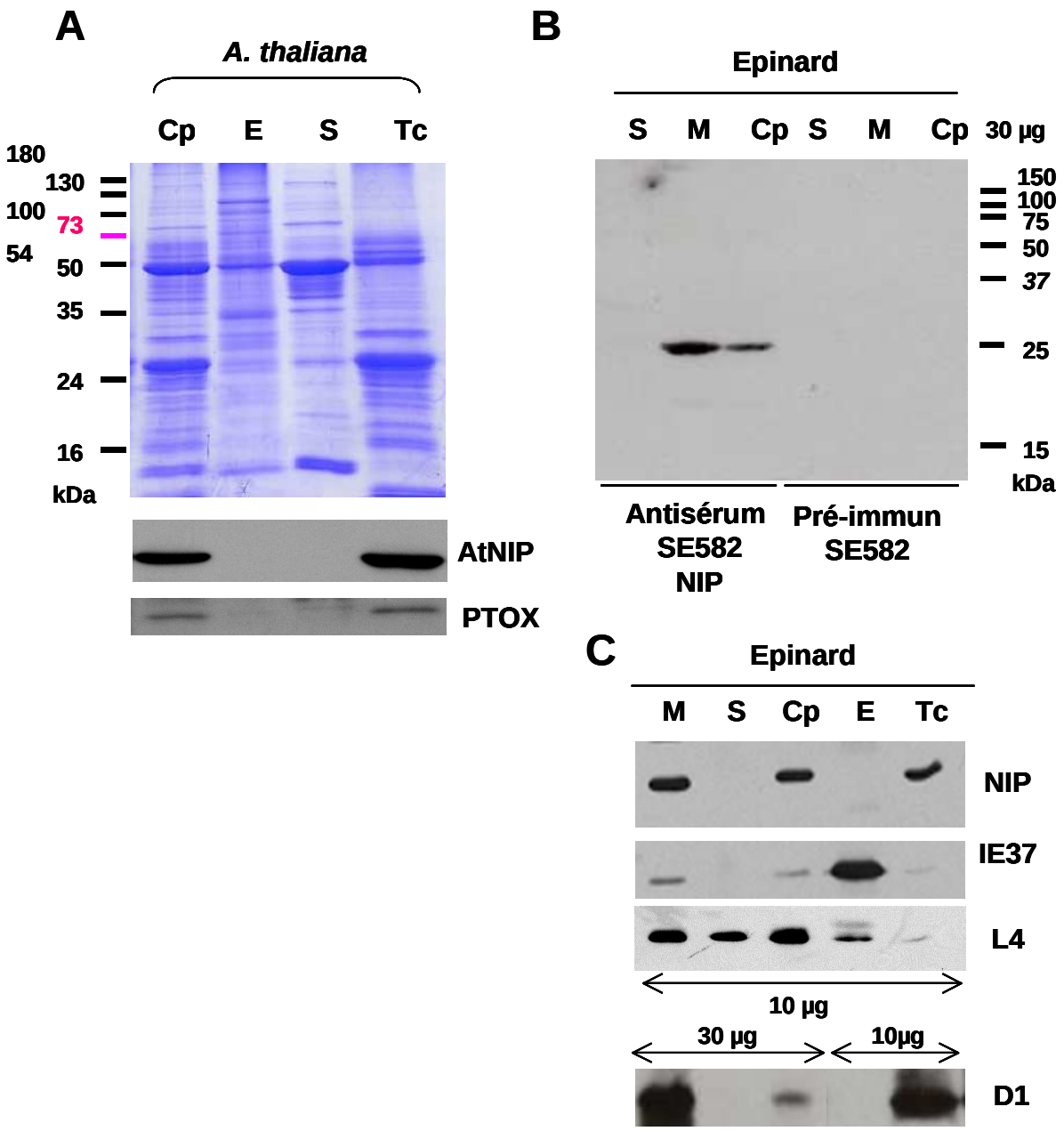


Figure 33 : Immunolocalisation sub-plastidiale des protéines NIP chez A. thaliana.

A : en haut, Coloration au bleu de Coomassie de protéines d'Arabidopsis (25 µg environ) de chloroplastes (Cp), d'enveloppe (E), de stroma (S) et des thylacoïdes (Tc) séparées par SDS-PAGE. En bas, Immunodétection des protéines NIP avec le sérum SE582 (1/3000). PTOX : Plastidial Terminal Oxydase (1/5000). B : Immunodétection des protéines SoNIP avec le sérum SE582 dans des extraits plastidiaux totaux (Cp), solubles (S) et membranaires (M) d'épinard. Le sérum et le prélèvement pré-immun (PI) sont utilisés à une dilution 1/3000. C : Immunodétection des protéines dans les sous fractions du chloroplaste d'épinard (dilution 1/3000). Les sera dirigés contre les protéines ribosomale L4, IE37 (Inner Enveloppe 37) et D1 (Protéine S1 du photosystème D1) sont utilisés comme contrôles (dilutions respectives 1/3000, 1/240000, 1/3000).

Pour définir plus précisément la localisation de NIP et SoRPOT ;2 dans les chloroplastes, des protéines de chloroplastes, stroma, enveloppe et thylacoïdes d'Arabidopsis et d'épinard sont ensuite séparées par SDS-PAGE puis transférées sur membrane de nitrocellulose. Les immunodétections réalisées alors avec l'antisérum SE582 NIP sur ces

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

extraits (Figures 33A et 33C) révèlent un polypeptide de 25 kDa dans les thylacoïdes chez *A. thaliana* et chez l'épinard. Plusieurs sera, dirigés contre des protéines appartenant à chaque compartiment subplastidial, sont utilisés pour contrôler le degré de pureté des fractions isolées et analysées. La coloration des protéines d'Arabidopsis au bleu de Coomassie présentée dans la Figure 33A, permet d'observer la charge et les profils des protéines déposées. Ces fractions présentent des profils protéiques bien différents, nous distinguons notamment une disparition quasi complète de la grande sous unité de la Rubisco, soluble, mais présente en quantité si abondante dans le chloroplaste qu'elle tend à contaminer tous les sous compartiments. Des IgG produits contre la protéine thylacoïdienne PTOX (Plastid Terminal Oxydase ; Josse *et al.* 2000), détectent le polypeptide correspondant dans les protéines plastidiales et membranes thylacoïdes uniquement, démontrant ainsi que l'enveloppe et stroma ne sont pas contaminés par des protéines thyalcoïdiennes. Chez l'épinard, la détection obtenue avec le sérum produit contre la protéine IE37 (Inner Envelope 37 ; Block *et al.* 1991) de l'enveloppe interne montre une enrichissement important des protéines de l'enveloppe par rapport au chloroplastes totaux et aux membranes. Ces anticorps mettent également en évidence une très légère contamination des thylacoïdes par des protéines de l'enveloppe. En revanche, les IgY dressés contre la protéine D1 du photosystème II (Agrisera) n'est pas décelée par les enveloppes, montrant ainsi la pureté de cette dernière. Ces anticorps anti-D1 révèlent bien la protéine cible dans les chloroplastes, dans les sous compartiments membranaires et thylacoïdes. L'antisérum L4 détecte la protéine ribosomale dans tous les extraits d'épinard testés. En effet, les protéines ribosomales ont tendance à s'accoler aux membranes. Nous pouvons en outre remarquer que ces anticorps parviennent à révéler dans les enveloppes, un polypeptide de MM légèrement supérieure à celle de la protéine mature, correspondant sans doute à la forme polypeptidique précurseur en cours d'import, et contenant encore son peptide de transit.

La légère contamination des thylacoïdes par des protéines de l'enveloppe n'altère pas les conclusions concernant la localisation subplastidiale des protéines NIP, puisqu' aucune trace n'est détectée par le sérum SE582 dans les enveloppes. D'autre part, cette contamination est mis en évidence par un antisérum IE37 très sensible (dilution utile de 1/240 000), représentant sans doute des quantités très faibles.

Par conséquent, les protéines NIP sont localisées, chez Arabidopsis et chez l'épinard, dans les membranes thylacoïdiennes. Nous pouvons penser que cette localisation puisse être conservée chez d'autres espèces exprimant NIP.

Nous poursuivons toujours dans la démarche visant à confirmer l'interaction observée chez la levure, en vérifiant si l'ARN polymérase SoRPOT ;2 peut être également localisée

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

dans le même compartiment que les protéines NIP. La même approche est utilisée, et les résultats présentés dans la figure 34.

Les protéines chloroplastiques, du stroma, des thylacoïdes et de l'enveloppe sont observées par une coloration au Rouge Ponceau de la membrane utilisée pour l'immunodétection de SoRPOT ;2 (figure 34A). L'antisérum 692-2P correspondant révèle un seul polypeptide, d'une masse moléculaire proche de 120 kDa, dans les chloroplastes et fractions thylacoïdiennes (figure 34B). Le signal est enrichi par rapport aux protéines totales du chloroplaste, ce qui valide la purification. Des traces sont observées légèrement plus haut sur la piste contenant les protéines de l'enveloppes, pouvant correspondre à une forme précurseur ou une légère contamination de la fraction d'enveloppe par des protéines des thylacoïdes.

Les IgG dirigés contre SoRPOT ;3 et purifiés sur peptide, sont également utilisés sur les mêmes extraits, déposés en quantité plus importante. Ils détectent un polypeptide de masse moléculaire attendue, proche de 120 kDa, dans les extraits plastidiaux et thylacoïdiens (figure 34C). Nous pouvons remarquer en outre l'apparition d'un signal entre 50 et 75 kDa dans le stroma, résultant probablement d'une réaction aspécifique. Un polypeptide de MM voisine de 130 kDa, est également clairement détecté dans les enveloppes. Etant donné que ce polypeptide présente une masse moléculaire légèrement supérieure à celle observée dans les chloroplastes et thylacoïdes, elle pourrait éventuellement correspondre à la forme précurseur de SoRPOT ;3 en cours d'import. La pureté des fractions isolées et séparées par SDS-PAGE est vérifiée en utilisant des sera dirigés contre des protéines plastidiales bien caractérisées. Nous avons utilisé à nouveau les IgG dressés contre IE37, et PTOX. Les anticorps dirigés contre IE37 révèlent un polypeptide de taille attendue dans les enveloppes, et dans les extraits plastidiaux totaux. Un signal très faible est produit dans les membranes thylacoïdiennes suggérant une très légère contamination des thylacoïdes par des protéines de l'enveloppe. L'antisérum PTOX détecte le polypeptide cible dans les extraits totaux de chloroplastes et dans les thylacoïdes. Ces deux immunodétections montrent un enrichissement clair du signal produit sur des extraits subplastidiaux par rapport à celui observé dans les extraits totaux. En outre, les enveloppes sont pures.

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

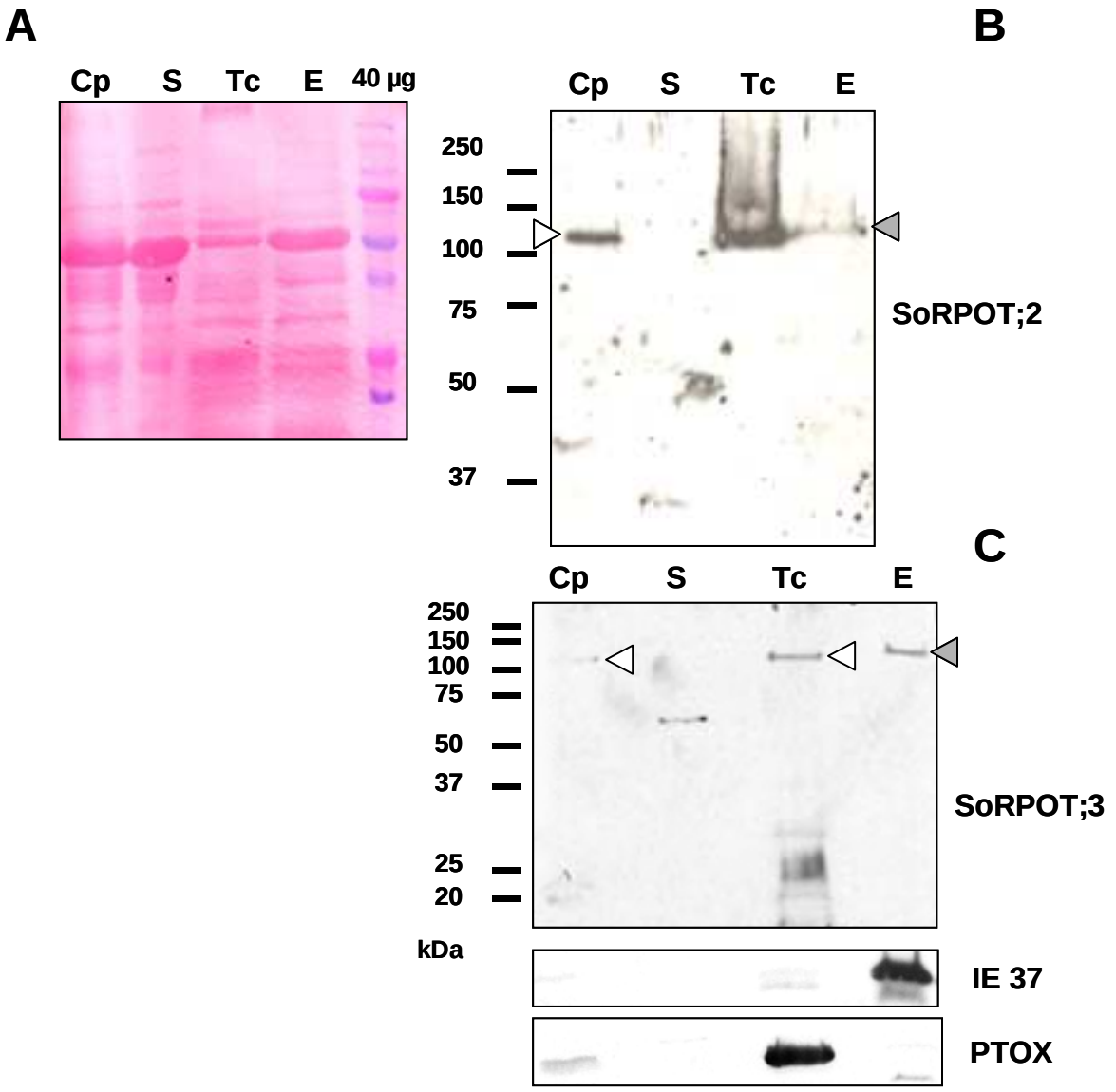


Figure 34 : Localisation subplastidiale SoRPOT ;2 et SoRPOT ;3 chez l'épinard

A : Coloration au rouge Ponceau de protéines (40 µg, Cp : chloroplaste, S : stroma, Tc : thylacoïdes, E : enveloppe) transférées après séparation par SDS-PAGE. B et C : Immunodétection des protéines SoRPOT ;2 et SoRPOT ;3 avec les antisera SoRPOT ;2 692-2P et les IgG SoRPOT ;3 purifiés sur peptides 786, (dilutions 1/1000 et dilué au 1/500). Les anticorps dressés contre les protéines IE37 (dilution 1/240 000), et PTOX (lapin 1, dilution 1/5000) sont utilisés pour contrôler le degré de pureté des fractions subplastidiales. Les flèches blanches indiquent les polypeptides NEP détectés, et les flèches grises pointent, en B et C, un polypeptide de plus haute masse moléculaire.

Au vu de l'ensemble de ces résultats, les ARN polymérases SoRPOT ;2 et SoRPOT ;3 sont préférentiellement associées aux membranes plastidiales, et plus particulièrement aux thylacoïdes. Les deux polymérases ne présentent pas de profil transmembranaire, de plus, aucun motif de rattachement aux membranes, tel que l'ajout de sucre ou lipide, n'a été clairement mis en évidence à ce jour. Elles doivent par conséquent être associées à la membrane par une autre partenaire : un ou plusieurs partenaires de nature protéique,

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

impliquant éventuellement les protéines NIP, ou bien l'ADN plastidial, comportant des régions attachées aux membranes (voir Introduction). Ce point va être exploré dans la partie suivante.

En revanche, nous avons vu que, d'après les prédictions du logiciel TMpred, les protéines NIP peuvent comporter des régions membranaires (Chapitre 1). Nous allons donc continuer en vérifiant cela et en analysant la topologie des protéines NIP dans les membranes thylacoïdiennes.

I.B.3 Topologie des protéines NIP

La stabilité de l'association des protéines aux membranes dépend de la force ionique du milieu. Par conséquent, nous avons préparé des membranes thylacoïdiennes d'épinard, que nous avons lavées avec des solutions de force ioniques différentes. Nous avons ensuite recherché par immunodétection, après SDS-PAGE et transfert, la présence des protéines NIP dans les fractions lavées ou non (Figure 35).

L'antisérum SE582 NIP détecte un polypeptide de masse moléculaire attendue, soit 25 kDa, dans l'échantillon témoin non traité, ainsi que dans les membranes lavées avec NaCl 1M et avec NaOH 0.1N. Le signal produit ne disparaît pas avec les lavages, en fait, l'accumulation du polypeptide n'est pas du tout perturbée. Nous avons alors effectué d'autres immunodétections afin de valider cette expérience, avec des antisera dirigé contre la protéine L4 d'épinard et contre la protéine OEC33 du photosystem II (Oxygen Evolving Complex 33, Hutin *et al.* 2002). Les ribosomes tendent à coller aux membranes, nous pouvons donc suivre leur profil détection au cours de l'expérience. Nous constatons, sur la figure 35, que les anticorps dressés contre la protéine L4 reconnaissent bien leur polypeptide cible dans les membranes non lavées, de plus, celui ci disparaît en grande partie dès le premier lavage au NaCl 1M. La protéine OEC33 est intégrée aux membranes thylacoïdiennes, et orientée vers la face luminale. L'antisérum correspondant révèle un polypeptide de masse moléculaire attendue, dans tous les extraits analysés, sans différences significatives du signal produit. Ces lavages salins et à la soude ont permis de bien détacher la protéine ribosomale L4, et en revanche, ils n'ont pas modifié l'association de la protéine OEC33, intégrée à la membrane. Nous pouvons donc conclure que SoNIP est assez fortement associées aux thylacoïdes et pourrait être au moins partiellement intégrée dans les membranes.

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

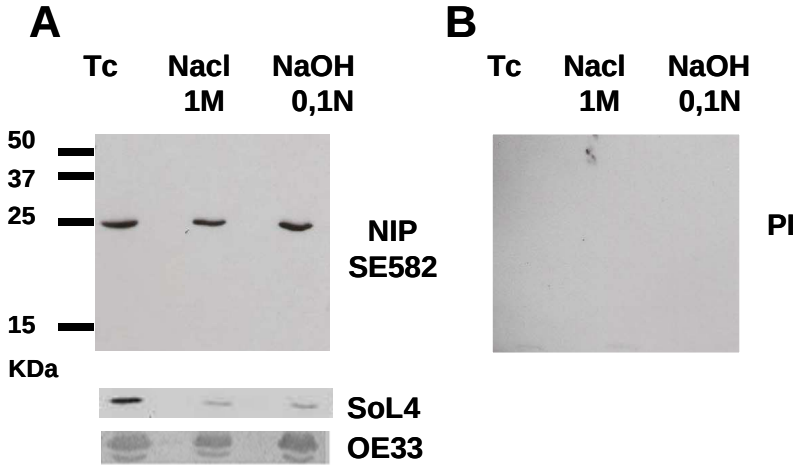


Figure 35 : Analyse de la topologie des protéines NIP dans les membranes thylacoïdiennes (Tc) d'épinard

A : Immunodétection des protéines NIP d'épinard obtenue avec le sérum SE582 (dilution 1/3000), dans des membranes thylacoïdiennes (Tc, 20 µg) lavées avec NaCl 1 M, ou NaOH 0,1 N. B: Immunodétection réalisée sur les même extraits avec le prélèvement pré-immun SE582 (dilution 1/3000).

Afin d'analyser la topologie de l'insertion de SoNIP dans la membrane, un traitement réalisé avec la thermolysine sur des membranes intactes. La thermolysine ne traverse pas les membranes, et permet d'éliminer tous les polypeptides présents à la surface des membranes. L'activité de cette enzyme nécessite la présence d'ions Ca^{2+}, l'ajout d'un agent chélatant (EGTA) inhibe donc son activité et nous permet ainsi de contrôler la spécificité de la réaction (Joyard *et al.* 1983). Les protéines SoNIP sont détectées avec l'antisérum SE582. Nous constatons, sur la figure 36, que la thermolysine conduit à la disparition des protéines SoNIP. Cette protéolyse est inhibée en présence d'EGTA.

A défaut d'autres anticorps dirigés contre une protéine thylacoïdienne, à l'époque, nous avons utilisé l'antisérum dressé contre la protéine ribosomale L4. Les protéines NIP sont donc sensibles à un traitement à la thermolysine. Les épitopes choisis pour produire l'antisérum SE582 sont localisés près de l'extrémité C-terminale de la protéine. Un dernier contrôle reste cependant à réaliser afin de vérifier l'intégrité des thylacoïdes suite à ce traitement, en détectant par exemple une protéine localisée sur la face lumenale des membranes. Nous pouvons donc penser que sons extrémité C-terminale est orientée vers la face stromale des membranes thylacoïdiennes, car la face luminale n'est pas accessible à la thermolysine.

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

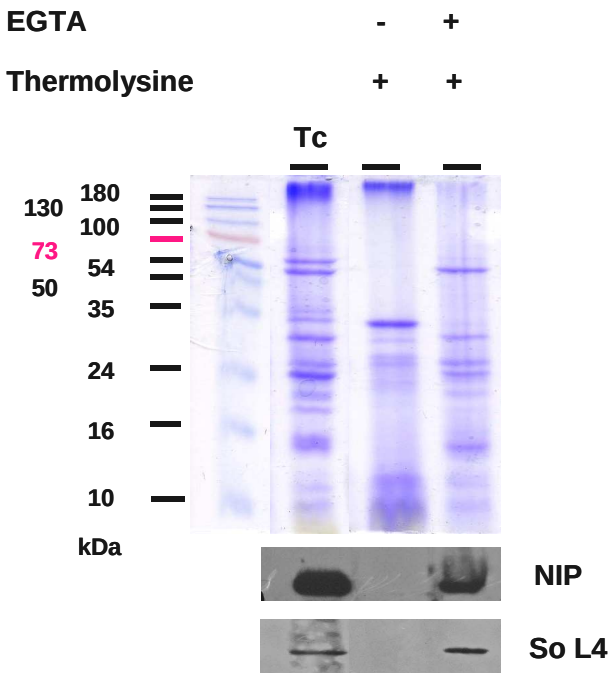


Figure 36 : Topologie des protéines NIP dans les membranes thylacoïdiennes de chloroplastes d'épinard.

Haut : Coloration au bleu de Coomassie de protéines de membranes thylacoïdiennes d'épinard (Tc), traitées avec la thermolysine (Calbiochem, 25 Ku) en l'absence (-) ou en présence (+) d'EGTA (20 mM). Bas : Immunodétection des protéines SoNIP (sérum SE582, dilution 1/3000). Le sérum anti-L4 est utilisé à une dilution 1/3000.

Par conséquent, SoNIP est fortement intégrée aux membranes thylacoïdiennes, toutes les topologies envisageables sont présentées schématiquement dans la figure 37. Elle peut être partiellement incrustée dans les membranes, présentant ainsi ses deux extrémités vers le stroma, ou bien, comme le prédit le logiciel TMpred, il peut s'agir s'une protéine polytopique comportant trois hélices transmembranaires, avec l'extrémité C-terminale orientée vers le stroma.

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

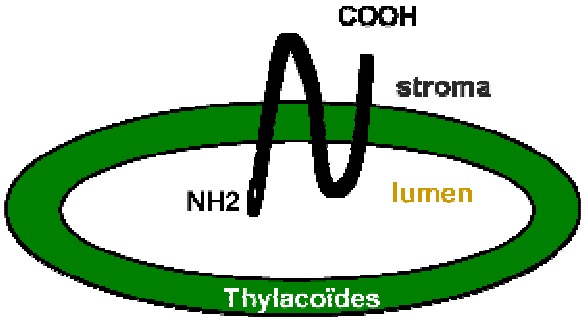


Figure 37 : Topologie putative des protéines NIP dans les membranes thylacoïdiennes.

Modèle présentant la protéine NIP intégrée dans les thylacoïdes via trois hélices transmembranaires.

Les protéines NIP détectées par le sérum SE582, sont détectées exclusivement dans les thylacoïdes, chez l'épinard et chez Arabidopsis. Elles semblent être intégrées aux membranes, avec leur extrémité C-terminale orientée vers le stroma. Les ARN polymérases NEP d'épinard, SoRPOT ;2 et SoRPOT ;3, semblent elles aussi préférentiellement associées au compartiment membranaire de chloroplaste, SoRPOT ;2 étant clairement détectée dans la fraction thylacoïdienne. Ces protéines sont donc localisées dans le même sous compartiment, nous allons donc rechercher une proximité physique des protéines NIP et SoRPOT ;2 dans la partie suivante.

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

II. Analyse des interactions NIP/NEP

Les protéines NIP sont donc insérées dans les membranes thylacoïdiennes, chez Arabidopsis et chez l'épinard. Nos résultats montrent également que les protéines NEP SoRPOT ;2 et SoRPOT ;3 sont exclusivement détectées dans le compartiment membranaire du chloroplaste. Ce résultat est d'autant plus surprenant que les protéines NEP ne possèdent pas de domaine transmembranaire prédit ou de région hydrophobe. Nous allons tout d'abord tenter de préciser la nature des interactions des NEP aux membranes.

II.A. Nature de l'association NEP - membranes plastidiales

L'ADN plastidial, circulaire, peut être en partie attaché aux membranes du chloroplaste. Il semble maintenu par des protéines de l'enveloppe par la protéine PEND (Sato *et al.* 1998) ou par des protéines thylacoïdiennes (MFP1 ; Jeong *et al.* 2003) selon le stade de développement du chloroplaste. Il comporte des régions appelées « TAC » (Transcripionnal Active Chromosome ; (Greenberg *et al.* 1984 ; Suck *et al.* 1996) ou chromosome transcriptionnellement actif, associées aux membranes. Nous savons que les ARN polymérases sont actives et fortement associés à l'ADN dans ces régions (Krause K & Krupinska K 2000). En effet, des travaux effectués chez *Eugena gracillis* montrent que ces TACs sont essentiellement une région de production d'ARNr (Rushlow *et al.* 1980), alors que chez les plantes supérieures, elles pourraient en plus être le lieu de synthèse d'ARNm (Reiss & Link 1985; Suck et al. 1996).

Nous avons donc cherché à vérifier si les NEP sont associées aux membranes par le biais de l'ADN (Figure 38). Le protocole suivi est présenté sous forme simplifiée dans la figure 38A. Des membranes plastidiales ont été traitées avec des quantités croissantes de DNAse I (Fermentas). Les fractions solubles (FS) et membranaires (FM) sont alors séparées. L'efficacité des réactions est déterminée en observant la disparition de l'ADN plastidial dans les fractions membranaires séparées par électrophorèse sur gel d'agarose (Figure 38B). Des immunodétections sont réalisées sur ces extraits avec les anticorps dressés contre SoRPOT ;2 et les IgG 786 purifiés produits contre SoRPOT ;3 (Figure 38C).

La figure 38B montre une disparition de l'ADN plastidial dès la plus faible quantité de DNase testée (piste numérotée 3). La protéine KARI, marqueur du stroma, n'est pas présente dans les fractions membranaires précipitées. De même, la fraction soluble ne semble pas contaminée puisque la présence de la protéine membranaire PTOX n'est pas détectée.

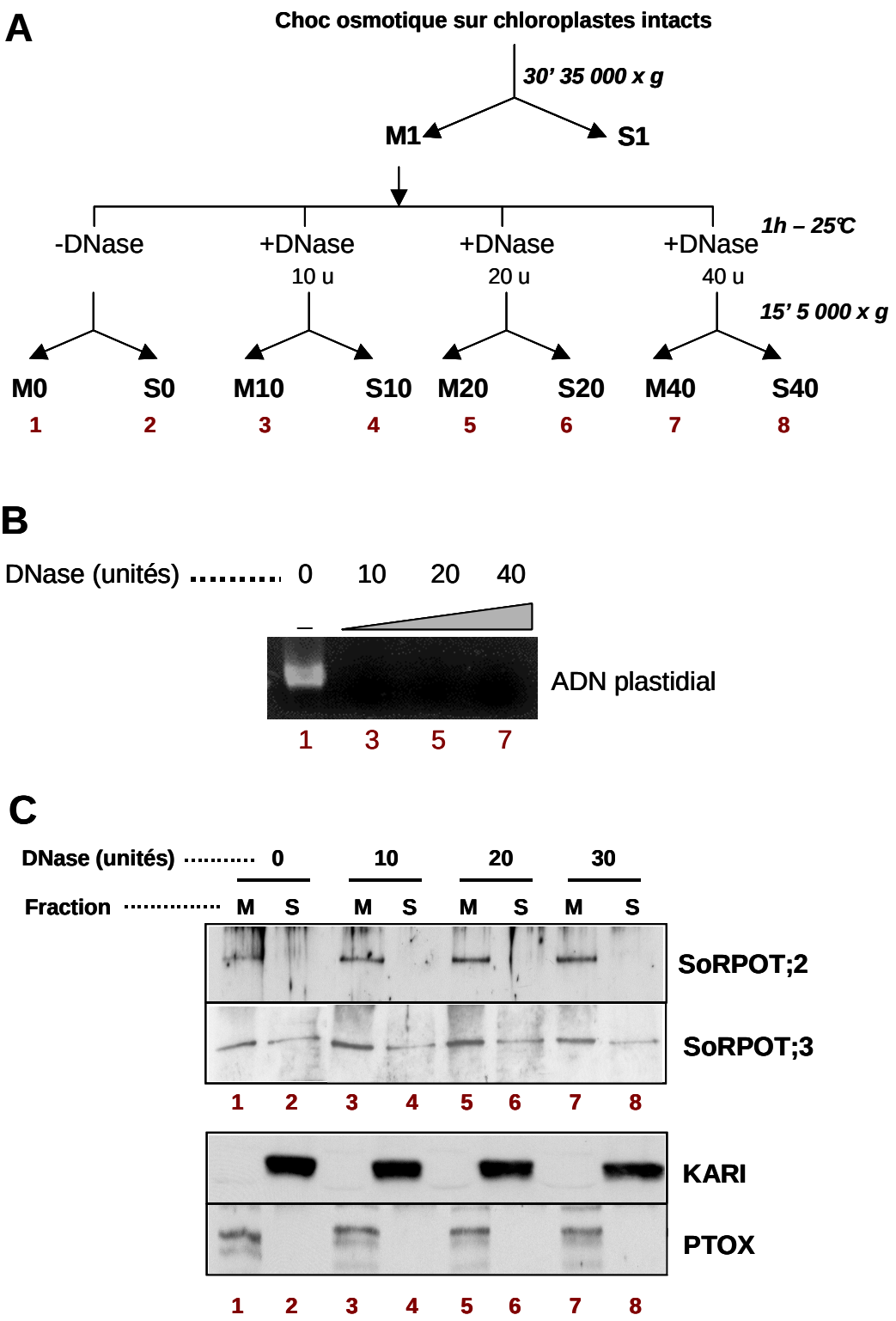


Figure 38 : Association des NEP aux membranes plastidiales: traitement à la DNase I

A : Schéma simplifié présentant le protocole suivi lors du traitement à la DNase I. B : ADN plastidial dans les membranes traitées à la DNase I par électrophorèse sur gel d'agarose (coloration BET) C : Immunodétection des protéines SoRPOT ;2 et SoRPOT ;3, (quantités équivalentes à 7,5 µg de chlorophylle respectivement avec les sera 692-2P et 786 purifié (dilutions 1/1000 et 1/200)). Toutes les expériences effectuées sur des membranes plastidiales dans ce chapitre, sont rapportées à des dosages de la chlorophylle (voir Matériel et Méthodes). U : unité de DNase I (Euromedex). FM1 : Membranes plastidiales; M0, M10, M20 et M40 : fractions membranaires traitées avec 0, 10, 20 et 40 unités de DNase I; S0, S10, S20, S40 : fractions solubles traitées avec 0, 10, 20 et 40 unités de DNase I. KARI : Ketol Acid Reducto Isomerase (1/10000) ; PTOX : Plastid terminal Oxydase, (1/5000)

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

Les profils de distribution des deux polypeptides NEP, détectés par les antisera 692-2P et 786, ne semblent pas être modifiés par les traitements à la DNAse I: quelque soit la quantité d'enzyme utilisée, SoRPOT ;2 reste associée aux membranes, et la répartition de SoRPOT ;3 reste identique au contrôle sans DNase I (figure 38C). Par conséquent, ces résultats montrent que les NEP ne sont pas associées aux membranes par l'intermédiaire de l'ADN même partiellement car elles ne s'accumulent pas dans la fraction soluble après digestion.

Les NEP ne sont donc pas rattachées aux membranes plastidiales via l'ADN. Par ailleurs, elles ne présentent pas de domaine de fixation d'un sucre ou de lipides évident. Il est donc possible que cette association soit due à un partenaire protéique. Les NIP sont des protéines de la membrane thylacoïdienne. L'interaction NIP-NEP ayant déjà été suspectée par l'expérience double hybride, nous avons voulu la vérifier. Nous avons choisi de rechercher des protéines associées à NIP, et ainsi tenter de retrouver l'association avec SoRPOT ;2 par une autre approche.

II.B. Recherche des protéines associées à NIP

Afin de confirmer l'interaction NIP/SoRPOT ;2 observée chez la levure, nous avons cherché à séparer les complexes des membranes plastidiales selon leur masse moléculaire en conditions natives, et à vérifier si ces deux protéines co-éluent.

II.B.1 Séparation des complexes associés aux membranes plastidiales

Cette démarche et ces protocoles sont inspirés de (Sazanov *et al.* 1998).

II.B.1.1 *Evaluation du protocole de solubilisation*

Les membranes plastidiales sont isolées à partir de chloroplastes d'épinard intacts par choc osmotique et solubilisées selon la technique que nous avons mise au point. Elle est décrite en détails dans Matériels et Méthodes et résumée ici dans la figure 39.

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

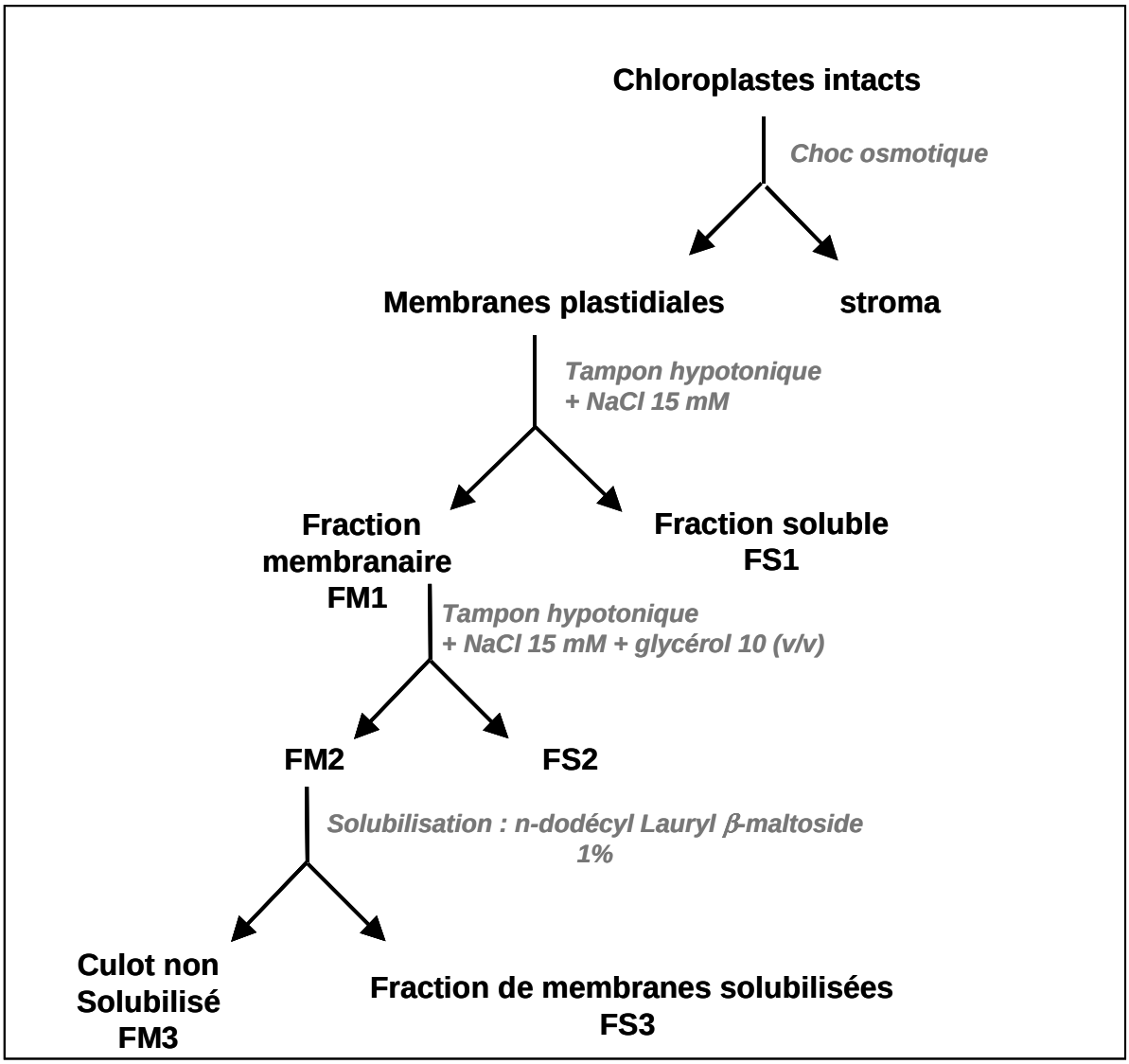


Figure 39: Processus des solubilisation de membranes plastidiales

FM1 et FM2 : Fractions membranaires 1 et 2 ; FS1 et FS2 : Fractions solubles 1 et 2 ; FM3 : Fraction membranaire insoluble ; FS3 : Fraction membranaire solubilisée.

Les extraits sont préparés en trois étapes de précipitation. La solubilisation est obtenue à l'aide d'un détergent doux, non ionique, le n-dodécyl-lauryl maltoside, qui préserve les structures protéiques. Après séparation des polypeptides par SDS-PAGE, et transfert sur membrane de nitrocellulose, nous constatons par immunodétection (Figure 40A), que la solubilisation de SoNIP n'est pas complète ; et conduit à une dégradation probable de NIP dans les fractions demeurant insolubles. Ce protocole a été également effectué à partir de membranes plastidiales de chloroplastes d'*A. thaliana*, extraits sur des plantules de 3 semaines. Il met également en évidence une solubilisation partielle des protéines AtNIP.

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

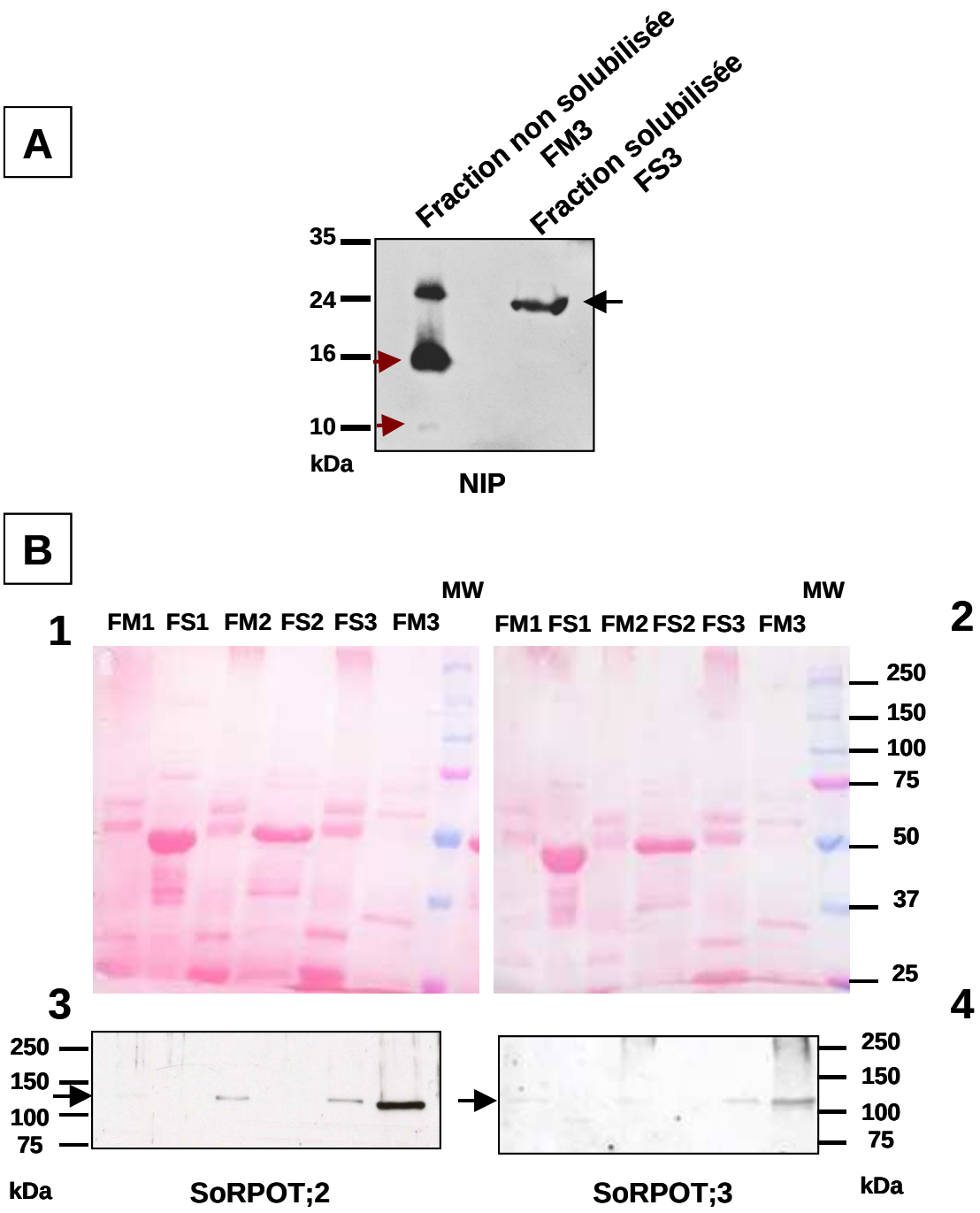


Figure 40: Solubilisation des protéines NIP et NEP chez l'épinard

A : Immunodétection des protéines SoNIP sur des extraits membranaires plastidiaux solubilisés (FS3) ou non (FM3) obtenue avec le sérum anti-NIP SE582 (dilution 1/3000). MW : Marqueurs polypeptidiques de masse moléculaire standards (Euromedex). B1 et B2 : Coloration au Rouge Ponceau des protéines (environ 40 µg), transférées sur nitrocellulose après séparation par SDS-PAGE. B3 et B4 : immunodétection des protéines SoRPOT ;2 et SoRPOT ;3 respectivement avec les sera 692, 2P (dilution 1/1000) et 786 non purifié (dilution 1/750). FM1 et FM2 : Fractions membranaires 1 et 2 ; FS1 et FS2 : Fractions solubles 1 et 2 ; FM3 : Fraction membranaire insoluble ; FS3 : Fraction membranaire solubilisée. MW : Marqueurs polypeptidiques de MM standard (Dual color protein standards, BIORAD). Les polypeptides de masse moléculaire attendue sont indiqués par des flèches noires.

Les polypeptides SoRPOT ;2 et SoRPOT ;3, détectés avec les sera 692-2P et 786 respectivement (Figures 40B, 3 et 4) sont préférentiellement détectés dans les fractions membranaires. Nos conditions expérimentales ne nous permettent pas d'observer les NEP

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

dans les fractions solubles. Nous pouvons également remarquer que la solubilisation n'est pas complète.

Le protocole de solubilisation que nous avons mis au point permet donc la solubilisation, au moins partielle, des protéines NIP et NEP. Il nous a semblé suffisant pour poursuivre notre démarche. Ce traitement très doux maintient l'association des complexes de forte affinité. L'étape suivante vise à séparer les complexes des membranes plastidiales par chromatographie d'exclusion, pour maintenir des conditions expérimentales natives.

II.B.1.2 *Séparation des complexes membranaires natifs par gel filtration*

Une colonne à spectre de séparation large, la Superose 6 HR10/30 (5000 et 5 kDa), a été utilisée lors de nos premiers essais. Les résultats obtenus nous ont amené à utiliser une colonne à spectre résolutif : la Superdex 200 HR10/30. Seuls ces résultats sont présentés ici.

II.B.1.2.1. Technique expérimentale

L'exploitation de résultats de chromatographie d'exclusion requière un calibrage des colonnes avec des protéines ou marqueurs de tailles connues. L'étalonnage est effectué dans les mêmes conditions (débit et tampons) que l'expérience d'intérêt. Ainsi, les marqueurs (« gel filtration standards », BIORAD, fournis sous forme de mélange lyophilisé ; et la catalase de levure de 240 kDa), sont dilués avec le même tampon contenant les extraits membranaires (MOPS 10 mM, $MgCl_2$ 4 mM, 15 mM NaCl, Glycérol 10% (v/v) et n-dodécyl-lauryl-maltoside 1% (p/v) ; concentration finale de « gel filtration standards 9 mg/mL, et la catalase est utilisée à 2 mg/mL). Le calibrage est effectué en injectant 1,4 mg de mélange « gel filtration standards » ou 0,4 mg de catalase. Le volume mort de la colonne est déterminé en injectant 0,5 mg de bleu de dextran (2000 kDa, 1mg/mL). Il est élué dans les mêmes conditions, et correspond à un volume de 7,2 mL.

La quantité d'extraits membranaires solubilisés (fraction FS3, Figures 39 et 40) déposée est toujours estimée selon la concentration en chlorophylle totale, car ce dosage est fiable et rapide. Une quantité de protéines équivalent à 200 à 400 µg de chlorophylle est déposée sur les colonnes préalablement équilibrées, dans le tampon d'élution (MOPS 10 mM, $MgCl_2$ 4 mM, 15 mM NaCl, et n-dodécyl lauryl maltoside 0,1% (p/v)). Les protéines sont ensuite éluées avec le même tampon. Elles sont détectées en sortie de colonne grâce à une cellule de détection UV, en mesurant l'absorbance à 280 nm au cours de l'élution. Un débit de

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

0,35 mL/min est conservé tout au long de l'expérience et du calibrage, et la pression ne doit pas excéder 1,5 Mpa.

II.B.1.2.2. Séparation des complexes membranaires plastidiaux solubilisés par chromatographie d'exclusion

Recherche des protéines NIP

Les chromatogrammes étalon et de séparation d'extraits membranaires plastidiaux solubilisés, sont établis par mesure de l'absorbance à 280 nm au cours de l'élution. Ils sont présentés dans la figure 41A. Les polypeptides contenus dans chaque fraction sont séparés par SDS-PAGE. Nous constatons que le profil d'élution présente des pics d'absorbance à 280 nm bien définis.

L'analyse des fractions avec les anticorps SoNIP AtNIP1 SE582 montre deux pics d'élution des protéines SoNIP :(Figure 41B). Le polypeptide cible d'environ 25 kDa est reconnu,

dans les fractions centrées sur un volume d'élution compris entre 12,5-13 mL

dans les fractions correspondant à un volume d'élution centré sur 9 mL environ.

D'après l'étalonnage (Figure 41A, courbe grise), ces volumes d'élution correspondent respectivement à des protéines ou complexes de masses moléculaires proche de 150 kDa et 670 kDa. Par conséquent, les protéines NIP ne sont pas présentes sous formes de protéines monomériques dans les membranes plastidiales.

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

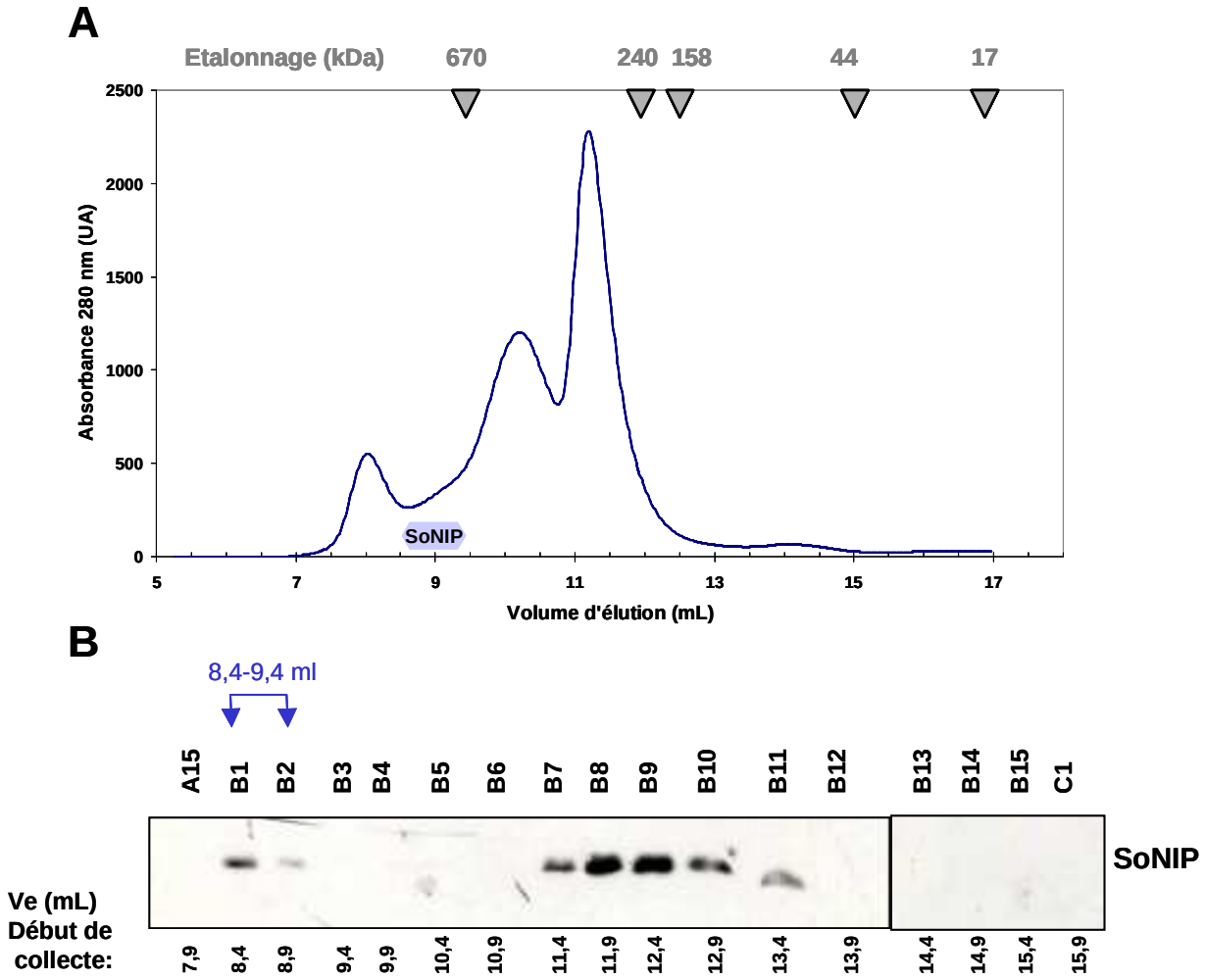


Figure 41 : Séparation des protéines SoNIP de la fraction membranaire solubilisée (FS3) par chromatographie d'exclusion chez l'épinard.

A : profil d'élution des protéines solubilisées suivi par mesure de l'absorbance à 280 nm (courbe noire). L'élution des marqueurs moléculaires est illustrée par les courbes grises (« gel filtration standards », BIORAD : la thyroglobuline bovine 670 kDa, γ- globuline bovine 158 kDa, ovalbumine bovine 44 kDa, myoglobine de cheval 17 kDa ; ou avec la catalase 240 kDa). La masse moléculaire des marqueurs est indiquée au sommet de chaque pic d'absorbance des courbes étalon. B : Immunodétection des protéines SoNIP avec le sérum AtNIP1 SE582 (dilution 1/2500) dans chaque fraction récoltée. Les polypeptides sont transférés après précipitation au TCA, et séparation par SDS-PAGE. Les extraits déposés sur la colonne représentent environ 370 µg de chlorophylle. Tampon d'élution : MOPS 10 mM, $MgCl_2$ 4 mM, 15 mM NaCl, et n-dodécyl lauryl maltoside 0,1% (p/v). Volume des fractions : 500 µL. Débit : 0,35 mL/min, Pression maximale : 1,5 MPa. Ces résultats sont représentatifs d'une série de deux expériences indépendantes.

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

Il semble donc que SoNIP soit associé dans les membranes thylacoïdiennes, à des complexes protéiques, éluant vers 12,5-13 mL et 9 mL, et présentant une masse moléculaire d'environ 150 kDa et 670 kDa.

Cette expérience a été également effectuée sur des extraits membranaires solubilisés de chloroplastes d'Arabidopsis. Ils ont été purifiés à partir de plantules âgées de 3 semaines, cultivées en terre, dans une chambre de culture avec des conditions contrôlées (voir Matériel et Méthodes). Les membranes solubilisées (fraction FS3, figures 40 et 41) sont séparées par chromatographie d'exclusion sur la colonne Superdex 200 HR10/30. Le profil d'élution obtenu est présenté dans la figure 42. Les protéines sont détectées par mesure de leur absorbance à 280 nm. Les protéines AtNIP sont recherchées dans les fractions par immunodétection avec l'antisérum SE582 AtNIP1. Le profil de détection des polypeptides AtNIP comporte deux pics. En effet, ces anticorps reconnaissent un polypeptide de masse moléculaire attendue (25 kDa) dans la fraction A13 et dans les fractions B3/B4 (figure 41B). Les protéines AtNIP sont donc présentes dans deux complexes de masses moléculaires différentes, éluant vers 9 mL et vers 12-13 mL et (Figure 41A). Ces résultats concordent avec ceux obtenus chez l'épinard (Figure 41).

Nous pouvons donc conclure que les protéines NIP détectées par le sérum SE582 ne sont pas présente sous forme de monomères dans les membranes thylacoïdiennes d'épinard et d'Arabidopsis. Elles sont retrouvées dans deux complexes de masses moléculaires différentes, voisines de 150 kDa et légèrement supérieures à 670 kDa.

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

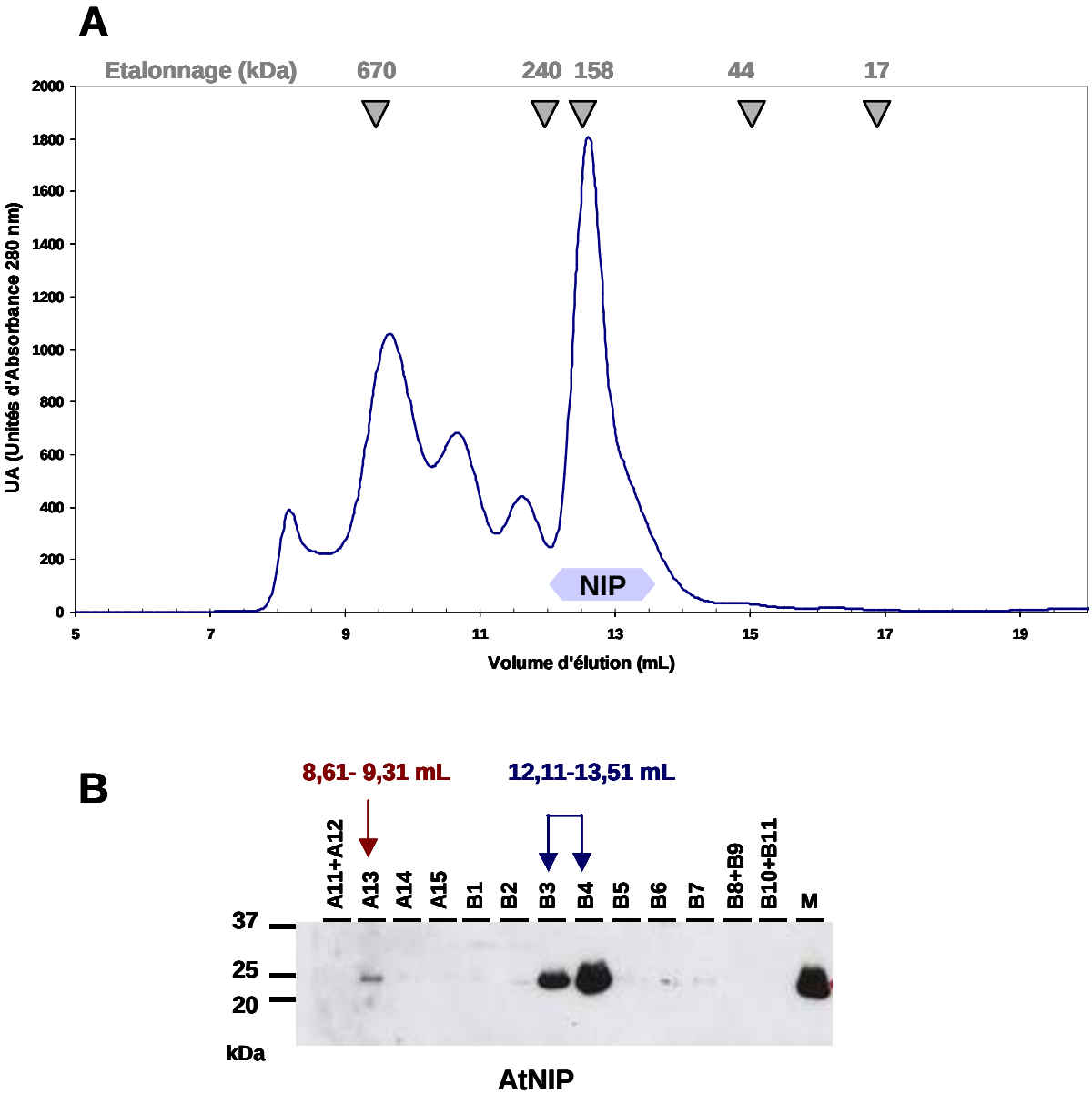


Figure 42 : Séparation des complexes AtNIP par chromatographie d'exclusion à partir d'extraits membranaires plastidiaux solubilisés d'A. thaliana

A : Profil d'élution des complexes membranaires d'Arabidopsis (fraction FS3, figure 40), (courbe noire) mesurés à 280 nm. B: Immunodétection (sérum SE582, 1/2000) des protéines AtNIP dans les fractions issues de colonne : 50 µL de chaque fraction précipités au TCA, puis séparés par SDS-PAGE. Les plopypetides sont transférés sur membrane de nitrocellulose L'étalonnage est indiqué par des flèches au dessus de l'immunoblot. L'équivalent de 200 µg de chlorophylle est déposé sur la colonne. Débit d'élution : 0,35 mL/min ; pression maximale : 1,5 MPa. ; volume des fractions: 700 µL Ces résultats sont représentatifs d'une série de deux expériences indépendantes réalisées chez Arabidopsis.

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

Recherche des protéines SoRPOT ;2

Nous avons suivi la même procédure de solubilisation des membranes plastidiales d'épinard que précédemment. Les membranes solubilisées sont séparées par gel filtration sur la même colonne (Superdex 200). Les protéines sont mesurées au cours de l'élution grâce à leur absorbance à 280 nm. (Figure 43A). Elles sont précipitées au TCA et séparées par SDS-PAGE avant transfert sur membrane de nitrocellulose. L'analyse des fractions avec le sérum anti-SoRPOT ;2 692-2P montre que la protéine cible élue vers 9 mL, correspondant à un complexe d'environ 670 kDa. Nous pouvons déjà conclure que, comme attendu, l'ARN polymérase n'est pas isolée sous forme de monomère dans les membranes. Ce volume d'élution concorde avec celui observé pour le grand complexe comprenant NIP. Les protéines SoNIP et SoRPOT ;2 éluent donc dans les mêmes fractions vers 9 mL.

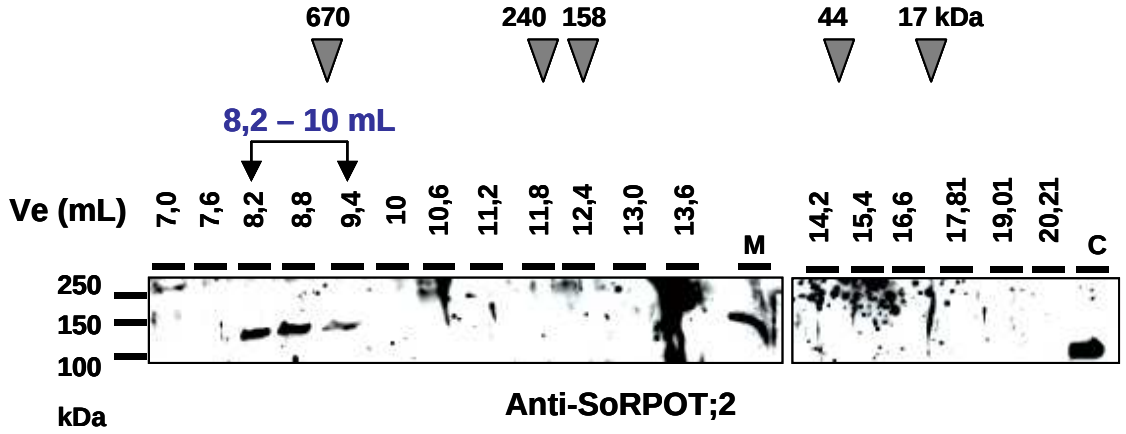


Figure 43 : Immunodétection de la protéine SoRPOT ;2 dans des extraits membranaires plastidiaux d'épinard solubilisés par chromatographie d'exclusion

L'équivalent de 400 µg de chlorophylle est déposé sur la colonne. Débit d'élution : 0,35 mL/min ; pression maximale : 1,5 MPa. ; volume des fractions: 600 µL. Les protéines de chaque fraction sont précipitées au TCA, puis séparés par SDS-PAGE. Les polypeptides sont transférés sur membrane de nitrocellulose et les protéines SoRPOT ;2 sont immunodétectés (sérum 692-2P, 1/500). L'étalonnage est indiqué par des flèches au dessus de l'immunoblot. M : membranes plastidiales ; C : chloroplastes. Ces résultats sont représentatifs d'une série de trois expériences indépendantes réalisées chez l'épinard.

Par conséquent, les protéines NIP détectées par le sérum SE582 ne sont pas présentes sous forme monomérique dans les membranes plastidiales d'épinard et d'Arabidopsis. Elles sont regroupées majoritairement dans des complexes de masse moléculaire proche de 150 kDa, ne contenant pas SoRPOT ;2. Par contre, les deux protéines NIP et SoRPOT ;2 sont détectées dans un complexe de plus haute masse moléculaire (environ 670 kDa) éluant vers 9 mL. Ce dernier par ailleurs paraît un peu moins abondant.

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

Nous allons maintenant tenter de comprendre pourquoi les protéines NIP sont réparties en deux complexes de masses moléculaires différentes. en nous focalisant sur l'analyse du complexe d'environ 150 kDa. L'organisation de ce complexe d'environ 150 kDa peut correspondre à plusieurs combinaisons possibles :

une protéine NIP, de 25 kDa, associé à une protéine proche de 125 kDa

un ensemble de petites protéines formant une structure de 150 kDa, mettant en jeu soit des partenaires différents, soit un homopolymère NIP.

Pour mieux caractériser les protéines associées à NIP, nous avons mis en place une méthode de pontage chimique des protéines *in organello*.

II.B.1.3 *Pontage protéique*

L'utilisation d'un agent pontant est délicate car le pontage doit refléter l'état et l'organisation des structures protéiques *in vivo*. Dans cette optique, nous avons donc choisi un agent pontant présentant toutes les propriétés requises et nécessaires pour une analyse de complexes associés aux membranes : le DSP ou Dithiobis-Succinimidyl Propionate (PERBIO ou PIERCE). Les membranes sont perméables à ce produit, permettant ainsi un pontage des protéines membranaires. De plus, cet agent présente deux bras de pontage très courts, de 12 Å, et ne peut donc former un pont qu'entre 2 protéines physiquement très proches. Il établit une liaison disulfide via ses groupements -NHS-ester réagissant avec les groupements amines primaires des protéines. Cette caractéristique est intéressante car cette liaison amide covalente est réversible en présence d'un agent réducteur tel que le ß-mercaptoéthanol ou le DTT. Nous pouvons donc ainsi vérifier la spécificité de la réaction.

Par conséquent, nous avons tout d'abord cherché à définir les conditions expérimentales optimales, soit les moins saturantes, afin de ne fixer que des interactions réelles et spécifiques.

La figure 44 présente les résultats d'immunodétection de SoNIP après pontage chimique de membranes plastidiales d'épinard. Les produits de réactions sont finalement dénaturés à 100°C dans un tampon de dépôt contenant (+) ou non (-) un agent réducteur (ici, le ß-mercaptoéthanol). Ils sont séparés par SDS-PAGE sur gel d'acrylamide avec gradient linéaire 5-15% (Figure 44A) et sur gel d'acrylamide 10% (Figure 44B), puis transférés sur membrane de nitrocellulose.

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

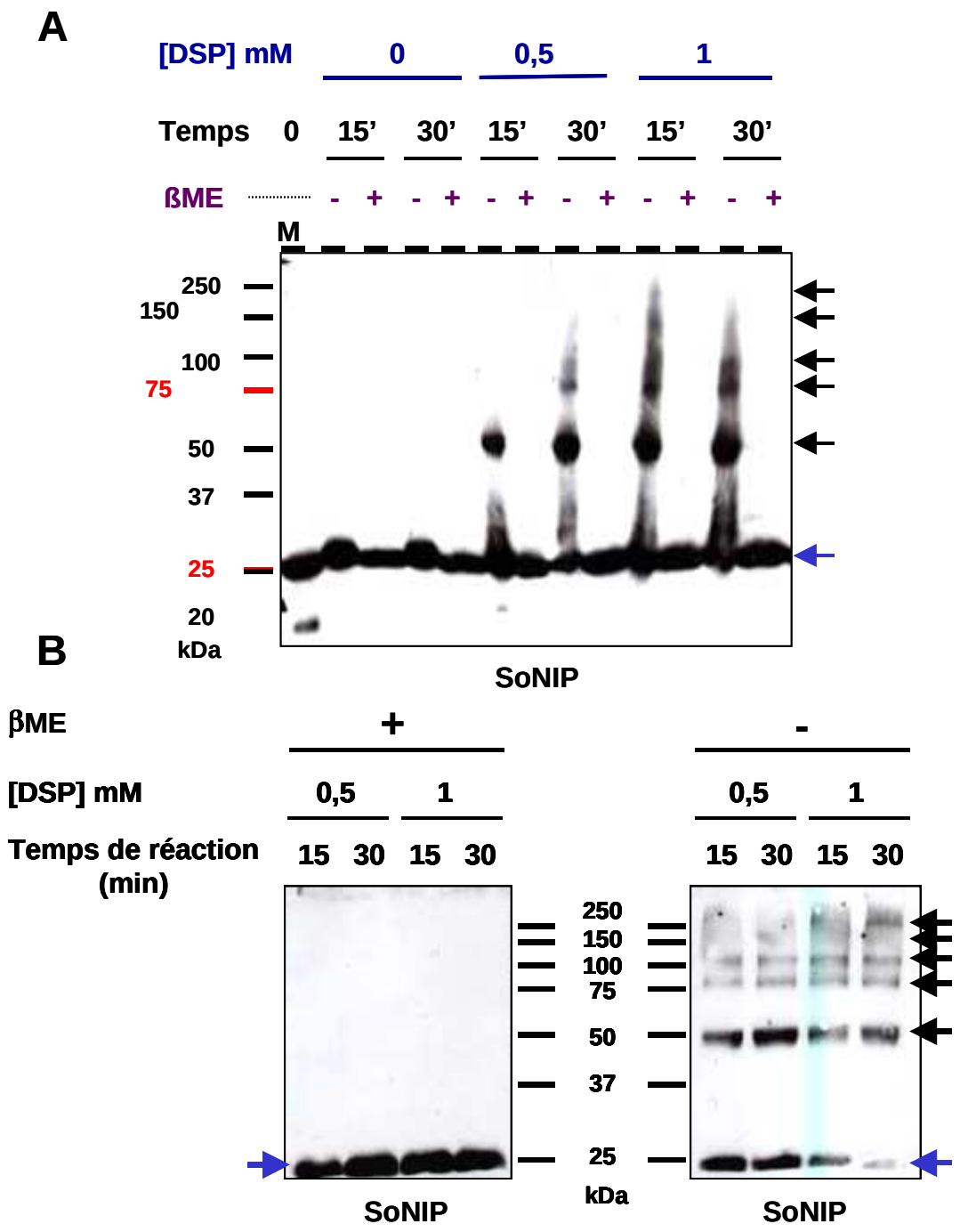


Figure 44: Analyse de SoNIP après pontage chimique des protéines des membranes plastidiales

Immunodétection des protéines SoNIP obtenue avec l'antisérum AtNIP1 SE582 (dilution 1/2000) sur des extraits membranaires de plastes pontés, transférés sur membrane de nitrocellulose après séparation par SDS-PAGE (dépôts équivalents à 4µg de chlorophylle sur A, gel dénaturant avec gradient linéaire 5-15% et B, gel dénaturant 10%). Les monomères NIP sont indiqués par des flèches bleues, et les différentes formes pontées de NIP par des flèches noires.

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

Plusieurs réactions ont été effectuées, en faisant varier les temps de réaction (0', 15' et 30') et la concentration finale de DSP (0 ; 0.5 et 1 mM). Les polypeptides SoNIP sont détectés avec l'antisérum SE582 AtNIP1. Nous vérifions que NIP est détecté dans les fractions membranaires (piste M, figure 44A) utilisées pour les réactions. Des réactions ont été menées en l'absence d'agent pontant afin de contrôler une éventuelle dégradation de SoNIP au cours du temps. Nous pouvons remarquer que la protéine n'est pas dégradée au cours de l'expérience (Figure 44A). Nous observons que l'utilisation de DSP dans nos conditions les plus limitées (0,5 mM DSP ; 15 min), le sérum SE582 révèle un complexe polypeptidique de masse moléculaire proche de 50 kDa. Au fur et à mesure que les deux paramètres, temps de réaction et concentration de DSP, augmentent, ces anticorps détectent d'autres complexes de masses moléculaires supérieures. Nous discernons par ailleurs, mieux les produits pontés à partir de la séparation sur gel d'acrylamide 10% (Figure 44B). Le pontage semble mettre en évidence l'apparition de complexes de masses moléculaires multiples de 25 kDa : 50, 75, 100, 150 (figure 44A, piste 1 mM- 15' ; figure 44B, piste 0,5 mM-30'), voire même 200 kDa (figure 44B, piste 1mM-30').Nous remarquons en parallèle, sur la figure 44B, une diminution des monomères SoNIP à 25 kDa. Les réactions de pontage effectuées sont spécifiques car les complexes de plus hautes masses moléculaires ne sont pas détectés dans les extraits dénaturés en présence de réducteur. Par ailleurs, nous n'avons pas observé la formation de complexes de très haut poid moléculaire. Nous n'avons donc pas utilisé des conditions saturantes : le pontage est limité. Des résultats semblables ont été également observés chez *A. thaliana*, confirmant ainsi que les protéines NIP, reconnues par le sérum SE582, peuvent s'oligomériser.

Le complexe majeur d'environ 150 kDa contenant NIP, identifié par gel filtration sur des extraits membranaires solubilisés d'épinard et d'Arabidopsis, pourrait alors correspondre à un homopolymère NIP intégré dans la membrane thylacoïdienne. Afin d'établir un modèle structural du complexe intégrant NIP dans les membranes, nous allons vérifier la capacité des protéines NIP à s'oligomériser par une autre approche que le pontage. Nous allons ainsi contrôler si les protéines NIP possèdent une propriété intrinsèque d'autoassemblage.

II.B.2 Propriétés d'oligomérisation des protéines NIP

Nos résultats montrent que le sérum SE582 anti-NIP peut réagir avec des complexes de masses moléculaires multiples de 25 kDa après un pontage chimique limité de membranes plastidiales. Ceci suggère une oligomérisation des protéines NIP chez l'épinard et *A. thaliana* que nous voulons mettre en évidence par une autre approche.

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

II.B.2.1 *Propriétés d'assemblage des protéines recombinantes*

Nous voulons vérifier si les protéines recombinantes présentent, de façon intrinsèque, des propriétés d'auto-assemblage. Cette expérience a été réalisée par P. Jaiswal.

Nous observons l'organisation des protéines AtNIP1 et AtNIP2 recombinantes en fonction de la température (Figure 45). Les extraits purifiés de bactéries exprimant une protéine NIP recombinante, ont été incubés 5 min à diverses températures (0°C, 25°C, 50°C, 70°C et 95°C). Les protéines sont alors séparées par SDS-PAGE. Les polypeptides recombinants sont détectés à l'aide d'un anticorps monoclonal dirigé contre une étiquette de six résidus histidines ajouté à la protéine d'intérêt. Si l'on se réfère au chapitre 2, ces IgG ne produisent aucune réaction sur des extraits de bactéries non induits. En fait, ils révèlent seulement un polypeptide de 25 kDa environ dans des échantillons induits, préalablement dénaturés à 100°C pendant 5 à 10 min. La figure 45A et B montre les signaux obtenus après deux temps d'exposition différents. Nous remarquons tout d'abord que l'antisérum $(His)_6$ reconnaît les polypeptides AtNIP1 et AtNIP2 monomériques à 25 kDa (Figure 45A et 45C). De plus, des produits de plus hautes masses moléculaires soit 50 kDa sont détectés dans les extraits bactériens exprimant AtNIP2. Cette observation suggère que les protéines AtNIP2 pourraient s'agglomérer pour former des oligomères. L'immunodétection réalisée sur la figure 45C, montre que le dimère NIP2 tend à disparaître avec l'augmentation de la température. La température peut donc influer sur la dissociation des oligomères AtNIP2 dans ces conditions expérimentales. Les protéines AtNIP1 dimérisent beaucoup moins dans ces conditions que les protéines AtNIP2, puisque nous distinguons à peine un signal à 50 kDa après une longue exposition sur la figure 45B. En conclusion, les protéines AtNIP2 possèdent la propriété intrinsèque de dimérisation et pourraient ainsi former des oligomères.

Les résultats présentés dans ce chapitre semblent indiquer que les protéines NIP, reconnues par le sérum SE582, et SoRPOT ;2 puissent co-éluer à partir d'extraits de membranes plastidiales solubilisées avec un détergent doux. Ces observations suggèrent que les interactions observées dans un contexte de levure en test double hybride pourraient se confirmer *in vivo*. D'autres approches devront être mises en place pour légitimer définitivement ces interactions NIP-RPOT ;2. Les éléments mis en évidence au cours de cette analyse biochimique nous permettent cependant de suggérer un modèle structural présentant l'organisation des protéines NIP et SoRPOT ;2, dans les membranes thylacoidïennes (Figure 46).

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

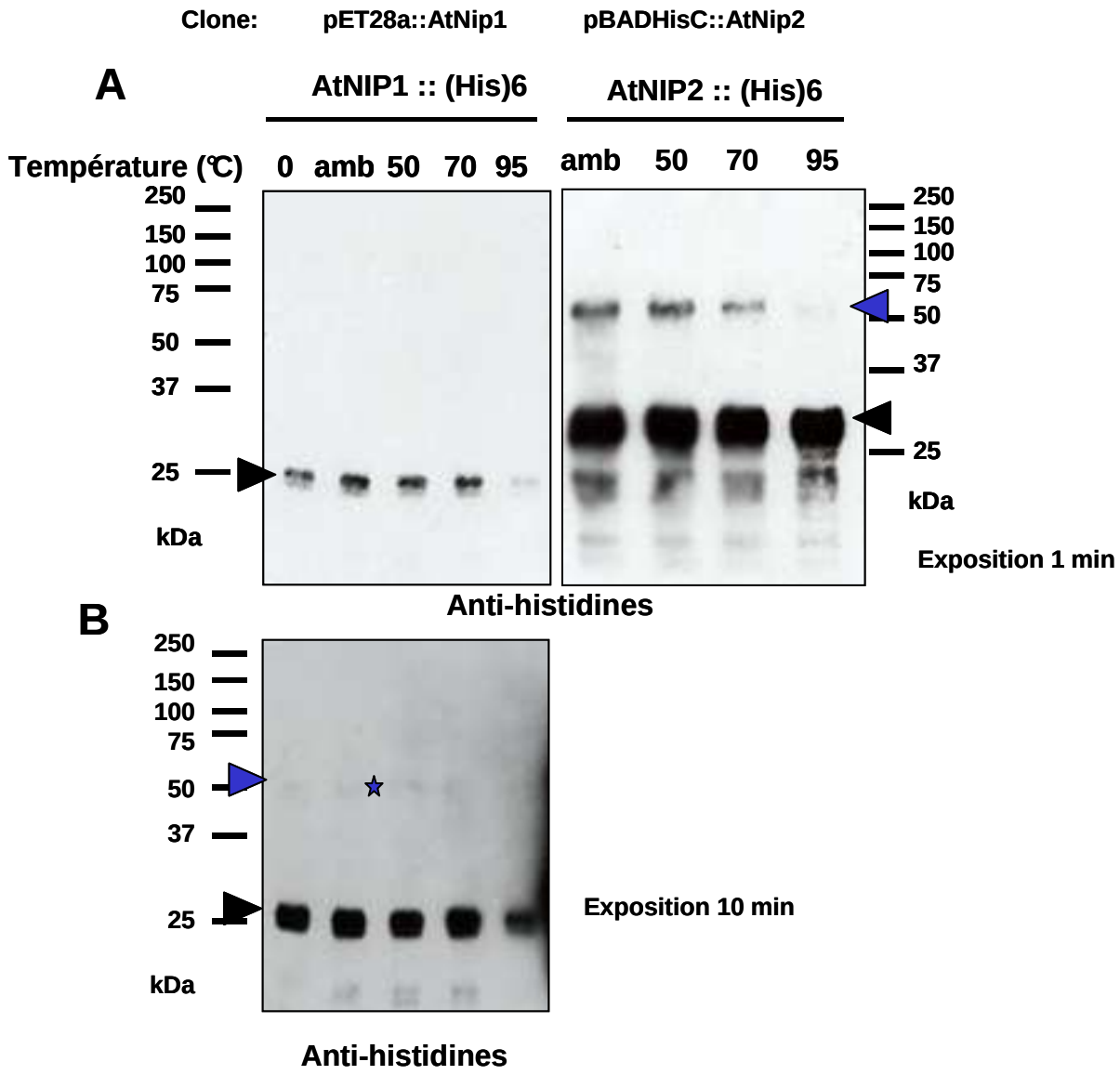


Figure 45 : Immunodétection des formes oligomériques des protéines AtNIP1 et AtNIP2 recombinantes

Les extraits bactériens (clones pET28a ::AtNIP1 et pBAD/HisC ::AtNip2) exprimant les protéines recombinantes NIP fusionnées à des étiquettes histidines sont purifiés sur colonne de nickel puis dialysées. Ils sont incubés à diverses températures (0°C, 25°C, 50°C, 70°C et 95°C) pendant 5 min avant d'être séparés par SDS-PAGE et transfert sur membranes de nitrocellulose. Les protéines NIP recombinantes sont ensuite révélées avec un anticorps monoclonal anti-histidine (1/3000). Les autoradiogrammes sont obtenus après 1min d'exposition (A) et 10 min d'exposition (B). Les flèches noires et bleues pointent respectivement les monomères et les dimères NIP.

Nous avons tout d'abord montré, par immunodétection dans des fractions subcellulaires, que les protéines NIP et SoRPOT ;2 sont localisées dans le chloroplaste. En outre, l'ARN polymérase SoRPOT ;2 n'est pas détectée dans les mitochondries chez l'épinard (résultats en cours de publication); contrairement à ce qui a été démontré chez Arabidopsis, par une approche de fusion de peptides N-terminaux à la GFP (Hedtke *et al.* 2000; Kabeya & Sato 2005). Une localisation plus fine dans le chloroplaste nous a permis de conclure que les protéines NIP et NEP plastidiales sont associées au compartiment membranaire, et notamment, associées aux thylacoïdes. Les protéines NIP présentent des

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

hélices transmembranaires prédites *in silico*, et leur intégration dans les membranes thylacoïdiennes a été confirmée expérimentalement par des lavages et des traitements à la thermolysine sur thylacoïdes intacts. Leur extrémité C-terminale, contenant le motif d'interaction protéine-protéine RING finger, est orientée vers le stroma. En revanche, les NEP ne contiennent apparemment pas de régions membranaires ou de motif d'attachement physique aux membranes prédit avec un bon score, via un partenaire de type sucre ou lipide.

Des traitements à la DNase effectués sur des membranes plastidiales d'épinard nous ont conduit à exclure un attachement des protéines NEP aux membranes via l'ADN plastidial. Dans ce cas, le partenaire protéique le plus probable serait les protéines NIP, identifiées selon un critère d'interaction avec la polymérase SoRPOT ;2 chez la levure. Des études effectuées sur les complexes associés aux membranes, séparés dans des conditions natives (chromatographie d'exclusion) semblent indiquer que NIP et SoRPOT ;2 co-éluent à un volume d'élution correspondant à des masses moléculaires voisines de 670 kDa. Ce résultat tend donc à confirmer l'interaction observée en test double hybride. Par ailleurs, NIP participe à l'organisation d'un complexe majeur plus petit, de 150 à 200 kDa. Ce dernier pourrait correspondre à un octamère des protéines NIP (Figure 46A). Le modèle structural proposé repose sur la détection de NIP dans deux complexes associés aux membranes thylacoïdiennes. Le premier complexe, plus petit, représente un octamère NIP intégré dans les thylacoïdes (Figure 46A). Nous ne pouvons pas exclure la participation d'autres protéines au complexe que NIP et NEP (Figure 46C). Le complexe d'environ 670 kDa pourrait résulter de l'association de 8 molécules NIP avec 4 molécules NEP (plus précisement SoRPOT ;2, figure 46B).

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

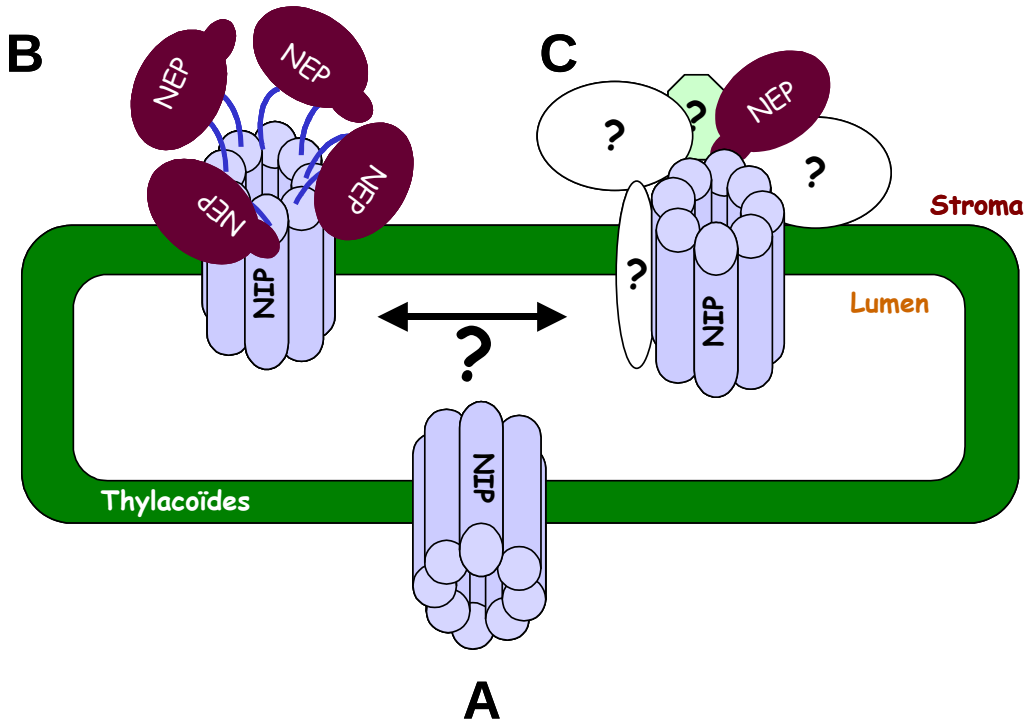


Figure 46: Modèle structural présentant l'assemblage NIP-NEP autour de la membrane thylacoïdienne

A : Modèle d'organisation du complexe membranaire intégrant NIP d'environ 150-200 kDa, noyau des complexes B et C. B et C : Modèles d'organisation du complexe NIP-NEP de masse moléculaire voisine de 670 kDa, avec un octamère NIP fixant 4 NEP (ici, SoRPOT ;2) à proximité des thylacoïdes (B) et un complexe NIP-NEP plus hétérogène comprenant une seule molécule NEP et d'autres protéines (C).

Ce modèle structural ne prend pas en compte SoRPOT ;3 car la détection de SoRPOT ;3 après gel filtration reste encore à définir. En outre, il n'indique pas le rôle de l'interaction de SoRPOT ;2 dans les membranes. Afin d'approcher l'aspect fonctionnel de cette interaction NIP-NEP dans les thylacoïdes, et de comprendre globalement le rôle de cette nouvelle famille de protéines, nous avons fabriqué des outils d'études génétiques, présentés dans le chapitre suivant.

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

CHAPITRE 5

Chapitre 5 : Caractérisation de mutants AtNip

Les protéines AtNIP sont détectées dans les chloroplastes et en particulier, dans les thylacoïdes. Leur accumulation est modulée par la lumière. Les protéines NIP intègrent un complexe thylacoïdien, rattachant probablement une NEP plastidiale aux membranes dans les choroplastes matures. Il reste maintenant à définir le rôle de ces protéines pour expliquer la fonction de ce complexe membranaire. Afin de rechercher cette fonction, nous avons produit des outils génétiques et débuté l'analyse des lignées mutantes présentant une expression dérégulée des gènes *AtNIP*.

I. Mutants d'insertion ADN-T

La génétique inverse permet de rechercher la fonction d'un gène interrompu par un ADN exogène : ADN-T (ADN de transert) ou transposon. Cette insertion peut éventuellement conduire à une extinction de l'expression du gène et entrainer ainsi une perte de fonction dans l'organisme. Il s'agit alors de mutant nul ou « knock out » (KO).

Etant donné que les séquences aminoacides des protéines AtNIP1, AtNIP2 et AtNIP3 sont très proches, nous supposons qu'elles pourraient présenter des fonctions redondantes, en particulier pour AtNIP1 et AtNIP2. Nous avons donc recherché des lignées transformées comportant une copie de l'ADN-T dans chacun des trois gènes *AtNIP1*, *AtNIP2* et *AtNIP3*, afin de produire des mutants multiples nuls pour l'expression d'au moins deux gènes. La probabilité d'insertion d'un ADN-T est liée à la longueur de la séquence réceptrice d'intérêt. Or les gènes *AtNIP* sont relativement petits, nous n'avons donc obtenu qu'une lignée mutante pour le gène *AtNIP1*, fournie par D.B. Stern, dans la collection du Wisconsin (http://www.biotech.wisc.edu/Arabidopsis), et une lignée mutante dans le gène *AtNIP2* dans la collection du Salk Institute (La Jolla, Californie, http://signal.salk.edu). Aucun mutant d'insertion intéressant, c'est à dire, comportant une ADN-T très proche ou dans les séquences codantes et introniques, n'a été mis en évidence à ce jour dans le gène *AtNIP3*.

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

I.A.1 Etude d'un mutant d'insertion d'ADN-T (AtNip1) dans le gène *AtNIP1*

I.A.2 Présentation du mutant AtNip1

Les premiers travaux de criblage et analyses de cette lignée mutante, issue de la collection du Wisconsin, ont été réalisés par Wirulda Pootakham dans l'équipe de DB Stern (Boyce Thompson Institute, Université de Cornell). Le site d'insertion de l'ADN-T est déterminé par séquençage à partir d'une amorce localisée dans la bordure gauche. Ce travail a montré que l'ADN-T est introduit dans le deuxième exon du gène AtNIP1, à 368 pb en aval de la première base du codon initiateur. De plus, la bordure gauche est orientée vers l'extrémité 3' du gène (figure 47). L'insertion de cet ADN exogène dans le gène *AtNIP1* est suivie au cours des générations par PCR, en utilisant un jeu de trois amorces. Un couple d'amorces est choisi dans le gène de part et d'autre du site d'insertion, de façon à amplifier spécifiquement l'allèle sauvage *AtNIP1* uniquement (amorce AtNIP1_5'UTR spécifique, voir figure 47). Un oligonucléotide situé sur la bordure gauche de l'ADN-T (JL202 ; figure 47), combiné avec une amorce sélectionnée en aval sur le gène, permet d'amplifier la jonction du gène *AtNIP1* avec la bordure gauche. Nous pouvons ainsi définir la présence de l'allèle muté du gène d'intérêt.

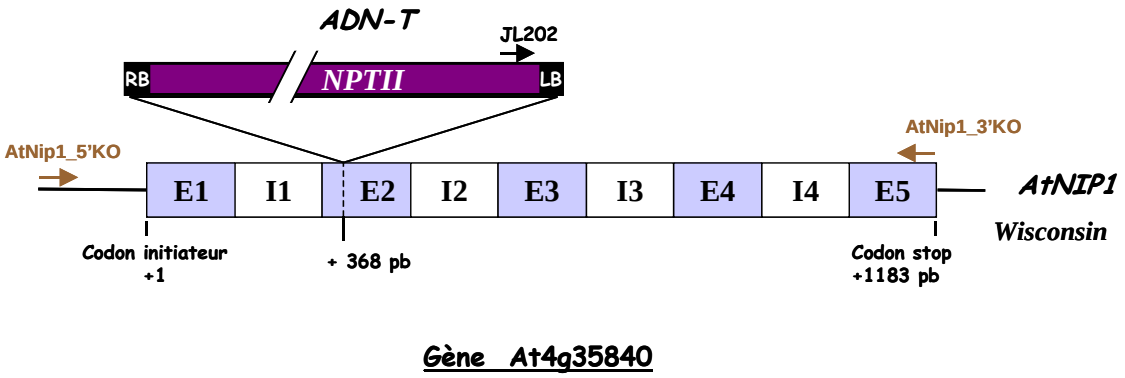


Figure 47 : Carte du gène AtNIP1 avec insertion d'ADN-T dans le mutant AtNip1

Le gène AtNIP1 est représenté de façon schématique, avec 5 exons (E, bleu) et 4 introns (I, blanc). L intégration de l'ADN-T est orientée par ses bordures droites et gauches (Right Border, RB et Left Border, LB respectivement). NPTII : gène codant la néomycine phosphoryl transférase II (NPTII), enzyme conférant une résistance à la kanamycine. Les amorces utilisées pour le criblage des mutants homozygotes sont positionnées par des flèches (tableau d'amorces en annexe)

I.A.2.1 *Isolement de plantes hétérozygotes et homozygotes*

Des graines da la génération T2 de la lignée mutante ont été semées sur milieu gelosé sélectif contenant de la kanamycine. Des analyses PCR et « Southern blot » (effectuées par

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

Wirulda Pootakham) réalisées sur l'ADN génomique de plantes résistantes a confirmé que certaines possédaient une copie de l'ADN-T dans le gène *AtNIP1*. Ces plantes peuvent également comporter 2 copies de l'ADN-T dans le génome. Nous avons donc sélectionné une plante hétérozygote (génération T4). Après un rétrocroisement, suivie d'une autofécondation de la génération descendante, nous observons une ségrégation de ¾ de plantules résistantes et ¼ de plantes sensibles à la kanamycine. Les plantules résistantes pour le gène *AtNIP1* comportent donc une seule insertion dans le gène *AtNIP1*. Nous avons sélectionné par criblage PCR une lignée homozygote pour l'insertion ADN-T dans le gène *AtNIP1*.

Il est cependant nécessaire de poursuivre ces croisements en retour pour éliminer toute mutation non détectable par une ségrégation à la kanamycine.

I.A.2.2 *Analyse moléculaire et phénotypique du mutant AtNip1*

Nous avons analysé l'accumulation des transcrits *AtNIP* dans la lignée homozygote et chez une plante sauvage par RT-PCR (figure 48). Un contrôle de la quantité et de la qualité des ADNc utilisés est obtenu an amplifiant les ADNc *APT1* ubiquitaires. Nous constatons tout d'abord , comme attendu, que les transcrits *AtNIP1* ne sont pas présents chez la plante homozygote. Le gène *AtNIP1* ne s'exprime donc pas. En revanche, les ARNm *AtNIP2* et *AtNIP3* sont détectés dans la lignée homozygote. La plante mutante homozygote (Hm : 84-1-7-1) pour l'insertion ADN-T dans le gène *AtNIP1* est donc bien un mutant nul.

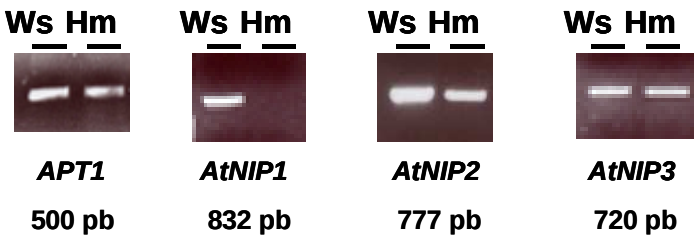


Figure 48 : Amplification par RT-PCR d'ADNc de la famille des gènes AtNIP chez une plante homozygote pour l'insertion d'ADN-T dans le gène AtNIP1

Les transcriptions inverses sont réalisées à partir de 2 µg d'ARN totaux extraits de feuilles de plantes sauvages, d'écotype Ws et homozygotes (Hm). Les ADNc AtNIP sont amplifiés par PCR (30 cycles, hybridation à 65°C) puis séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 1%-TBE 0,5X. L'amplification des transcrits APT1 sert de contrôle de charge (25 cycles, hybridation à 52°C). La taille des fragments est indiquée en bas (pb : paire de bases).

Malgré l'extinction du gène *AtNIP1*, nous n'observons pas de variations phénotypiques évidentes entre les plantes mutantes et sauvages. Comme les séquences primaires des protéines AtNIP sont très voisines, nous pouvons supposer que ces protéines ont une fonction redondante et que l'une d'elles compense l'absence de AtNIP1. Pour trouver un phénotype particulier, il faut le rechercher dans les mutants des autres gènes ou établir des mutants nuls multiples.

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

I.A.3 Etude du mutant d'insertion ADN-T dans le gène *AtNIP2*

I.A.4 Présentation du mutant

La lignée mutante d'insertion ADN-T dans le gène AtNIP2 a été disponible au laboratoire, les mutants provenant de la banque du Salk Institute. Les séquences nucléotidiques flanquant la bordure gauche ont été déterminées pour l'ensemble des lignées transformantes (http://www.signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress). L'insertion de l'ADN-T est localisée 45 pb en amont du codon initiateur du gène *AtNIP2*, avec la bordure gauche orientée vers l'extrémité 3' du gène (voir figure 49). L'insertion est suivie au cours des générations par PCR, comme décrit dans la partie précédente.

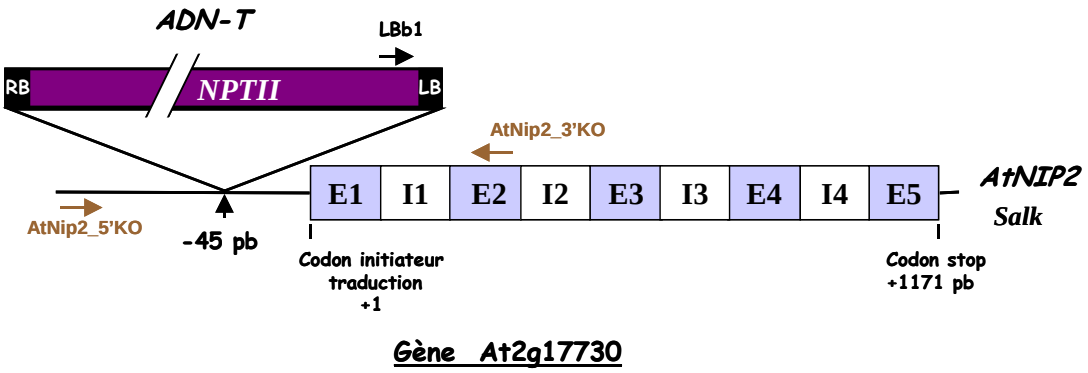


Figure 49 : Carte du gène AtNIP2 avec une insertion ADN-T dans le mutant AtNip2

Le gène AtNIP2 est représenté de façon schématique, avec 5 exons (E, bleu) et 4 introns (I, blanc). Les amorces utilisées pour le criblage des mutants homozygotes sont positionnées par des flèches (pour leur séquences, voir tableau d'amorces, annexes). RB : bordure droite ; LB : bordure gauche ; NPTII : gène codant néomycine phosphoryl transférase.

Nous avons disposé des graines de la génération T3 (lignée 137112). Quelques graines ont été semées sur terre et les plantes cultivées en salle de culture thermorégulée (voir matériel et méthodes). Un premier criblage par PCR à partir d'ADN génomique extrait pour chaque plante a mis en évidence, d'une part, l'existence de lignées hétérozygotes et homozygotes pour l'insertion ADN-T dans le gène *AtNIP2* ; et d'autre part, une insertion en tandem de deux copies ADN-T (figure 50A). Leurs bordures gauches sont dirigées vers l'ADN génomique (figure 50C). Une plante hétérozygote est utilisée pour réaliser un premier croisement en retour.

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

L'insertion de l'ADN-T étant située en amont de la séquence codante, il est nécessaire de contrôler que le gène *AtNIP2* n'est pas exprimé pour définir si ces mutants homozygotes présentent une perte de fonction.

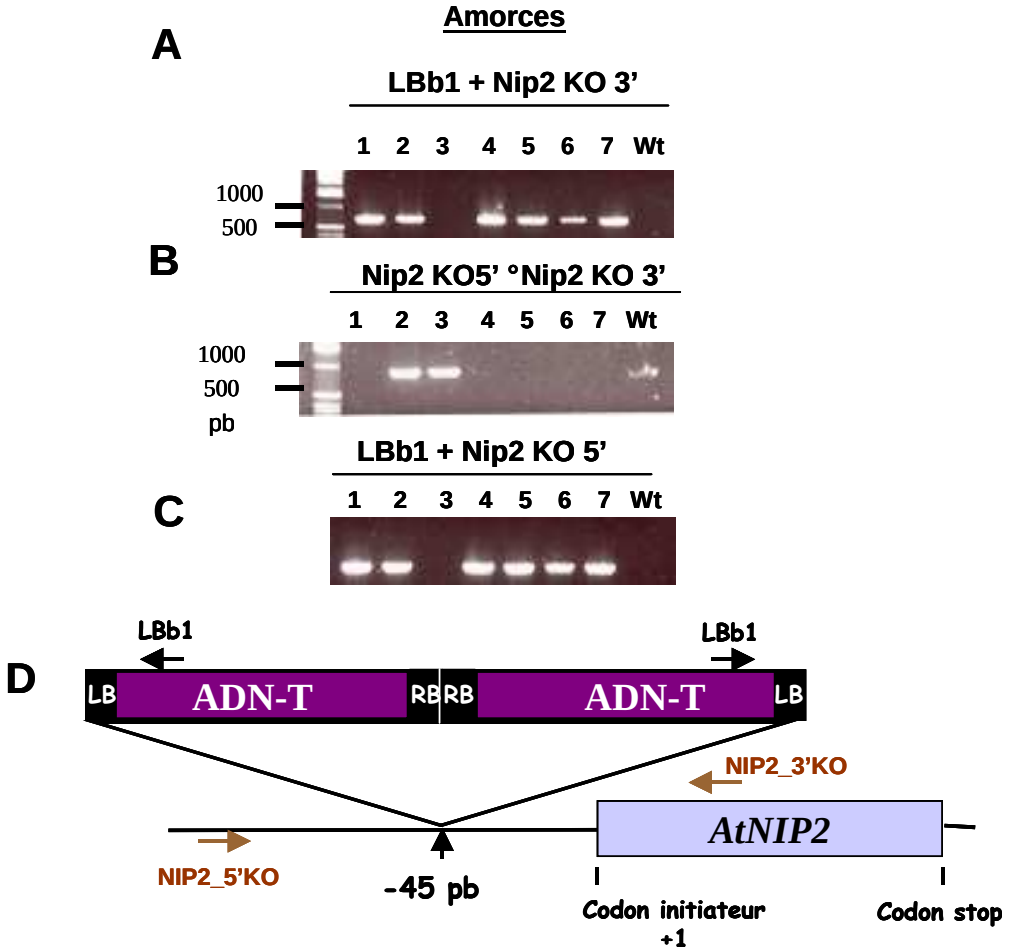


Figure 50 : Criblage des plantes mutantes d'insertion ADN-T dans le gène AtNIP2 par PCR

A : Amplicons correspondant à l'allèle muté produit avec le couple LBb1 (amorce indiquée en noire) et NIP2_3'KO ; B : amplicons correspondant à l'allèle sauvage AtNIP2 (amorces NIP2-5'KO et NIP2-3'KO, représentées en marron) ; C : allèle muté amplifié par le couple NIP2-5'KO et LBb1 ; D : représentation schématique de l'insertion en tandem de deux copies d'ADN-T dans le gène AtNIP2. L'ADN génomique est extrait à partir de feuilles de 7 plantes (numérotées 1 à 7) issues de la génération T3 et amplifié par PCR avec différentes paires d'amorces (40 cycles, hybridation à 55°C). Les produits amplifiés sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 1 % (p/v) –TBE 0,5X. Avec LB : bordure gauche ; RB : bordure droite.

I.A.5 Analyse moléculaire et phénotypique

Les plantes mutantes homozygotes semées sur terre ne présentent pas de phénotype évident. Nous avons cherché si le gène *AtNIP2* était transcrit dans cette lignée. Les ARN totaux sont extraits à partir de feuilles de deux lignées homozygotes. Les transcrits *AtNIP2* sont alors amplifiés par RT-PCR à l'aide d'un couple d'amorces spécifiques de la séquence codante *AtNIP2* (figure 51).

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

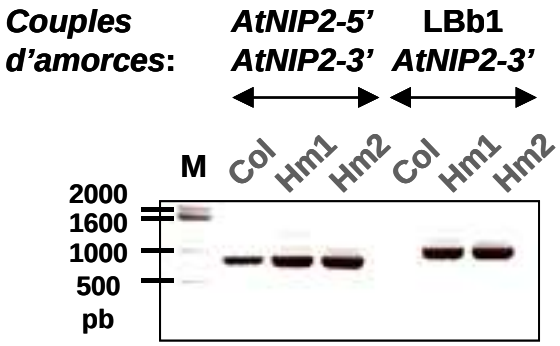


Figure 51 : Détection des transcrits AtNIP2 chez les plantes homozygotes par RT-PCR

Les ARN totaux extraits des feuilles de deux plantes homozygotes (Hm1 ou 112-1 ; Hm2 ou 112-2) et de plantes sauvage d'écotype Columbia (Col) sont amplifiés par RT-PCR (30 cycles ; hybridation à 55°C). Les produits amplifiés par les couples AtNIP2-5'/AtNIP2-3' (allèle sauvage) et LBb1/AtNIP2-3' sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 1% (p/v)-TBE 0,5X. M : marqueurs de taille standards (1 Kb Ladder, Invitrogen).

Un fragment de taille attendue pour l'ADNc AtNIP2, environ 700 pb, est amplifié chez les plantes sauvages (figure 51, piste 2) mais également chez les deux plantes homozygotes analysées (pistes 3 et 4). Ces plantes ne sont donc pas des mutants nuls. Nous avons cherché à définir l'origine de ce transcrit. Nous avons donc réalisé une seconde amplification RT-PCR en utilisant une amorce de la bordure gauche de l'ADN-T (LBb1), et un oligonucléotide situé en 3' du gène (AtNip2_3', voir tableau amorces en annexes 5) (figure 51). Nous constatons alors qu'un ADNc peut être généré à partir de l'amorce située dans la bordure gauche de l'ADN-T à partir des ARN totaux extraits à partir des plantes homozygotes (figure 51, pistes 6 et 7). Ce fragment est à la taille attendue, soit environ 1000 pb (l'amorce LBb1 utilisée dans l'ADN-T étant située 110 pb en amont de la bordure gauche). Il n'est, en outre, pas détecté chez la plante sauvage (figure 51, piste 5), il ne s'agit donc pas d'une amplification aspécifique. L'extrémité de l'ADN-T contient un promoteur 35S constitutif (provenant du virus de la mosaïque du chou fleur) à 900 pb environ, orienté vers la bordure gauche de l'ADN-T et qui peut éventuellement constituer un promoteur ectopique en amont du gène *AtNIP2* (voir annexe 6). Ceci pourrait être par conséquent à l'origine de ADNc amplifié à partir de l'amorce LBb1.

Au vu de ces résultats, il semble que les plantes homozygotes expriment un transcrit contenant la phase codante *AtNIP2*, initié probablement dans l'ADN-T. Nous ne savons pas encore si ce transcrit est en phase et peut produire une protéine complète ou non. Quoiqu'il en soit, le mutant d'insertion AtNip2 n'est pas un mutant nul.

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

La descendance d'une lignée homozygote est semée sur milieu gelosé contenant ou non de la kanamycine. Les plantules de 21 jours sont photographiées et présentées dans la figure 52.

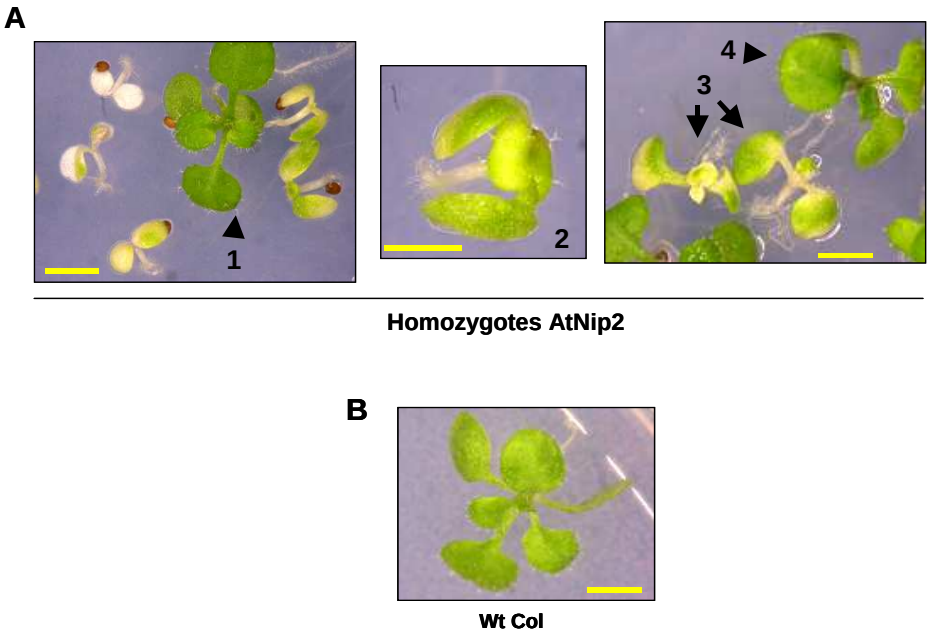


Figure 52 : Phénotype apparent de la lignée mutante par insertion ADN-T AtNip2

A : Plantules homozygotes AtNip, avec 1 et 4 : plantules ressemblant aux plantules sauvages ; et 2 et 3 : plantules présentant un retard de croissance et une dépigmentation. B : Plantule sauvage d'écotype Columbia (Wt Col) . Les plantules sont cultivées in vitro. Une barre jaune servant d'échelle (5mm) est représentée en bas de chaque photo.

Nous remarquons que sur milieu sélectif, la croissance des plantules n'est pas homogène (figure 52A). Un lot de plantules (figure 52A, types 1 et 4) ressemble à la plantule sauvage (figure 52B). D'autres plantules présentent, elles, un retard de croissance (figure 52A, types 2 et 3) évident, accompagné parfois d'une dépigmentation sur des régions bien localisées, Ces anomalies de retard de croissance et de dépigmentation disparaissent lorsque les plantes sont cultivées en l'absence de kanamycine (résultat non montré). Les plantules de la lignée homozygote analysée ne présentent donc pas de phénotype clair. Elles ressemblent au type 1 présenté sur la figure 52A (résultat non montré). Il est donc probable que la kanamycine perturbe le développement de ces mutants homozygotes.

Ces plantes mutantes AtNip2, exprimant un transcrit *AtNIP2* hybride et ne présentant pas de phénotype clair, ne sont pas utilisables pour des analyses fonctionnelles. Ne pouvant donc pas produire de mutants nuls multiples, nous avons donc développé une approche différente permettant de modifier simultanément l'expression des trois gènes *AtNIP1*, *AtNIP2* et *AtNIP3*.

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

II. Mutants exploitant le mécanisme d'ARNi (ARN interférence)

Les gènes *AtNIP* présentant une forte identité de séquence nucléotidique et protéique (chapitre 1), une redondance fonctionnelle peut masquer les effets de l'inactivation d'un seul gène de la famille. Nous avons donc choisi de fabriquer et débuter l'analyse des mutants susceptibles d'inactiver l'expression de plusieurs gènes *AtNIP* en exploitant le mécanisme d'ARNi (ARN interférence).

II.A. Mécanisme d'ARN interference

Nous avons construit des lignées mutantes susceptibles d'abaisser l'expression des gènes AtNIP : mutants « knock down ». Pour cela, il est possible d'exploiter et de détourner un mécanisme naturel de la plante, mis en place notamment dans la défense contre certains virus à ARN double brin (Baulcombe 2004 ; Waterhouse *et al.* 2001). Ce mécanisme constitue également une voie de contrôle post-transcriptionnel de l'expression génique (Waterhouse & Helliwell 2003). Les mécanismes impliqués dans ce phénomène mettent en jeu deux complexes Dicer et RISC et un ARN double brin délivré dans les cellules de la plante (Waterhouse & Helliwell 2003). Cette structure constitue une cible pour un complexe endonucléolytique (Dicer), libérant des petits ARN sous forme de séquences double brin de 21 à 25 nucléotides. Elles sont exploitées par le complexe RISC (« RNAi silencing complex ») afin de conduire une dégradation spécifique des séquences ARN identiques (exogènes ou endogènes), annulant ainsi l'expression du gène correspondant.

II.B. Production de la lignée mutante

Nous avons élaboré une construction, présentée sur la figure 53, destinée à produire un ARN double brin ectopique chez Arabidopsis. Un fragment d'ADNc *AtNIP2*, correspondant aux régions les plus conservées au sein de la famille *AtNIP*, est introduit en répétition inversée de part et d'autre de l'intron *TSA6* (sixième intron du gène *TSA* d'Arabidopsis) afin de produire après épissage *in vivo* un ARN double brin (figure 53B et 53C). Le fragment débute à la fin de l'exon 1 et se termine au niveau du codon stop (figure 53A). L'ADNc *AtNIP2* a été choisi car il est le plus similaire aux deux autres ADNc *AtNIP1*et *AtNIP3* (chapitre 1). Plusieurs régions de plus de 21 pb sont strictement identiques avec *AtNIP1*. Ces régions sont moins importantes avec *AtNIP3*. Nous espérons une extinction partielle d'au moins deux gènes.

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

La construction sur la figure 53B est produite dans un vecteur navette nommé IP-1 (pBluescript SKII (-) comportant l'intron 6 du gène *TSA1* cloné en 5'-SpeI / Xba-3') *E. coli*/Agrobacterium fourni par Dominique Pontier. Cette construction est ensuite insérée dans un plasmide binaire pBI121 (voir carte en annexes 5) et introduite chez *Agrobacterium tumefaciens*. La souche ainsi produite est alors utilisée pour transformer de façon stable des plantes adultes d'Arabidopsis (technique de l'immersion florale, voir matériel et méthodes).

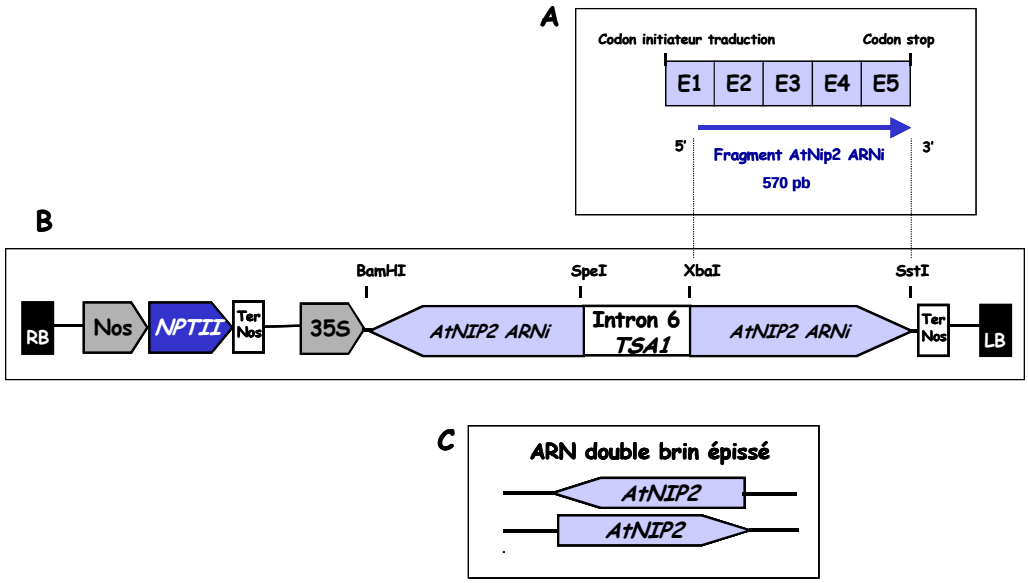


Figure 53 : Carte de la construction ARNi introduite chez A. thaliana

A : Carte du fragment ADNc AtNIP2 introduit (E : exons en bleu et I, introns en blanc). B : Carte de la région ARNi (ARN interférence) produite ; avec RB et LB : bordures droite et gauche respectivement, 35S : promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou fleur ; Nos : promoteur du gène codant la Nopaline Synthase ; TerNos : terminateur Nos ; TSA1 :gène codant la Tryptophane synthase 1 (chaîne alpha). C : ARN double brin produit in vivo après épissage. Les schémas ne sont pas à l'échelle.

II.C. Analyse moléculaire et phénotypique

L'expression du transgène et donc le mécanisme d'ARNi, peuvent être mis en place dés la génération T0 dans les plantes hétérozygotes pour l'ADN-T. Les graines transformées sont semées sur milieu gélosé sélectif (kanamycine) et cultivées *in vitro*.

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

Les plantules résistantes sont repiquées en terre au 21ème jour. La plupart des plantules résistantes présentent une anomalie du développement des racines par rapport aux plantules sauvages de même écotype (Columbia), même âge et cultivées dans les mêmes conditions (voir figures 54A et 54B).

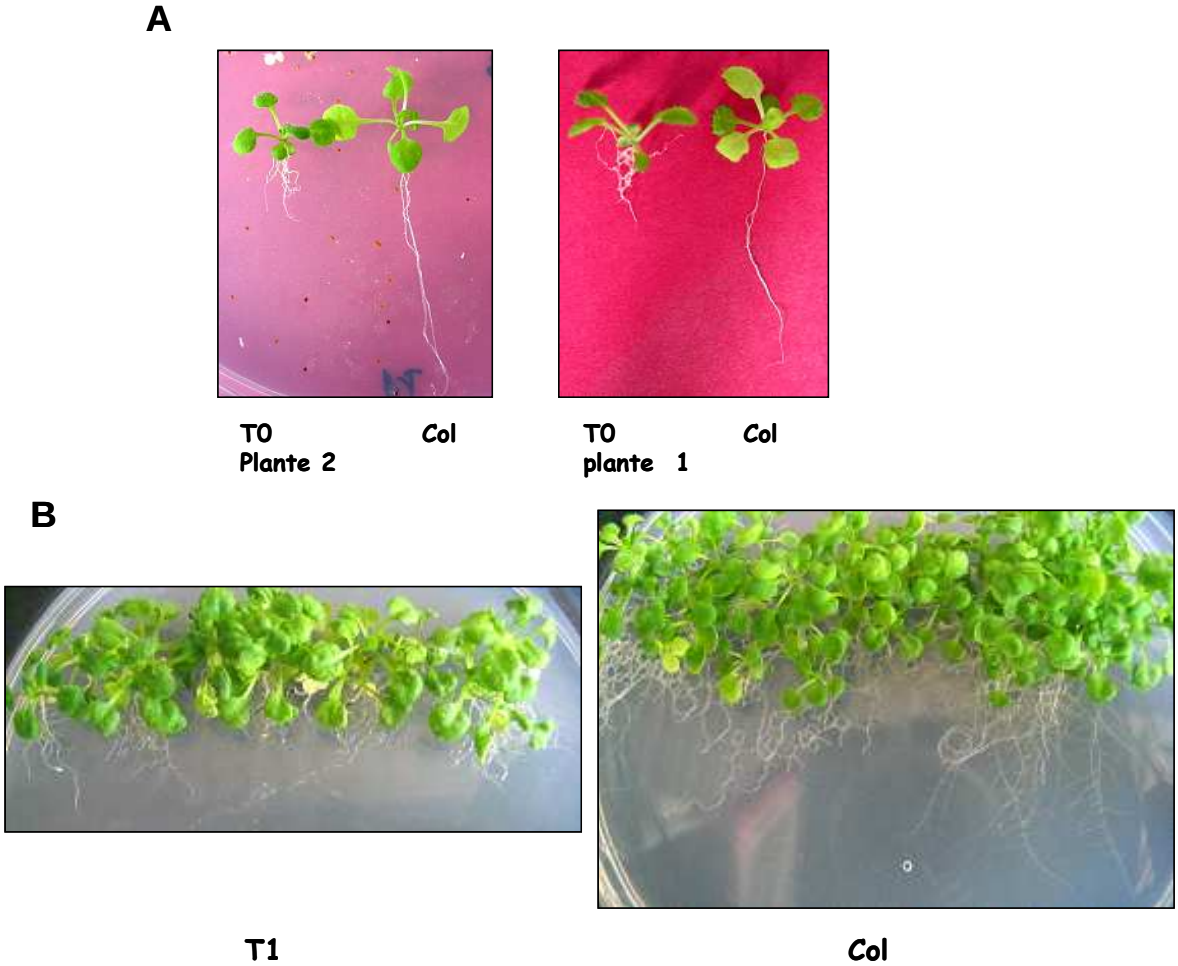


Figure 54 : Phénotype apparent des lignées ARNi Nip2 issues des générations T0 et T1

Les graines sont semées et cultivées in vitro sur milieu gelosé supplémenté en kanamycine. A: Plantes mutantes T0 et sauvages (Wt Col) isolées âgées 21 jours (j). B : photographies après 18 jours de croissance des plantes mutantes T1 et sauvages (Wt Col) présentées en semis dense.

Les racines des transformants sont plus courtes que celles des plantules sauvages, elles présentent en outre beaucoup plus de ramifications latérales. Cette observation est particulièrement visible sur les photographies des plantes T1 âgées de 18 jours prises sur boîte (figure 54B). Nous constatons que le phénotype observé en T0 est conservé chez la génération descendante T1. Ces variations phénotypiques sont-elles corrélées à une baisse des transcrits *AtNIP* ? Pour répondre à cette question, nous allons alors vérifier si l'ARNi s'est mis en place chez les transformants et ainsi tenter de corréler les variations phénotypiques observées à une

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

baisse des transcrits *AtNIP*. Nous avons alors analysé l'accumulation des transcrits *AtNIP* par RT-PCR semi quantitative. Les résultats sont présentés sur la figure 55, en utilisant les ADNc *APT1* constitutifs comme contrôles.

Figure 55 : Analyse de l'accumulation par RT-PCR des transcrits AtNIP chez une lignée transformante ARNi Nip2 T0

2 µg d'ARN totaux de feuilles sont amplifiés par RT-PCR en utilisant des amorces spécifiques de chaque ADNc AtNIP (30 cycles, hybridation à 65°C). Les ADNc sont alors séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 1% (p/v) contenant du BET. Les ADNc APTI, ubiquitaires et constitutifs, sont utilisés comme contrôles (25 cycles, hybridation à 52°C). Ces résultats sont représentatifs de deux lignées transformantes indépendantes présentant des racines courtes.

Nous constatons tout d'abord que tous les transcrits *AtNIP* sont détectés par RT-PCR chez les plantes sauvages et mutantes. Néanmoins, les transcrits *AtNIP1* et *AtNIP2* s'accumulent moins dans le transformant T0 analysé que dans la plantule sauvage (figure 55). Il semble donc que l'interférence des ARN ait été mise en place, conduisant à une réduction sensible de la quantité d'ARNm *AtNIP1* et *AtNIP2*. En revanche, les ADNc *AtNIP3* s'accumulent plus dans les plantes transformantes T0 analysées que dans les plantules sauvages. Ces résultats suggèrent que les transcrits de la famille *AtNIP* sont co-régulés au niveau post-transcriptionnel, puisque l'analyse des messagers réalisée chez le mutant nul *ΔAtNIP1* ne révèle aucune accumulation des transcrits *AtNIP3* par rapport au témoin sauvage. L'accumulation des protéines reste encore à analyser.

Nous ne pouvons pas exclure que le phénotype observé dans ces mutants sous exprimant *AtNIP1* et *AtNIP2* soit dû à l'accumulation des messagers *AtNIP3*. Nous avons donc cherché à comparer avec le phénotype de mutants surexprimant l'un des gènes *NIP*.

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

III. Mutants surexpresseurs des gènes At*NIP*

III.A. production des lignées mutantes

Nous avons produit des constructions susceptibles de surexprimer les séquences codantes des gènes AtNIP1, AtNIP2 et AtNIP3. Les ADNc sont introduits dans un plasmide binaire, pFP101, permettant une sélection directe des graines T0 transformées sous lumière bleu, grâce à la fluorescence émise par un rapporteur GFP (voir figure 56 et annexe 5). Ce gène rapporteur est sous contrôle d'un promoteur spécifiquement exprimé dans les graines. Ainsi les plantes transformées peuvent être sélectionnées chez les graines T0 transformées, avant semis.

Figure 56: Carte de la région introduite chez A. thaliana en vue d'obtenir des mutants surexprimant AtNIP1, ou AtNIP2 ou AtNIP3

L'ADNc entier AtNIP1, ou AtNIP2 ou AtNIP3 (représenté en bleu) est introduit dans le vecteur pFP101 (http://www.isv.cnrs-gif.fr/jg/alligator/vectors.html). Les promoteurs sont représentés en gris (promoteurs At2S3, promoteur du gène codant une protéine de stockage dans la graine, l'isoforme 3 albumine 2S ; promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou fleur) ; et les terminateurs en blanc (terminateur de la Nopaline synthase Nos, et terminateur 35S du virus de la mosaïque du chou fleur). RB : bordure droite de l'ADN-T ; LB : bordure gauche de l'ADN-T ; AtNIP : séquence codante AtNIP1 ou AtNIP2 ou AtNIP3.

Trois lignées de transformants sont obtenues pour chacun des gènes AtNIP :

la lignée Nip1 SE pour *AtNIP1 ;*

Nip2 SE pour *AtNIP2 ;*

et Nip3 SE pour *AtNIP3.*

III.B. Phénotypes apparents des plantes transformées : observations préliminaires

Nous ne disposons que de résultats phénotypiques préliminaires pour les transformants *AtNIP1* et *AtNIP3*. Nous ne présentons dans les figures 57 et 58 que quelques transformants les plus représentatifs de la population sélectionnée, à différents stades du développement.

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

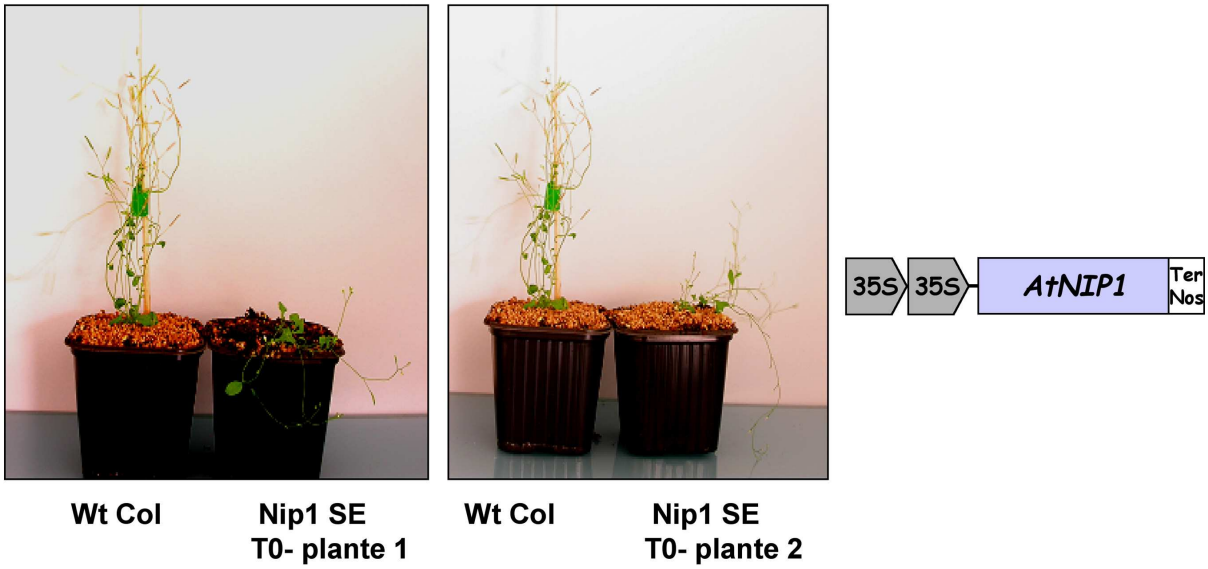


Figure 57 : Phénotypes des transformants T0 pour la lignée Nip1 SE

Les graines transformées sont sélectionnées sous lumière bleue grâce au rapporteur GFP. Elles sont semées sur milieu gelosé, cultivées in vitro puis repiquées en terre. Les plantules sauvages (à gauche) et plantules T0 transformées (à droite) photographiées sont âgées de 36 jours.

La figure 57 montre des plantules agées de 36 jours. Ces plantules semblent présenter un retard de croissance par rapport à la plantule sauvage. Ce retard est observé tout au long du développement, ainsi, les plantes sauvages présentent des siliques commençant à sécher, alors que les plantes transformées T0 comparées atteignent juste le stade de floraison. De plus, ces dernières sont généralement moins ramifiées et plus petites.

La figure 58 présente des plantules de la lignée Nip3 SE, âgées de 18 jours. Nous remarquons que les racines des plantules T0 à 18 jours sont plus courtes et plus ramifiées que celles des plantules sauvages. Par ailleurs, nous pouvons également observer que les feuilles paraissent plus grandes. Ce phénotype rappelle celui des mutants ARNi, accumulant plus de transcrits *AtNIP3* que dans la plante sauvage. Ces transformants T0 comportent des modifications morphologiques retrouvées assez largement pour une même lignée transformée T0. Ceci peut suggérer des perturbations dans le profil d'expression des gènes *AtNIP*. Le criblage des mutants surexprimant *AtNIP2* et les analyses moléculaires par RT-PCR seront réalisées prochainement. Elles permettront éventuellement de relier les phénotypes observés à des variations d'expression des gènes *AtNIP*.

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

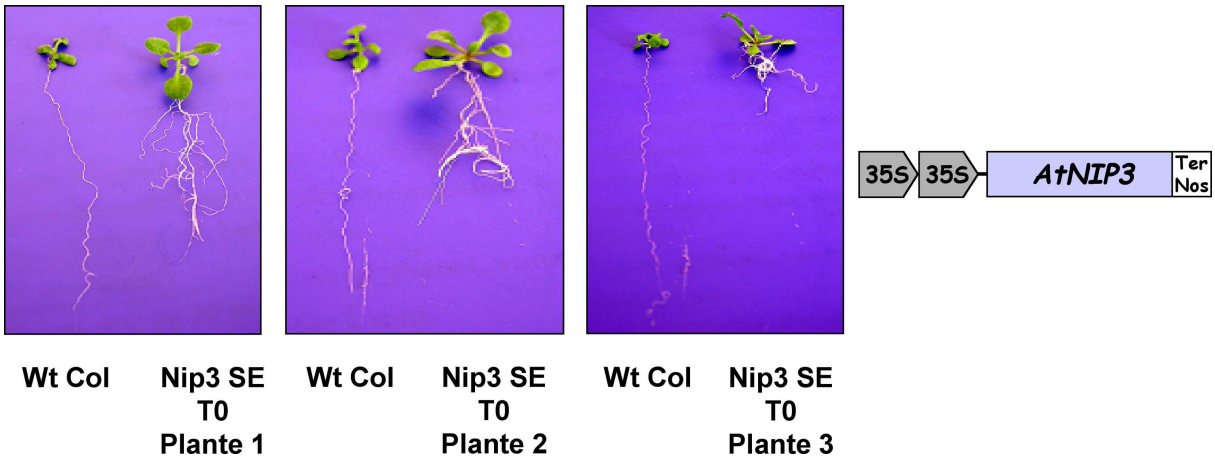


Figure 58 : Phénotypes des transformants T0 pour la lignée Nip3 SE

Les graines transformées sont sélectionnées grâce au rapporteur GFP. Elles sont semées sur milieu gelosé et cultivées in vitro. Les plantules sauvages (Wt, écotype Columbia, ou Col) et trois plantules transformées issues de la génération T0, présentant des anomalies de développement des racines, sont photographiées après 18 jours de croissance.

Ce retard de croissance des racines, observé chez les lignées mutantes ARNi Nip2 et Nip3 SE est probablement lié à une surexpression du transcrit *AtNIP3.* La lignée Nip1 SE présente un retard de développement tout au long de la vie de la plante par rapport aux plantes sauvage. Nous pouvons souligné que le mutant nul d'insertion ADN-T dans le gène *AtRPOT ;2* caractérisé par Baba K *et al* (Baba *et al.* 2004) présente également un retard de croissance. Ils ont isolé ce mutant au cours d'un criblage de mutants possédant des anomalies du développement des racines. L'expression de certains gènes plastidiaux dans le mutant semble être diminuée par rapport aux plantules sauvages. En revanche aucune variation significative n'a été mise en évidence pour les gènes mitochondriaux. Nous disposons également de mutants d'insertion ADN-T homozygotes dans le gène *AtRPOT ;2,* obtenus et caractérisés après trois croisements en retour consécutifs par A. Cottet et R. Mache. Une analyse plus approfondie de l'ensemble de ces mutants Nip et Nep d'Arabidopsis, par une approche de puce à ADN contenant des sondes spécifiques des gènes plastidiaux, pourraient aider à mieux définir le rôle des protéines NIP vis à vis de la polymérase RPOT ;2. La mise au point de cette technique est en cours de développement au laboratoire.

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

DISCUSSION ET CONCLUSION

DISCUSSION, CONCLUSION ET PERSPECTIVES

DISCUSSION

La famille de protéines AtNIP a été identifiée par une interaction avec l'ARN polymérase SoRPOT ;2, définie par un test double hybride chez la levure. Ce crible a été effectué dans l'objectif d'isoler des facteurs de spécificité des ARN polymérases de type phagiques organellaire chez *A. thaliana*. Nous avons donc cherché à caractériser d'un point de vue structural et fonctionnel les protéines de cette nouvelle famille.

Analyse bioinformatique des séquences primaires des protéines NIP

Nos travaux ont montré que les protéines AtNIP sont présentes uniquement chez les végétaux supérieurs. Elles sont particulièrement similaires, et organisées en trois blocs. Ainsi, la région N-terminale présente une séquence d'aminoacides ressemblant à des séquences d'import vers le chloroplaste (AtNIP2) et vers la mitochondrie (AtNIP1). Le bloc central des protéines AtNIP est très riche en résidus hydrophobes, s'arrangeant probablement en hélices transmembranaires. Les protéines NIP comportent, en outre, dans la région C-terminale, un motif d'interaction protéine-protéine, de type RING finger, qui pourrait être à l'origine de l'interaction avec l'ARN polymérase monomérique observée chez la levure. En effet, une analyse récente des protéines à motif RING annotées et non caractérisées chez Arabidopsis a mis en évidence que la région C-terminale des protéines AtNIP présente bien tous les critères requis pour former une structure RING finger (Stone *et al.* 2005).

Les facteurs possédant des motifs RING finger ont été jusqu'ici, uniquement caractérisés dans les compartiments nucléaires, cytosoliques et dans les membranes des peroxysomes. Ils sont généralement impliqués dans certains processus de régulation de protéines cibles tels que la régulation de l'activité d'un facteur de transcription grâce à l'ajout d'une ou plusieurs ubiquitines, ou bien la stabilité des ribosomes (Conaway *et al.* 2002; Spence *et al.* 2000). Les protéines RING finger participent également au renouvellement des protéines via une dégradation spécifique faisant intervenir le protéasome. (Freemont 2000). Chez les végétaux, la protéine COP1 (Constitutive Photomorphogenic 1) est impliquée dans le mécanisme de dégradation spécifique par le protéasome et contrôle la transition entre le développement à l'obscurité (skotomorphogenèse) et le développement à la lumière (photomorphogenèse). Il semble maintenant admis par la communauté scientifique que le

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

système de dégradation spécifique ubiquitine dépendant du protéasome n'est pas présent dans les chloroplastes. La séquence RING finger des protéines NIP est donc probablement mise en jeu dans d'autres phénomènes de reconnaissance protéique. Les résultats de l'analyse bioinformatique des protéines NIP sont également surprenants dans la mesure où la séquence primaire ne montre aucun domaine conservé de liaison à l'ADN. Il est donc peut probable que les protéines NIP soient des facteurs de transcription *sensu stricto*. Les facteurs de transcription capables d'interagir avec l'ADN mis en évidence dans les organites sont peu nombreux. Seuls deux facteurs de transcription organellaires ont été mis en évidence par des approches biochimiques : CDF2 chez le chloroplaste d'épinard et p63 chez la mitochondrie du blé (Bligny *et al.* 2000; Ikeda & Gray 1999a). Cependant, leur action semble très ciblée et limitée à l'expression d'un seul gène, respectivement l'opéron ADNr et le gène *cox2*. En revanche, il a été démontré récemment que les ARN polymérases des mitochondries de levures et de mammifères reconnaissent spécifiquement les séquences promotrices (Gaspari *et al.* 2004a; Matsunaga & Jaehning 2004b) et peuvent initier seules une transcription efficace *in vitro* si la matrice est partiellement ouverte (Matsunaga & Jaehning 2004a; Matsunaga & Jaehning 2004b). Les facteurs de type TFA et /ou TFB, associés à la polymérase mitochondriale pour constituer l'holoenzyme fonctionnelle, interviennent uniquement dans le positionnement de l'ADN et l'ouverture de la double hélice. Aucun facteur de type TFA et/ou TFB n'a été à ce jour identifié dans les chloroplastes ou les mitochondries de cellules végétales.

Les protéines NIP sont localisées et exprimées dans les plastes

Les analyses d'expression des gènes *AtNIP* ont montré que les transcrits sont détectés de façon ubiquitaire dans la plante et au cours de son développement. Leurs profils d'accumulation présentent cependant quelques spécificités. Ainsi, les transcrits *AtNIP1* sont les moins abondants, de plus ils s'accumulent préférentiellement dans les organes ou tissu non exposés à la lumière. Il faut par de plus noter que cette dernière observation peut être commune à beaucoup de protéines mitochondriales. Les messagers *AtNIP2* sont plutôt détectés dans les feuilles et dans les organes reproducteurs. Les profils d'accumulation des ARNm *AtNIP3*et *AtNIP4* sont complémentaires au cours du développement. Alors que *AtNIP4* est observé majoritairement dans les stades précoces et tardifs du développement, les messagers *AtNIP3* s'accumule préférentiellement au cours de la croissance de la plante. Ce dernier est également particulièrement abondant dans les racines.

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

Nous avons également mis en évidence que l'accumulation des protéines NIP est influencée par la lumière. En effet, elles sont retrouvées uniquement dans les organes aériens, et à partir du 2ème jours de croissance, soit dès que les cotylédons apparaissent. De plus, l'accumulation des protéines NIP est induite dans des plantules étiolées incubées 24 h dans des conditions de cycle « jour long » (photopériode 16h lumière/8h obscurité).

Les protéines NIP et NEP sont colocalisées dans les plastes

Nous avons préparé et caractérisé chez l'épinard et chez Arabidopsis des anticorps spécifiques des protéines NIP et des polymérases NEP. Chez Arabidopsis comme chez l'épinard, les protéines NIP ont été localisées par immunodétection après fractionnement cellulaire et suborganellaire dans la membrane des thylacoïdes. Par protéolyse ménagée de la surface des membranes, nous avons également déterminé la topologie de l'insertion des protéines NIP dans ces membranes. L'extrémité C-terminale des protéines fait protrusion dans le stroma alors que l'extrémité N-terminale est probablement dirigée vers le lumen, la membrane thylacoïdienne étant traversée par les trois hélices transmembranaires potentielles. Les expériences de chromatographie d'exclusion après solubilisation des membranes thylacoïdiennes montrent que les protéines NIP s'oligomérisent dans la membrane, probablement sous forme d'octamères.

La localisation subcellulaire des polymérases NEP dans les cellules végétales est encore actuellement controversée. En utilisant des plantes d'Arabidopsis transformées exprimant le gène rapporteur GFP en fusion traductionnelle avec la région N-terminale des polymérases NEP, il a été montré que AtRPOT ;3 est adressée au plaste alors que AtRPOT ;2 est adressée aux deux compartiments, mitochondrial et plastidial (Hedtke *et al.* 1997; Hedtke *et al.* 1999a). Des résultats plus récents, utilisant la même approche de fusion transcriptionnelle incluant cette fois une partie de la région 5' non traduite de la polymérase AtRPOT ;2 indiquent un import mitochondrial exclusif chez la mousse *Physcomitrella pattens* et chez *A. thaliana* (Kabeya & Sato 2005). En outre, dans le mutant d'Arabidopsis nul pour le gène *AtRPOT ;2*, aucune variation significative de l'accumulation des transcrits mitochondriaux n'a été mise en évidence (Baba *et al.* 2004). Seule la transcription plastidiale semble être affectée. Ces observations ne concordent pas avec une localisation de RPOT ;2 dans les mitochondries. Par ailleurs, des expériences menées au laboratoire avec des protéines de fusion NIP-GFP et SIG4-GFP montrent que la localisation *in planta* grâce à des fusions traductionnelles avec un gène rapporteur fluorescent, réalisées chez le tabac ou chez Arabidopsis, est parfois source d'artéfacts. La construction hybride introduite est sous

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

contrôle d'un promoteur fort et constitutif, ne correspondant pas aux conditions d'expression du gène d'intérêt. Le métabolisme et la physiologie de la cellule végétale sont alors très souvent perturbés par la transformation transitoire ou stable.

Nous avons donc choisi une approche différente pour lever cette contradiction. Nos résultats montrent très clairement par immunodétection sur des fractions subcellulaires et subplastidiales purifiées que, comme les protéines NIP, SoRPOT ;2 et SoRPOT ;3 sont exclusivement localisées dans le chloroplaste.

De plus, nous avons montré que les ARN polymérases NEP plastidiales sont préférentiellement associées aux compartiments membranaires de l'organite. Les NEP plastidiales d'épinard sont rattachées aux thylacoïdes, SoRPOT ;3 pouvant être également associée à l'enveloppe. Ce résultat est original et constitue la première démonstration biochimique de l'association des NEP aux membranes. Jusqu'à présent, aucune des études systématiques des protéomes des organites et de leurs sous-compartiments par séquençage peptidique n'a jamais réussi à déceler les NEP (Friso *et al.* 2004; Kleffmann *et al.* 2004; Kruft *et al.* 2001; Peltier *et al.* 2002). Il est donc probable que le nombre de molécules de NEP dans le chloroplaste est situé sous le seuil de détection de cette technique.

Dans certaines conditions expérimentales, une lyse des chloroplastes permet l'obtention de deux fractions transcriptionellement actives et présentant des affinités différentes pour l'ADN :d'une part une fraction associée aux membranes, capable de transcrire des ARN sans ajout de matrice exogène et fortement liée à l'ADN , le TAC, « Transcriptionnally Active Chromosome » et d'autre part une fraction soluble, moins affine (Krause K & Krupinska K 2000).

Parmi les protéines impliquées dans la transcription du plastome, seule la sous unité α de l'ARN polymérase multimérique PEP a été identifiée dans les TACs par immunodétection (Suck *et al.* 1996). Ceci n'exclut cependant pas la présence des NEP puisqu'aucune immunodétection sur des extraits purifiés de TACs a été réalisée. Des traitements à la DNase I effectués sur des membranes plastidiales contenant les polymérases NEP ont montré que l'association des NEP aux membranes ne reposait pas sur une liaison à l'ADN plastidial. Nos résultats infirment donc l'hypothèse généralement admise selon laquelle les polymérases sont associées aux membranes uniquement par l'ADN.

Les facteurs NIP sont par conséquent localisées dans le même sous compartiment que l'ARN polymérase SoRPOT ;2. Il faut noter que la séquence primaire des ARN polymérases NEP ne contient ni séquence transmembranaire potentielle, ni motif apparent de rattachement physique aux membranes (ajout d'un groupement lipidique ou de sucres, zone riche en acides

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

aminés hydrophobes). L'association des polymérses NEP aux membranes plastidiales implique donc un ou plusieurs partenaires protéiques. Nous avons voulu vérifier si NIP participait à ce complexe protéique.

Les protéines NIP et NEP sont associées dans la membrane des thylacoïdes.

Nous avons analysé par immunodétection les protéines solubilisées à partir des fractions membranaires plastidiales en conditions natives. Des complexes protéiques ont été solubilisés par un détergent doux et non ionique, puis séparés selon leur masse moléculaire apparente par chromatographie d'exclusion. Les polypeptides NIP participent à deux complexes : un complexe majeur de masse moléculaire apparente voisine de 150-200 kDa et un complexe de masse moléculaire voisine de 670 kDa. La polymérase SoRPOT ;2 est exclusivement éluée avec les protéines NIP dans les fractions correspondant au complexe d'environ 670 kDa,. Bien que ces fractions ne soient pas pures, cette observation conforte l'idée, *in planta*, d'interaction physique NIP-NEP observée chez la levure. Ces deux expériences indépendantes tendent donc à confirmer l'existence d'une interaction NIP-SoRPOT ;2. Par ailleurs, le complexe d'environ 150-200 kDa implique sans doute des oligomères NIP éventuellement associés à d'autres facteurs encore inconnus. Ces résultats nous conduisent à proposer deux modèles structuraux hypothétiques définissant l'organisation des protéines NIP et SoRPOT ;2 dans les membranes thylacoïdiennes (Figure 59 et Figure 40). Des complexes d'environ 150-200 kDa, comprenant des oligomères NIP, sont intégrés dans la membrane des thylacoïdes. Une partie de ces complexes est organisée au sein d'un complexe plus grand, de masse moléculaire supérieure à 670 kD, incluant une ou plusieurs molécules de l'ARN polymérase SoRPOT ;2 ainsi, éventuellement, que d'autres partenaires non identifiés. D'après la taille finale du complexe NEP-NIP (voisine de 670 kDa), SoRPOT ;2 pourrait en effet exister sous forme d'homotétramères (masse moléculaire voisine de 480 kDa). Les interactions NIP-SoRPOT ;3 restent encore à vérifier.

Modèle fonctionnel de l'association NIP-NEP

Nos résultats bouleversent le modèle fonctionnel généralement admis selon lequel la polymérase NEP s'associe avec l'ADN pour la transcription, la localisation membranaire des ARN polymerases étant due à l'association de l'ADN aux membranes. Deux hypothèses peuvent être envisagées pour expliquer le fonctionnement de la polymérase RPOT ;2 chez l'épinard.

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

Tout d'abord, le rattachement physique des ARN polymérases de type phagique aux membranes du chloroplaste pourrait s'inscrire dans une coordination de la transcription, la maturation des messagers et la traduction. Cette hypothèse est basée sur une analogie avec les mécanismes d'expression génique des génomes mitochondriaux de l'Homme et de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Nous avons rappelé dans l'introduction que les machineries transcriptionnelles des mitochondries de l'Homme et la levure mettent en jeu des ARN polymérases de type phagiques, respectivement POLRMT et RPO41. RPO41 est également associée aux membranes mitochondriales (Rodeheffer & Shadel 2003). Les gènes mitochondriaux des eucaryotes supérieurs codent essentiellement des protéines de nature hydrophobe, participant à la chaîne respiratoire dans la membrane interne mitochondriale. Chez la levure, leur insertion dans la membrane est contrôlée par une translocase, située elle aussi dans la membrane interne. Certains facteurs de traduction sont également intégrés dans la membrane interne de l'organite (Green-Willms *et al.* 2001; Manthey *et al.* 1998; (McMullin *et al.* 1990; McMullin & Fox 1993 ; Wiesenberger & Fox 1997).

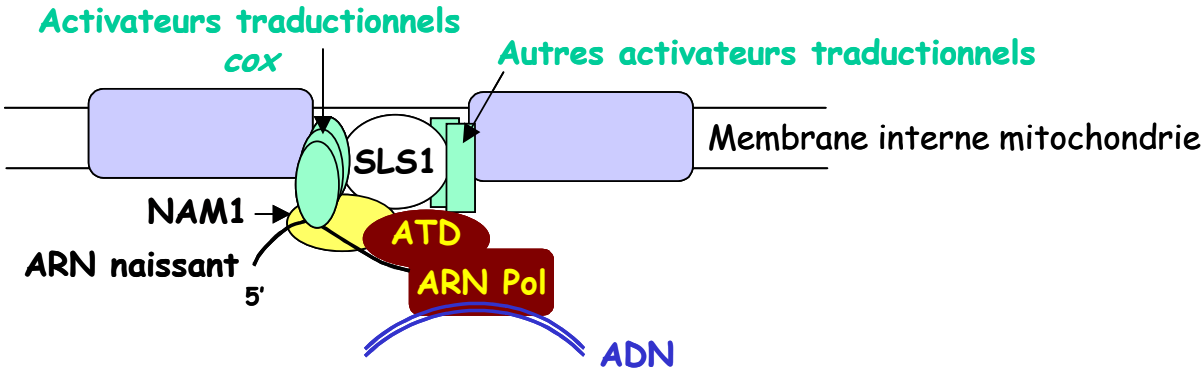


Figure 59 : 0rganisation de l'expression du génome mitochondrial autour de la membrane interne chez S. cerevisiae (d'après Rodeheffer & Shadel 2003).

Modèle du couplage transcription / traduction à proximité de la membrane interne mitochondriale chez la levure S. cerevisiae. L'ARN polymérase, via son extrémité N-terminal (ATD), interagit avec NAM1, protéine matricielle intervenant dans la traduction et dans la maturation d'ARNm précurseur et avec SLS1, une protéine de la membrane interne en restant associée aux nucléoïdes et à l'ADN mitochondrial.

Il a été suggéré que l'efficacité de l'expression du génome mitochondrial de *S. cerevisiae* relève d'une coordination des phases de transcription et traduction Rodeheffer MS et Shadel GS (Rodeheffer & Shadel 2003). En effet, ces travaux ont démontré qu'une série d'interactions amènent les complexes de transcription contre la membrane interne de l'organite. Un modèle présentant l'organisation de l'expression génique des mitochondries centré sur la membrane interne a donc été proposé (Figure 59). Un « pont protéique » se

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

formerait entre le chromosome et la membrane interne mitochondriale pour manipuler et coordonner toutes les étapes de l'expression génique chez la levure.

Dans le chloroplaste, deux translocases ont été identifiées : la protéine ARTEMIS dans l'enveloppe interne (Funes *et al.* 2004) et la protéine ALB3 dans les thylacoïdes (Kuhn *et al.* 2005). Ces protéines sont chargées de l'insertion des protéines dans leur compartiment membranaire et forment avec la protéine mitochondriale OXA1 de la levure et leur homologue bactérien, YIDC une famille de translocases. Un tel mécanisme de couplage transcription/traduction est retrouvé également chez les bactéries où la translocase YIDC est capable à elle seule d'intégrer à la membrane les protéines en cours de synthèse (Hanaoka *et al.* 2005). Les protéines ALB3 et ARTEMIS contribuent à l'insertion post-traductionnelle de protéines polytopiques dans les thylacoïdes ou l'enveloppe respectivement. Par ailleurs, l'existence d'un facteur de maturation et de traduction de l'opéron *psbB* (*psbB-psbT-psbH-petB-petD*) associé aux membranes thylacoïdiennes a été récemment mis en évidence par Sane AP et collaborateurs (Sane, Stein, et al. 2005). De plus, ce facteur à motif R-TPR (RNA TétratricoPeptide) intègre des complexes protéiques de plus hautes masses moléculaires. Par conséquent, nous pouvons supposer qu'un système semblable à celui des mitochondries de levure existe chez le chloroplaste, permettant de rapprocher physiquement des membranes une partie des appareils impliqués dans les diverses étapes de l'expression génique. Ce système inclurait un ancrage de la polymérase RPOT ;2 aux membranes thylacoïdiennes par l'intermédiaire d'un oligomère NIP, afin d'assurer un couplage des phases de transcription/maturation/traduction (modèle A, figure 60). Ce modèle implique probablement une certaine mobilité de l'ADN plastidial. Dans cette hypothèse, la protéine RPOT ;2 serait active. Ce point reste à vérifier expérimentalement dans nos extraits. Ce modèle A est à rapprocher des observations faites au cours du développement plastidial chez le maïs, selon lesquelles la quantité de la polymérase NEP diminue mais l'activité transcriptionnelle croit avec la différenciation plastidiale (Cahoon *et al.* 2004).

Dans une deuxième hypothèse, l'association des NEP aux membranes plastidiales dans les chloroplastes pourrait constituer une forme de séquestration de l'enzyme dans une forme inactive. En effet, la différenciation des proplastes en chloroplastes s'accompagne d'une augmentation spectaculaire des activités transcriptionnelles. L'activité NEP serait prépondérante dans les stades précoces du développement plastidial, où elle transcrirait notamment les sous-unités de la PEP. Elle serait très vite relayée, voire débordée par l'activité PEP dans les stades plus tardifs. Dans des travaux récemment rapportés, Hanaoka & al (Hanaoka *et al.* 2005) suggèrent, grâce à des expériences réalisées *in vitro* une inhibition de la

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

NEP d'Arabidopsis au cours de la différenciation du proplaste en chloroplaste. Cette inhibition pourrait être engendrée par la fixation spécifique d'un ARN de transfert plastidial, l'ARNt^{E}, exclusivement transcrit par l'ARN polymérase PEP. Cette molécule assurerait par conséquent le basculement des activités transcriptionnelles du chloroplaste de la NEP à la PEP au cours du développement. Leur hypothèse souligne la possibilité de maintenir une enzyme sous forme inactive dans l'organite. Dans ces conditions, nous pouvons imaginer que l'interaction NIP-NEP dans les membranes thylacoïdiennes pourrait constituer une forme de stockage de l'ARN polymérase NEP sous forme inactive dans les chloroplastes matures (Figure 60 B). Cela supposerait que les NEP soient relarguées dans certaines conditions pour devenir actives, suite à un stimulus encore indéterminé par exemple. Dans ce contexte, l'ARN polymerase serait mobile, et pourrait se déplacer le long du chromosome plastidial pour transcrire ses gènes cibles.

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

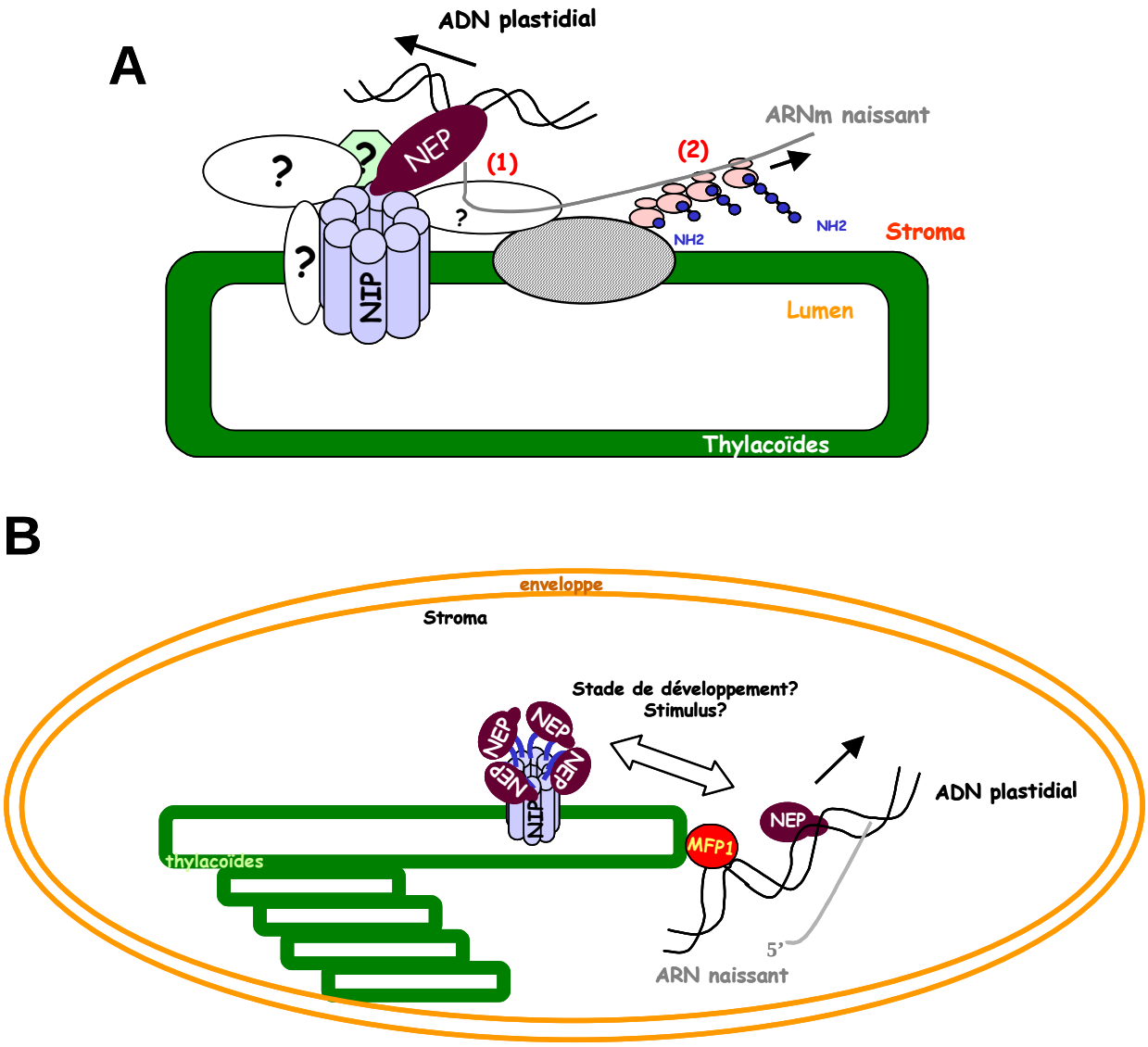


Figure 60 : Modèles de fonctionnement des NEP plastidiales dans les chloroplastes matures de plantes dicotylédones

A Amélioration de l'efficacité de l'expression génique, optimisant la succession des évènements de synthèse et maturation d'ARNm (gris, 1) et de la traduction (2). B : Séquestration des NEP à la membrane en vue d'une inactivation et d'un stockage. NH2 : extrémité N-terminale du polypeptide en cours de synthèse (bleu). MFP1 : protéine de liaison de l'ADN aux thylacoïdes.

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

CONCLUSION et PERSPECTIVES

La transcription du génome plastidial chez les végétaux supérieurs est donc un phénomène très complexe mettant en jeu trois ARN polymérases différentes. La question du partage de l'expression du plastome par ces ARN polymérases reste encore controversée. Des approches d'analyses du plastome par puces à ADN menées par Krause *et al.* Lengen *et al.* ont montré que l'ensembles des gènes plastidiaux pouvaient être transcrit par la NEP dans des cellules de tabac déficientes en PEP (Krause *et al.* 2000 ; Legen *et al.* 2002). Depuis ces dernières années, différentes observations sur l'expression des génomes organellaires des eucaryotes supérieurs, et en particulier chez les chloroplastes, conduisent à porter un nouveau regard sur l'expression des organites semi-autonomes, en particulier les mécanismes de coordination des activités PEP/NEP dans le plaste, ainsi que le fonctionnement des ARN polymérases de type phagiques. Nos travaux montrent un rattachement physique des NEP aux membranes des chloroplastes matures, impliquant probablement des protéines insérées dans ces membranes. La famille de protéines NIP que nous avons caractérisée d'un point de vue structural et fonctionnel intervient probablement dans l'attachement des NEP aux membranes, et plus précisement SoRPOT ;2 puisque une interaction SoRPOT ;3/NIP reste encore à démontrer. Afin de vérifier une implication des protéines NIP dans la régulation de l'ensemble de la famille des ARN polymérases de type phagique, il est nécessaire de définir avec précision la localisation subcellulairede chacune des NIP. Les approches et outils utilisés ne le permettant pas jusqu'ici, d'autres moyens deraient être mis en place pour répondre à cette question. Nous pouvons penser à des expériences d'import *in vitro ;* ou encore des immunodétections après fractionnement subcellulaire de transformants d'arabidopsis exprimant une protéine NIP fusionnée à une étiquette pouvant servir d'épitope (poly-histidines ou étiquette HA par exemple). L'association NIP-NEP peut être également déterminée par des tests d'interaction tels qu'une co-immunoprécipitation de protéines produites *in vitro*. Afin de s'affranchir des problèmes de surproduction des protéines NIP observées chez *E. coli*, les protéines NIP et NEP pourraient être produites par des systèmes de transcription-traduction *in vitro* (« TNT coupled wheat germ extracts systems », PROMEGA). Bien que les quantités produites soient plus faibles, la détection de l'un des polypeptides produits peut être amplifiée grâce à un marquage radioactif des méthionines (S35). La fonction des protéines NIP, et notamment une influence éventuelle dans l'expression du génome des organites, peut être également approchée par une étude des mutants AtNip produits chez Arabidopsis. Il faudrait tout d'abord d'une part contrôler si les membranes

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

plastidiales peuvent incorporer et être le siège d'une activité transcriptionnelle. Ce premier point peut être mis en évidence grâce à des tests de transcription non spécifiques, réalisés à partir d'extraits membranaires, en présence ou l'abscence d'antibiotiques ciblant les ARN polymérases PEP ou NEP, ou encore de matrices spécifiques après digestion de l'ADN plastidial. L'activité transcripionnelle devrait être perturbée chez des mutants AtNip. D'autre part, le rôle des protéines NIP dans le plaste, et dans l'accumulation de messagers, pourrait être également abordée par une étude transcriptomique grâce à une puce « plaste spécifique » disponible au laboratoire. Un second point pouvant contribuer à définir le rôle physiologique des protéines NIP implique l'identification d'autres partenaires, ceci pouvant être notament réalisé en poursuivant l'enrichissement des fractions obtenues par gel filtration communes contenant NIP et SoRPOT ;2, en ajoutant une seconde séparation chromatographique (autre chromatographie d'exclusion avec une colonne présentant une séparation plus importante, ou chromatographie d'affinité/échangeuse d'ions avec par exemple une colonne héparine-sepharose). Le contenu de ces fractions enrichies pourrait être finalement être déterminé grâce à un séquençage peptidique sur ce mélange liquide complexe.

Si l'on se focalise sur le plaste, les ARN polymérases SoRPOT ;3 et SoRPOT ;2 ne semblent pas présenter la même affinité vis-à vis des membranes, car en effet, les expériences de traitements à la DNase de membranes plastidiales avait également conduit à un détachement partiel de SoRPOT ;3 en fin de réaction, et ce, indépendamment de l'enzyme. Il s'agit d'un premier trait permettant de différencier ces deux polymérases plastidiales. Ces études d'interaction NIP/SoRPOT ;2 et NIP/SoRPOT ;3 pourraient par conséquent aider, en partie, à definir le partage respectif des tâches de ces ARN polymérases plastidiales dans l'expression du plastome tout d'abord, puis plus largement, dans le développement du chloroplaste ou de la plante. Finalement l'ensemble de ces études pourrait aider à discriminer entre les modèles fonctionnels NIP-NEP proposés ici.

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

ANNEXES

ANNEXES

Annexe 1: séquences des peptides antigéniques

Antisérum et protéine cible	Peptides antigéniques (numéro et séquence)
SE581 et SE582 (AtNIP1)	peptide52 : TGKNNLDAFGNKDSC
	peptide 53 : QLGETVRSLPHCHP
SE583 et SE584 (AtNIP2)	peptide 54 : FDDHTSLFDTGGSKG
	peptide 55 : ITGNNNTDASENTD
692-2P (SoRPOT;2)	Peptide 23: RERGGSLVKEGIGER
	Peptide 24: AGVDSSTDLEDDV
786 (SoRPOT;3)	AIEKEQKSQRSRKQK

Tableau récapitulatif des peptides antigéniques utilisés pour la production des antisera NIP et NEP

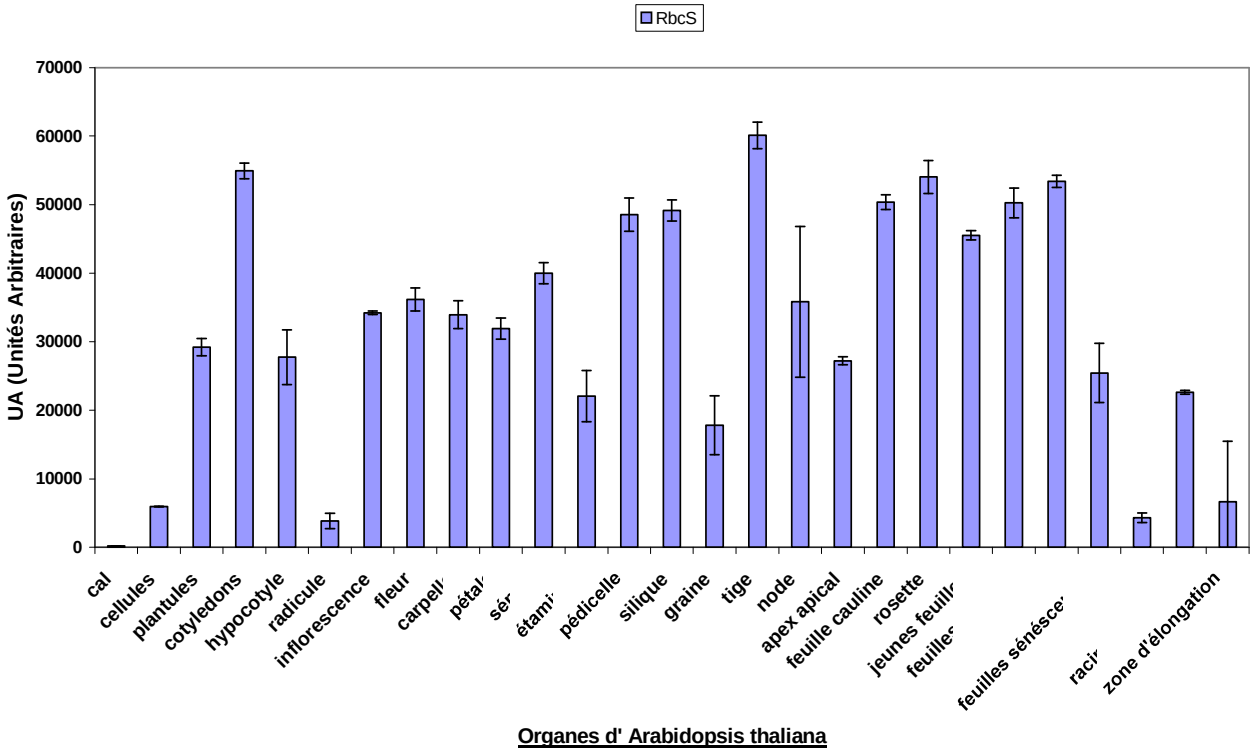
tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

Annexe 2: séquences des oligonucléotides utilisés

nom	séquences (5'-3')	utilisation
JA13	GGATCCATGGCCTCTTCTAGATTCCAATCTGGG	clonage dans EL103::eYFP (*NIP1* , chapitre 2)
JA14	GGATCCATGGCC TCGTCATCATCATCA	clonage dans EL103::eYFP (*NIP2* , chapitre 2) et RT-PCR
JA2	GGA TCC ATG GAT GGT TAT TAT TCT CTG	clonage dans EL103::eYFP (*NIP3,* chapitre 2) et RT-PCR
JA4	TCT AGACAA AGCTCCAGTAAGTGCTCC	clonage dans EL103::eYFP (*NIP1* , construction A,chapitre 2)
JA5	TCTAGAAAGGCCCCTAGCAATGTGCC	clonage dans EL103::eYFP (*NIP2* , construction A,chapitre 2)
JA6	TCTAGATTCTTGGCCGATCAAAGCCCC	clonage dans EL103::eYFP (*NIP3* , construction A,chapitre 2)
JA10	TCT AGA GGA GAG GGT GAA ACG ACA TGC	clonage dans EL103::eYFP (*NIP1* , construction B,chapitre 2)
JA11	TCT AGA AGA GAC AAG GAA ATG ACA AGC	clonage dans EL103::eYFP (*NIP2* , construction B,chapitre 2)
JA12	TCT AGA AGA GAC GGC GAA ATG GAA GGA	clonage dans EL103::eYFP (*NIP3* , construction B,chapitre 2)
NIP1-TM3 XBA	TCTAGATCCCATCTGACTTTGAACCGC	clonage dans EL103::*eYFP* (construction C,chapitre 2)
NIP2-TM3 XBA	TCTAGATCCCATTTGACTTTGCACTGC	clonage dans EL103::*eYFP* (construction C,chapitre 2)
NIP3-TM3 XBA	TCTAGAAGCTCCCATCTGACTCTGGAC	clonage dans EL103::*eYFP* (construction C,chapitre 2)
JA1	TCTAGATTACAGATCGCGTCTACACATTTG	clonage dans EL103::eYFP (*NIP1* , construction D,chapitre 2) et RT-PCR
LysR2 Fusion GFP	TCT AGA AAT ATT ACG TCT ACA CAT CGG GC	clonage dans EL103::eYFP (*NIP2* , construction D,chapitre 2) et RT-PCR
JA3	TCTAGATCAAAGATGTCTTCTGCACA GGGAC	clonage dans EL103::eYFP (*NIP3* , construction D,chapitre 2) et RT-PCR
JA7	ACCGGTGGCTCAAAGGGG	contrôle de fusion *NIP1* ::e*YFP* dans EL103
JA8	CTTTTTGATACAGGAGGC	contrôle de fusion *NIP2* ::e*YFP* EL103
JA9	ATGGGAGCTGTGGAGTCC	contrôle de fusion *NIP3:* :e*YFP* EL103
nip3 5'-Bgl II	AGATCT ATG GAT GGT TAT TAT TCT CTG	Clonage dans pBAD/HisB
nip3 5'-EcorI	GAATTCTCAAAGATGTCTTCTGCACA GGGAC	Clonage dans pBAD/HisB
nip2-5PstI	CTGCAGGAACGCATTAAAGACGCTTGC	Clonage dans pBAD/HisC
nip2-3EcoRI	GAATCCTTAAATATCACGTCTACACAT	Clonage dans pBAD/HisC
SPI RPOX 181	TTTTCTATTTCACGTAGTTACAG	Clonage de *SoRPOT;2* dans pBAD/thiotopo
SPI RPOX SE3	GAGCTCCTTCAGGTCACCTTGAGAATC	Clonage de SoRPOT;2 dans pBAD/thiotopo
JL202	CATTTTATAATAACGCTGCGGACATC	criblage mutant AtNip1 (Wisconsin)
AtNip1_5'UTR	GATCCTACCGTAGATCGTTTCGAGTC	Criblage mutant AtNip1 et RT-PCR
AtNip1_5'KO	TGAAGAGCCAATTGTCTATGCAAGG	Criblage mutant AtNip1 (appelée aussi Lys R1 PS)
SALK NIP2_5' KO	AAAGTTCTTTGCCCCGTGAGC	criblage mutant AtNip2 (Salk)
SALK NIP2_3' KO	GCTCACCAAGTAGAGAAAACAT	criblage mutant AtNip2 (Salk)
LBB1	GCGTGGACCGCTTGCTGCTGCAACT	criblage mutant AtNip2 (Salk)
NIP2 RNAi-Xba	GTCCTAGAGGGCACATTGCTAGG	amorce 5', clonage dans IP1 et pBI121 (sens)
NIP2 RNAi-SacI	GGAGCTCAATATTACGTCTACAC	amorce 3', clonage dans IP1 et pBI121 (sens)
NIP2 RNAi-BamHI	GCGGATCCAATATTACGTCTACAC	amorce 3', clonage dans IP1 et pBI121 (antisens)
NPT II 5	AGATGGATTGCACGCAGGTTCTC	criblage mutant KanR
NPT II 3	TCAGAAGAACTCGTCAAGAAGGC	criblage mutant KanR
APT1-2 amorce 5'	TCCCAGAATCGCTAAGATTGCC	RT-PCR
APT1-1 amorce 3'	CCTTTCCCTTAAGCTCTG	RT-PCR

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

Annexe 3 : Profil d'accumulation des transcrits *RBCS* établi par analyse transcriptomique (« gene atlas »)

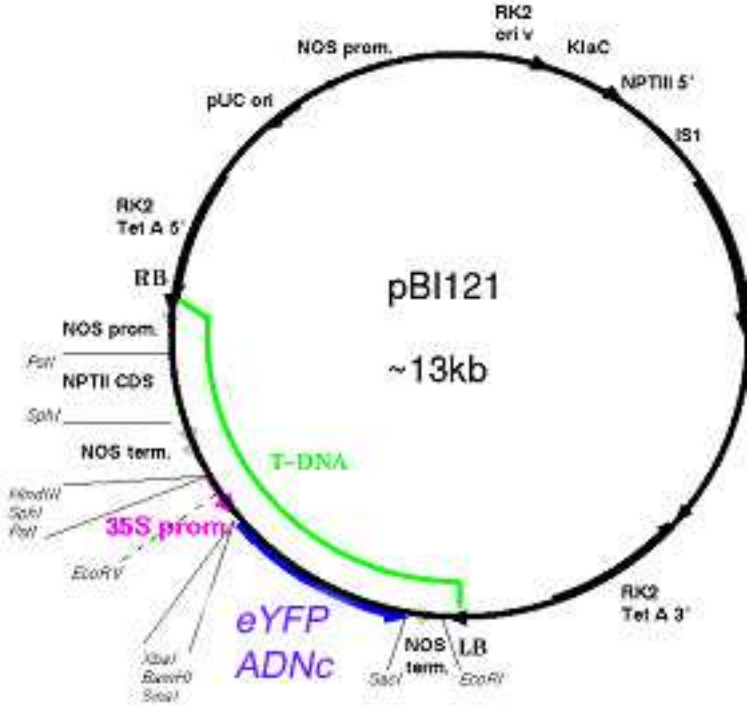


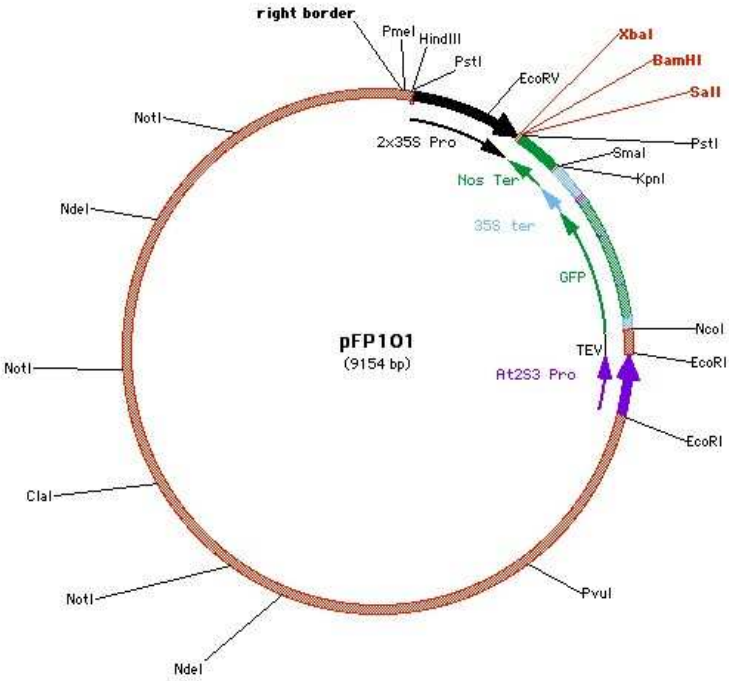
Profil d'accumulation, établi par analyse transcriptomique (genvestigator, puce « Gene Atlas ») des messagers RBCS dans la plante A. thaliana

Avec UA : Unités Arbitraires du niveau d'expression.

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

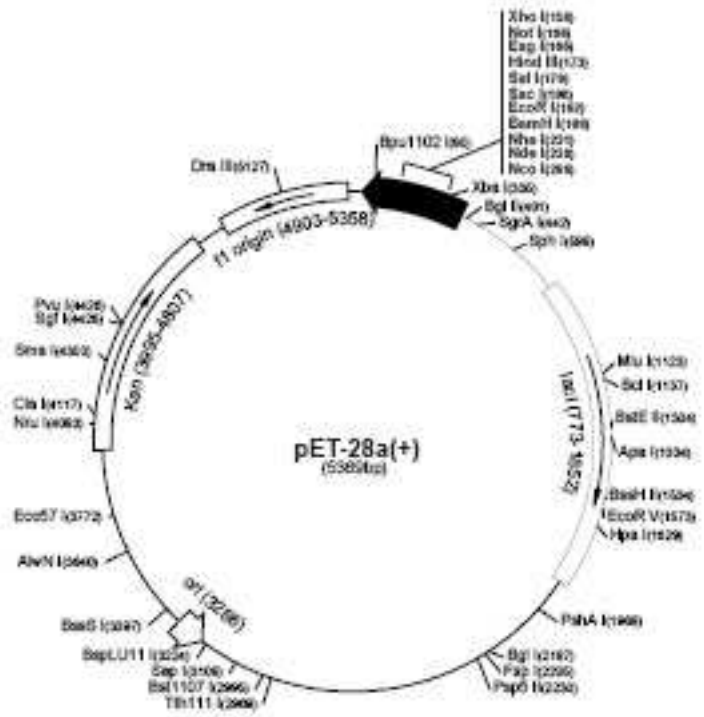
Annexe 4 : Vecteurs binaires utilisés

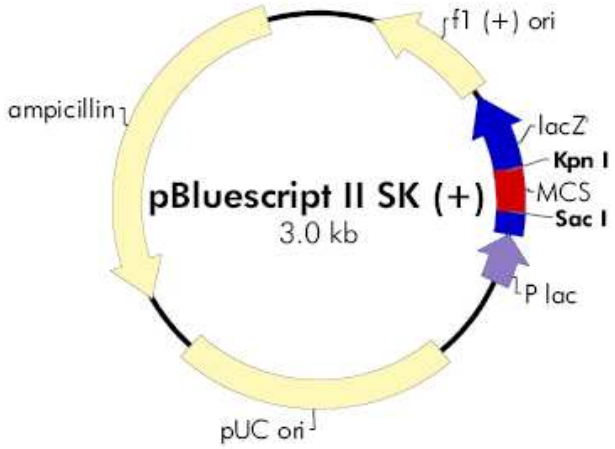




tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

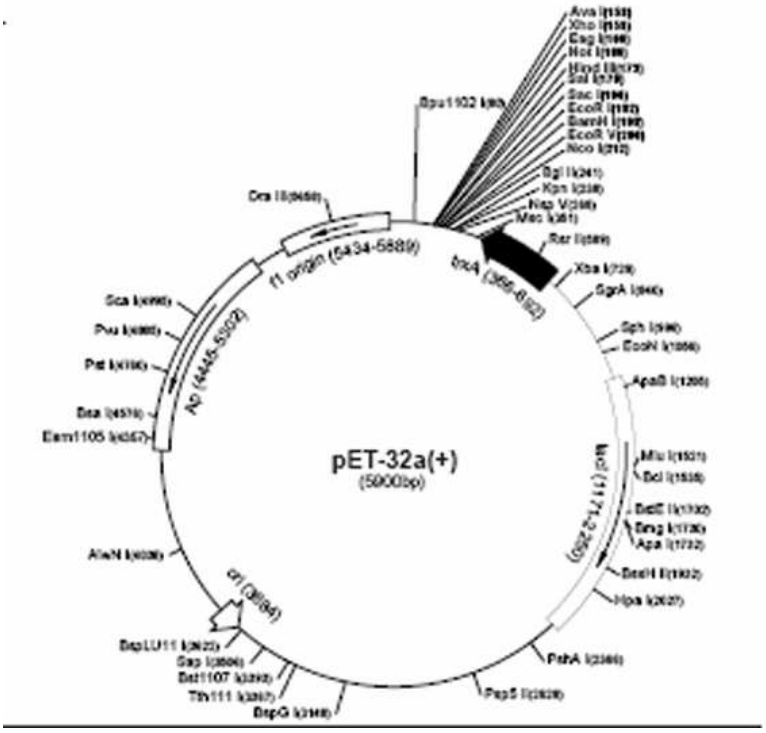
Annexe 5 : Vecteurs d'expression procaryotes utilisés

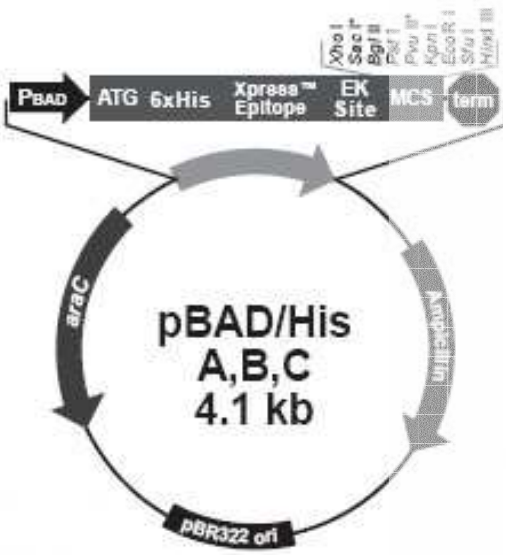


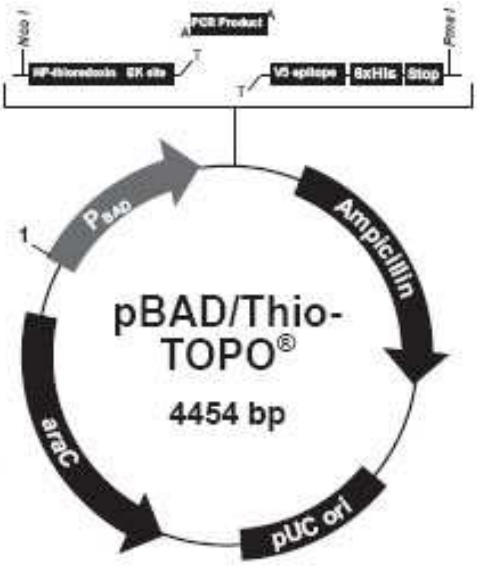


tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

Annexe 5 (suite): Vecteurs d'expression procaryotes utilisés

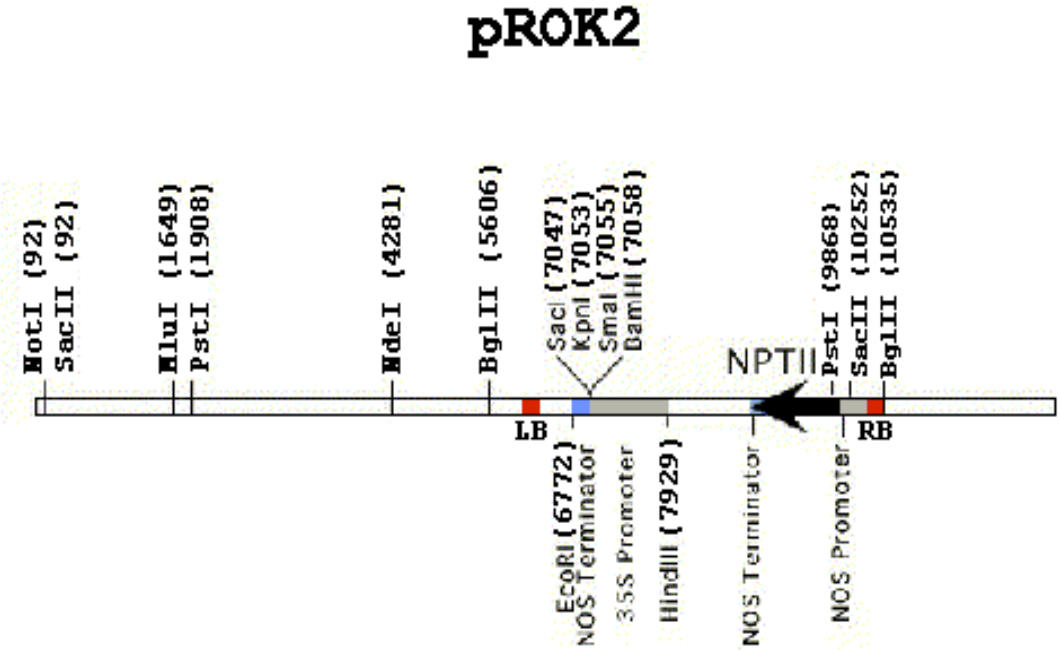






tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

Annexe 6 : Carte du vecteur binaire utilisé pour produire les mutants d'insertion du Salk Institute



tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

Adams KL, Palmer JD (2003) Evolution of mitochondrial gene content: gene loss and transfer to the nucleus. Mol Phylogenet Evol 29: 380-395

Allison LA, Simon LD, Maliga P (1996) Deletion of rpoB reveals a second distinct transcription system in plastids of higher plants. EMBO J 15: 2802-2809

Andersson SG, Karlberg O, Canback B, Kurland CG (2003) On the origin of mitochondria: a genomics perspective. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 358: 165-177

Antoshechkin I, Bogenhagen DF, Mastrangelo IA (1997) The HMG-box mitochondrial transcription factor xl-mtTFA binds DNA as a tetramer to activate bidirectional transcription. EMBO J 16: 3198-3206

Awai K, Marechal E, Block MA, Brun D, Masuda T, Shimada H, Takamiya K, Ohta H, Joyard J (2001) Two types of MGDG synthase genes, found widely in both 16:3 and 18:3 plants, differentially mediate galactolipid syntheses in photosynthetic and nonphotosynthetic tissues in Arabidopsis thaliana. Proc Natl Acad Sci U S A 98: 10960-10965

Baba K, Schmidt J, Espinosa-Ruiz A, Villarejo A, Shiina T, Gardestrom P, Sane AP, Bhalerao RP (2004) Organellar gene transcription and early seedling development are affected in the rpoT;2 mutant of Arabidopsis. Plant J 38: 38-48

Baulcombe D (2004) RNA silencing in plants. Nature 431: 356-363

Bechtold N, Pelletier G (1998) In planta Agrobacterium-mediated transformation of adult Arabidopsis thaliana plants by vacuum infiltration. Methods Mol Biol 82: 259-266

Bendich AJ (1987) Why do chloroplasts and mitochondria contain so many copies of their genome? Bioessays 6: 279-282

Binder S, Marchfelder A, Brennicke A (1996) Regulation of gene expression in plant mitochondria. Plant Mol Biol 32: 303-314

Bligny M, Courtois F, Thaminy S, Chang CC, Lagrange T, Baruah-Wolff J, Stern D, Lerbs-Mache S (2000) Regulation of plastid rDNA transcription by interaction of CDF2 with two different RNA polymerases. EMBO J 19: 1851-1860

Block MA, Joyard J, Douce R (1991) Purification and characterization of E37, a major chloroplast envelope protein. FEBS Lett 287: 167-170

Bogenhagen DF, Applegate EF, Yoza BK (1984) Identification of a promoter for transcription of the heavy strand of human mtDNA: in vitro transcription and deletion mutagenesis. Cell 36: 1105-1113

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

Bonner G, Lafer EM, Sousa R (1994) Characterization of a set of T7 RNA polymerase active site mutants. J Biol Chem 269: 25120-25128

Bonner G, Patra D, Lafer EM, Sousa R (1992) Mutations in T7 RNA polymerase that support the proposal for a common polymerase active site structure. EMBO J 11: 3767-3775

Brieba LG, Gopal V, Sousa R (2001) Scanning mutagenesis reveals roles for helix n of the bacteriophage T7 RNA polymerase thumb subdomain in transcription complex stability, pausing, and termination. J Biol Chem 276: 10306-10313

Brieba LG, Sousa R (2000) Roles of histidine 784 and tyrosine 639 in ribose discrimination by T7 RNA polymerase. Biochemistry 39: 919-923

BRUINSMA J (1961) A comment on the spectrophotometric determination of chlorophyll. Biochim Biophys Acta 52: 576-578

Burnette WN (1981) "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. Anal Biochem 112: 195-203

Cahoon AB, Harris FM, Stern DB (2004) Analysis of developing maize plastids reveals two mRNA stability classes correlating with RNA polymerase type. EMBO Rep 5: 801-806

Cannon GC, Ward LN, Case CI, Heinhorst S (1999) The 68 kDa DNA compacting nucleoid protein from soybean chloroplasts inhibits DNA synthesis in vitro. Plant Mol Biol 39: 835-845

Cermakian N, Ikeda TM, Cedergren R, Gray MW (1996) Sequences homologous to yeast mitochondrial and bacteriophage T3 and T7 RNA polymerases are widespread throughout the eukaryotic lineage. Nucleic Acids Res 24: 648-654

Chang DD, Clayton DA (1985) Priming of human mitochondrial DNA replication occurs at the light-strand promoter. Proc Natl Acad Sci U S A 82: 351-355

Chang DD, Hixson JE, Clayton DA (1986) Minor transcription initiation events indicate that both human mitochondrial promoters function bidirectionally. Mol Cell Biol 6: 294-301

Cheetham GM, Steitz TA (2000) Insights into transcription: structure and function of single-subunit DNA-dependent RNA polymerases. Curr Opin Struct Biol 10: 117-123

Chen CJ, Liu ZJ, Rose JP, Wang BC (1999) Low-salt crystallization of T7 RNA polymerase: a first step towards the transcription bubble complex. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 55 (Pt 6): 1188-1192

Chen XJ, Wang X, Kaufman BA, Butow RA (2005) Aconitase couples metabolic regulation to mitochondrial DNA maintenance. Science 307: 714-717

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

Chi-Ham CL, Keaton MA, Cannon GC, Heinhorst S (2002) The DNA-compacting protein DCP68 from soybean chloroplasts is ferredoxin:sulfite reductase and co-localizes with the organellar nucleoid. Plant Mol Biol 49: 621-631

Christianson T, Rabinowitz M (1983) Identification of multiple transcriptional initiation sites on the yeast mitochondrial genome by in vitro capping with guanylyltransferase. J Biol Chem 258: 14025-14033

Claros MG, Perea J, Shu Y, Samatey FA, Popot JL, Jacq C (1995) Limitations to in vivo import of hydrophobic proteins into yeast mitochondria. The case of a cytoplasmically synthesized apocytochrome b. Eur J Biochem 228: 762-771

Clayton DA (1991) Replication and transcription of vertebrate mitochondrial DNA. Annu Rev Cell Biol 7: 453-478

Cliften PF, Jang SH, Jaehning JA (2000) Identifying a core RNA polymerase surface critical for interactions with a sigma-like specificity factor. Mol Cell Biol 20: 7013-7023

Clough SJ, Bent AF (1998) Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. Plant J 16: 735-743

Conaway RC, Brower CS, Conaway JW (2002) Emerging roles of ubiquitin in transcription regulation. Science 296: 1254-1258

Covello PS, Gray MW (1991) Sequence analysis of wheat mitochondrial transcripts capped in vitro: definitive identification of transcription initiation sites. Curr Genet 20: 245-251

Cowling RJ, Kamiya Y, Seto H, Harberd NP (1998) Gibberellin dose-response regulation of GA4 gene transcript levels in Arabidopsis. Plant Physiol 117: 1195-1203

da Costa e Silva, Lorbiecke R, Garg P, Muller L, Wassmann M, Lauert P, Scanlon M, Hsia AP, Schnable PS, Krupinska K, Wienand U (2004) The Etched1 gene of Zea mays (L.) encodes a zinc ribbon protein that belongs to the transcriptionally active chromosome (TAC) of plastids and is similar to the transcription factor TFIIS. Plant J 38: 923-939

Dairaghi DJ, Shadel GS, Clayton DA (1995a) Addition of a 29 residue carboxyl-terminal tail converts a simple HMG box-containing protein into a transcriptional activator. J Mol Biol 249: 11-28

Dairaghi DJ, Shadel GS, Clayton DA (1995b) Human mitochondrial transcription factor A and promoter spacing integrity are required for transcription initiation. Biochim Biophys Acta 1271: 127-134

Delaroque N, Fontaine JM, Kloareg B, Loiseaux-de Goer S (1996) Putative sigma-70-like promoters in a brown algal mitochondrial genome. C R Acad Sci III 319: 763-767

dePamphilis CW, Palmer JD (1990) Loss of photosynthetic and chlororespiratory genes from the plastid genome of a parasitic flowering plant. Nature 348: 337-339

Douce R, Holtz RB, Benson AA (1973b) Isolation and properties of the envelope of spinach chloroplasts. J Biol Chem 248: 7215-7222

Douce R, Holtz RB, Benson AA (1973a) Isolation and properties of the envelope of spinach chloroplasts. J Biol Chem 248: 7215-7222

Dumas R, Lebrun M, Douce R (1991) Isolation, characterization and sequence analysis of a full-length cDNA clone encoding acetohydroxy acid reductoisomerase from spinach chloroplasts. Biochem J 277 (Pt 2): 469-475

Dyall SD, Brown MT, Johnson PJ (2004) Ancient invasions: from endosymbionts to organelles. Science 304: 253-257

Ekstrand MI, Falkenberg M, Rantanen A, Park CB, Gaspari M, Hultenby K, Rustin P, Gustafsson CM, Larsson NG (2004) Mitochondrial transcription factor A regulates mtDNA copy number in mammals. Hum Mol Genet 13: 935-944

Falkenberg M, Gaspari M, Rantanen A, Trifunovic A, Larsson NG, Gustafsson CM (2002) Mitochondrial transcription factors B1 and B2 activate transcription of human mtDNA. Nat Genet 31: 289-294

Fan J, Quan S, Orth T, Awai C, Chory J, Hu J (2005) The Arabidopsis PEX12 gene is required for peroxisome biogenesis and is essential for development. Plant Physiol 139: 231-239

Fisher RP, Clayton DA (1988) Purification and characterization of human mitochondrial transcription factor 1. Mol Cell Biol 8: 3496-3509

Fisher RP, Lisowsky T, Parisi MA, Clayton DA (1992) DNA wrapping and bending by a mitochondrial high mobility group-like transcriptional activator protein. J Biol Chem 267: 3358-3367

Fisher RP, Topper JN, Clayton DA (1987) Promoter selection in human mitochondria involves binding of a transcription factor to orientation-independent upstream regulatory elements. Cell 50: 247-258

Foury F, Roganti T, Lecrenier N, Purnelle B (1998) The complete sequence of the mitochondrial genome of Saccharomyces cerevisiae. FEBS Lett 440: 325-331

Freemont PS (2000) RING for destruction? Curr Biol 10: R84-R87

Friso G, Giacomelli L, Ytterberg AJ, Peltier JB, Rudella A, Sun Q, Wijk KJ (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: 478-499

Funes S, Gerdes L, Inaba M, Soll J, Herrmann JM (2004) The Arabidopsis thaliana chloroplast inner envelope protein ARTEMIS is a functional member of the Alb3/Oxa1/YidC family of proteins. FEBS Lett 569: 89-93

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

Gaspari M, Falkenberg M, Larsson NG, Gustafsson CM (2004a) The mitochondrial RNA polymerase contributes critically to promoter specificity in mammalian cells. EMBO J 23: 4606-4614

Gaspari M, Larsson NG, Gustafsson CM (2004b) The transcription machinery in mammalian mitochondria. Biochim Biophys Acta 1659: 148-152

Giese A, Thalheim C, Brennicke A, Binder S (1996) Correlation of nonanucleotide motifs with transcript initiation of 18S rRNA genes in mitochondria of pea, potato and Arabidopsis. Mol Gen Genet 252: 429-436

Gonzalez RG, Haxo RS, Schleich T (1980) Mechanism of action of polymeric aurintricarboxylic acid, a potent inhibitor of protein--nucleic acid interactions. Biochemistry 19: 4299-4303

Gray MW, Lang BF (1998) Transcription in chloroplasts and mitochondria: a tale of two polymerases. Trends Microbiol 6: 1-3

Green-Willms NS, Butler CA, Dunstan HM, Fox TD (2001) Pet111p, an inner membrane-bound translational activator that limits expression of the Saccharomyces cerevisiae mitochondrial gene COX2. J Biol Chem 276: 6392-6397

Greenberg BM, Narita JO, DeLuca-Flaherty C, Gruissem W, Rushlow KA, Hallick RB (1984) Evidence for two RNA polymerase activities in Euglena gracilis chloroplasts. J Biol Chem 259: 14880-14887

Hajdukiewicz PT, Allison LA, Maliga P (1997) The two RNA polymerases encoded by the nuclear and the plastid compartments transcribe distinct groups of genes in tobacco plastids. EMBO J 16: 4041-4048

Hanaoka M, Kanamaru K, Fujiwara M, Takahashi H, Tanaka K (2005) Glutamyl-tRNA mediates a switch in RNA polymerase use during chloroplast biogenesis. EMBO Rep 6: 545-550

Hardtke CS, Deng XW (2000) The cell biology of the COP/DET/FUS proteins. Regulating proteolysis in photomorphogenesis and beyond? Plant Physiol 124: 1548-1557

Hedtke B, Borner T, Weihe A (1997) Mitochondrial and chloroplast phage-type RNA polymerases in Arabidopsis. Science 277: 809-811

Hedtke B, Borner T, Weihe A (2000) One RNA polymerase serving two genomes. EMBO Rep 1: 435-440

Hedtke B, Meixner M, Gillandt S, Richter E, Borner T, Weihe A (1999a) Green fluorescent protein as a marker to investigate targeting of organellar RNA polymerases of higher plants in vivo. Plant J 17: 557-561

Hedtke B, Wagner I, Borner T, Hess WR (1999b) Inter-organellar crosstalk in higher plants: impaired chloroplast development affects mitochondrial gene and transcript levels. Plant J 19: 635-643

Herrmann RG, Kowallik KV (1970a) Multiple amounts of DNA related to the size of chloroplasts. II. Comparison of electron-microscopic and autoradiographic data. Protoplasma 69: 365-372

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

Herrmann RG, Kowallik KV (1970b) Selective presentation of DNA-regions and membranes in chloroplasts and mitochondria. J Cell Biol 45: 198-202

Hess WR, Prombona A, Fieder B, Subramanian AR, Borner T (1993) Chloroplast rps15 and the rpoB/C1/C2 gene cluster are strongly transcribed in ribosome-deficient plastids: evidence for a functioning non-chloroplast-encoded RNA polymerase. EMBO J 12: 563-571

Hiratsuka J, Shimada H, Whittier R, Ishibashi T, Sakamoto M, Mori M, Kondo C, Honji Y, Sun CR, Meng BY, . (1989) The complete sequence of the rice (Oryza sativa) chloroplast genome: intermolecular recombination between distinct tRNA genes accounts for a major plastid DNA inversion during the evolution of the cereals. Mol Gen Genet 217: 185-194

Hu J, Troxler RF, Bogorad L . Maize chloroplast RNA polymerase: the 78-kilodalton polypeptide is encoded by the plastid rpoC1 gene. Nucleic Acids Res. 19, 3431-3434. 1991.

Hu J, Bogorad L (1990) Maize chloroplast RNA polymerase: the 180-, 120-, and 38-kilodalton polypeptides are encoded in chloroplast genes. Proc Natl Acad Sci U S A 87: 1531-1535

Hubschmann T, Borner T (1998) Characterisation of transcript initiation sites in ribosome-deficient barley plastids. Plant Mol Biol 36: 493-496

Hurkman WJ, Tanaka CK . Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two dimensional electrophoresis; Electrophoresis 2005;116; 1209-1218.

Hutin C, Havaux M, Carde JP, Kloppstech K, Meiherhoff K, Hoffman N, Nussaume L (2002) Double mutation cpSRP43--/cpSRP54-- is necessary to abolish the cpSRP pathway required for thylakoid targeting of the light-harvesting chlorophyll proteins. Plant J 29: 531-543

Igloi GL, Kössel H . The transcriptionnal appartus of chloroplast. Critical reviews in Plant Sciences 10, 1992; 525-558.

Ikeda TM, Gray MW (1999a) Characterization of a DNA-binding protein implicated in transcription in wheat mitochondria. Mol Cell Biol 19: 8113-8122

Ikeda TM, Gray MW (1999b) Identification and characterization of T3/T7 bacteriophage-like RNA polymerase sequences in wheat. Plant Mol Biol 40: 567-578

Ishizaki Y, Tsunoyama Y, Hatano K, Ando K, Kato K, Shinmyo A, Kobori M, Takeba G, Nakahira Y, Shiina T (2005) A nuclear-encoded sigma factor, Arabidopsis SIG6, recognizes sigma-70 type chloroplast promoters and regulates early chloroplast development in cotyledons. Plant J 42: 133-144

Jackson PK, Eldridge AG, Freed E, Furstenthal L, Hsu JY, Kaiser BK, Reimann JD (2000) The lore of the RINGs: substrate recognition and catalysis by ubiquitin ligases. Trends Cell Biol 10: 429-439

Jeong SY, Peffer N, Meier I (2004) Phosphorylation by protein kinase CKII modulates the DNA-binding activity of a chloroplast nucleoid-associated protein. Planta 219: 298-302

Jeong SY, Rose A, Meier I (2003) MFP1 is a thylakoid-associated, nucleoid-binding protein with a coiled-coil structure. Nucleic Acids Res 31: 5175-5185

Jeruzalmi D, Steitz TA (1998) Structure of T7 RNA polymerase complexed to the transcriptional inhibitor T7 lysozyme. EMBO J 17: 4101-4113

Josse EM, Simkin AJ, Gaffe J, Laboure AM, Kuntz M, Carol P (2000) A plastid terminal oxidase associated with carotenoid desaturation during chromoplast differentiation. Plant Physiol 123: 1427-1436

Jouhet J, Marechal E, Baldan B, Bligny R, Joyard J, Block MA (2004) Phosphate deprivation induces transfer of DGDG galactolipid from chloroplast to mitochondria. J Cell Biol 167: 863-874

Joyard J, Billecocq A, Bartlett SG, Block MA, Chua NH, Douce R (1983) Localization of polypeptides to the cytosolic side of the outer envelope membrane of spinach chloroplasts. J Biol Chem 258: 10000-10006

Joyard J, Douce R (1982) The chloroplast envelope: structure and biochemical properties. Prog Clin Biol Res 102 Pt B: 77-89

Kabeya Y, Sato N (2005) Unique translation initiation at the second AUG codon determines mitochondrial localization of the phage-type RNA polymerases in the moss Physcomitrella patens. Plant Physiol 138: 369-382

Kanki T, Ohgaki K, Gaspari M, Gustafsson CM, Fukuoh A, Sasaki N, Hamasaki N, Kang D (2004) Architectural role of mitochondrial transcription factor A in maintenance of human mitochondrial DNA. Mol Cell Biol 24: 9823-9834

Kapoor M, Nagai T, Wakasugi T, Yoshinaga K, Sugiura M (1997) Organization of chloroplast ribosomal RNA genes and in vitro self-splicing activity of the large subunit rRNA intron from the green alga Chlorella vulgaris C-27. Curr Genet 31: 503-510

Kleffmann T, Russenberger D, von Zychlinski A, Christopher W, Sjolander K, Gruissem W, Baginsky S (2004) The Arabidopsis thaliana chloroplast proteome reveals pathway abundance and novel protein functions. Curr Biol 14: 354-362

Kochetkov SN, Rusakova EE, Tunitskaya VL (1998) Recent studies of T7 RNA polymerase mechanism. FEBS Lett 440: 264-267

Kosarev P, Mayer KF, Hardtke CS (2002) Evaluation and classification of RING-finger domains encoded by the Arabidopsis genome. Genome Biol 3: RESEARCH0016

Krause K, Krupinska K . Molecular anf functional properties of highly purified transcriptionnally active chromosome from spinach chloroplats. Physiologia Plantarum 2000; 108; 188-195

Krause K, Maier RM, Kofer W, Krupinska K, Herrmann RG (2000) Disruption of plastid-encoded RNA polymerase genes in tobacco: expression of only a distinct set of genes is not based on selective transcription of the plastid chromosome. Mol Gen Genet 263: 1022-1030

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

Kruft V, Eubel H, Jansch L, Werhahn W, Braun HP (2001) Proteomic approach to identify novel mitochondrial proteins in Arabidopsis. Plant Physiol 127: 1694-1710

Kuhn K, Weihe A, Borner T (2005) Multiple promoters are a common feature of mitochondrial genes in Arabidopsis. Nucleic Acids Res 33: 337-346

Lagrange T, Hakimi MA, Pontier D, Courtois F, Alcaraz JP, Grunwald D, Lam E, Lerbs-Mache S (2003) Transcription factor IIB (TFIIB)-related protein (pBrp), a plant-specific member of the TFIIB-related protein family. Mol Cell Biol 23: 3274-3286

Lang BF, Burger G, O'Kelly CJ, Cedergren R, Golding GB, Lemieux C, Sankoff D, Turmel M, Gray MW (1997) An ancestral mitochondrial DNA resembling a eubacterial genome in miniature. Nature 387: 493-497

Legen J, Kemp S, Krause K, Profanter B, Herrmann RG, Maier RM (2002) Comparative analysis of plastid transcription profiles of entire plastid chromosomes from tobacco attributed to wild-type and PEP-deficient transcription machineries. Plant J 31: 171-188

Lerbs-Mache S (1993) The 110-kDa polypeptide of spinach plastid DNA-dependent RNA polymerase: single-subunit enzyme or catalytic core of multimeric enzyme complexes? Proc Natl Acad Sci U S A 90: 5509-5513

Levens D, Lustig A, Rabinowitz M (1981a) Purification of mitochondrial RNA polymerase from Saccharomyces cerevisiae. J Biol Chem 256: 1474-1481

Levens D, Morimoto R, Rabinowitz M (1981b) Mitochondrial transcription complex from Saccharomyces cerevisiae. J Biol Chem 256: 1466-1472

Liere K, Maliga P (1999) In vitro characterization of the tobacco rpoB promoter reveals a core sequence motif conserved between phage-type plastid and plant mitochondrial promoters. EMBO J 18: 249-257

Lovering R, Hanson IM, Borden KL, Martin S, O'Reilly NJ, Evan GI, Rahman D, Pappin DJ, Trowsdale J, Freemont PS (1993) Identification and preliminary characterization of a protein motif related to the zinc finger. Proc Natl Acad Sci U S A 90: 2112-2116

Lupold DS, Caoile AG, Stern DB (1999) The maize mitochondrial cox2 gene has five promoters in two genomic regions, including a complex promoter consisting of seven overlapping units. J Biol Chem 274: 3897-3903

Maier RM, Neckermann K, Igloi GL, Kossel H (1995) Complete sequence of the maize chloroplast genome: gene content, hotspots of divergence and fine tuning of genetic information by transcript editing. J Mol Biol 251: 614-628

Mangus DA, Jang SH, Jaehning JA (1994) Release of the yeast mitochondrial RNA polymerase specificity factor from transcription complexes. J Biol Chem 269: 26568-26574

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

Manthey GM, Przybyla-Zawislak BD, McEwen JE (1998) The Saccharomyces cerevisiae Pet309 protein is embedded in the mitochondrial inner membrane. Eur J Biochem 255: 156-161

Martin W (2003) The smoking gun of gene transfer. Nat Genet 33: 442

Martin W, Muller M (1998) The hydrogen hypothesis for the first eukaryote. Nature 392: 37-41

Masters BS, Stohl LL, Clayton DA (1987) Yeast mitochondrial RNA polymerase is homologous to those encoded by bacteriophages T3 and T7. Cell 51: 89-99

Matsuda N, Suzuki T, Tanaka K, Nakano A (2001) Rma1, a novel type of RING finger protein conserved from Arabidopsis to human, is a membrane-bound ubiquitin ligase. J Cell Sci 114: 1949-1957

Matsunaga M, Jaehning JA (2004a) A mutation in the yeast mitochondrial core RNA polymerase, Rpo41, confers defects in both specificity factor interaction and promoter utilization. J Biol Chem 279: 2012-2019

Matsunaga M, Jaehning JA (2004b) Intrinsic promoter recognition by a "core" RNA polymerase. J Biol Chem 279: 44239-44242

McCulloch V, Seidel-Rogol BL, Shadel GS (2002) A human mitochondrial transcription factor is related to RNA adenine methyltransferases and binds S-adenosylmethionine. Mol Cell Biol 22: 1116-1125

McCulloch V, Shadel GS (2003) Human mitochondrial transcription factor B1 interacts with the C-terminal activation region of h-mtTFA and stimulates transcription independently of its RNA methyltransferase activity. Mol Cell Biol 23: 5816-5824

McFadden GI (1999) Endosymbiosis and evolution of the plant cell. Curr Opin Plant Biol 2: 513-519

McMullin TW, Fox TD (1993) COX3 mRNA-specific translational activator proteins are associated with the inner mitochondrial membrane in Saccharomyces cerevisiae. J Biol Chem 268: 11737-11741

McMullin TW, Haffter P, Fox TD (1990) A novel small-subunit ribosomal protein of yeast mitochondria that interacts functionally with an mRNA-specific translational activator. Mol Cell Biol 10: 4590-4595

Mullet JE (1993) Dynamic regulation of chloroplast transcription. Plant Physiol 103: 309-313

Mulligan RM, Leon P, Walbot V (1991) Transcriptional and posttranscriptional regulation of maize mitochondrial gene expression. Mol Cell Biol 11: 533-543

Murakami S, Kondo Y, Nakano T, Sato F (2000) Protease activity of CND41, a chloroplast nucleoid DNA-binding protein, isolated from cultured tobacco cells. FEBS Lett 468: 15-18

Nakazono M, Ishikawa M, Yoshida KT, Tsutsumi N, Hirai A (1996) Multiple initiation sites for transcription of a gene for subunit 1 of F1-ATPase (atp1) in rice mitochondria. Curr Genet 29: 417-422

Neuburger M, Journet EP, Bligny R, Carde JP, Douce R (1982) Purification of plant mitochondria by isopycnic centrifugation in density gradients of Percoll. Arch Biochem Biophys 217: 312-323

Ogrzewalla K, Piotrowski M, Reinbothe S, Link G (2002) The plastid transcription kinase from mustard (Sinapis alba L.). A nuclear-encoded CK2-type chloroplast enzyme with redox-sensitive function. Eur J Biochem 269: 3329-3337

Ojala D, Montoya J, Attardi G (1981) tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria. Nature 290: 470-474

Palenik B (2002) The genomics of symbiosis: hosts keep the baby and the bath water. Proc Natl Acad Sci U S A 99: 11996-11997

Palmer JD (1990) Contrasting modes and tempos of genome evolution in land plant organelles. Trends Genet 6: 115-120

Parisi MA, Clayton DA (1991) Similarity of human mitochondrial transcription factor 1 to high mobility group proteins. Science 252: 965-969

Peeters N, Small I (2001) Dual targeting to mitochondria and chloroplasts. Biochim Biophys Acta 1541: 54-63

Peltier JB, Emanuelsson O, Kalume DE, Ytterberg J, Friso G, Rudella A, Liberles DA, Soderberg L, Roepstorff P, von Heijne G, van Wijk KJ (2002) Central functions of the lumenal and peripheral thylakoid proteome of Arabidopsis determined by experimentation and genome-wide prediction. Plant Cell 14: 211-236

Privat I, Hakimi MA, Buhot L, Favory JJ, Mache-Lerbs S (2003) Characterization of Arabidopsis plastid sigma-like transcription factors SIG1, SIG2 and SIG3. Plant Mol Biol 51: 385-399

Rapp WD, Lupold DS, Mack S, Stern DB (1993) Architecture of the maize mitochondrial atp1 promoter as determined by linker-scanning and point mutagenesis. Mol Cell Biol 13: 7232-7238

Rapp WD, Stern DB (1992) A conserved 11 nucleotide sequence contains an essential promoter element of the maize mitochondrial atp1 gene. EMBO J 11: 1065-1073

Raskin CA, Diaz GA, McAllister WT (1993) T7 RNA polymerase mutants with altered promoter specificities. Proc Natl Acad Sci U S A 90: 3147-3151

Reiss T, Link G (1985) Characterization of transcriptionally active DNA-protein complexes from chloroplasts and etioplasts of mustard (Sinapis alba L.). Eur J Biochem 148: 207-212

Rochaix JD (1996) Post-transcriptional regulation of chloroplast gene expression in Chlamydomonas reinhardtii. Plant Mol Biol 32: 327-341

Rodeheffer MS, Shadel GS (2003) Multiple interactions involving the amino-terminal domain of yeast mtRNA polymerase determine the efficiency of mitochondrial protein synthesis. J Biol Chem 278: 18695-18701

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

Rodermel S (2001) Pathways of plastid-to-nucleus signaling. Trends Plant Sci 6: 471-478

Rong M, He B, McAllister WT, Durbin RK (1998) Promoter specificity determinants of T7 RNA polymerase. Proc Natl Acad Sci U S A 95: 515-519

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

Rushlow KE, Orozco EM, Jr., Lipper C, Hallick RB (1980) Selective in vitro transcription of Euglena chloroplast ribosomal RNA genes by a transcriptionally active chromosome. J Biol Chem 255: 3786-3792

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T . Molecular Cloning: a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989

Sane AP, Stein B, Westhoff P (2005) The nuclear gene HCF107 encodes a membrane-associated R-TPR (RNA tetratricopeptide repeat)-containing protein involved in expression of the plastidial psbH gene in Arabidopsis. Plant J 42 (5): 720-730

Santis-MacIossek G, Kofer W, Bock A, Schoch S, Maier RM, Wanner G, Rudiger W, Koop HU, Herrmann RG (1999) Targeted disruption of the plastid RNA polymerase genes rpoA, B and C1: molecular biology, biochemistry and ultrastructure. Plant J 18: 477-489

Sato N (2001) Was the evolution of plastid genetic machinery discontinuous? Trends Plant Sci 6: 151-155

Sato N, Ohshima K, Watanabe A, Ohta N, Nishiyama Y, Joyard J, Douce R (1998) Molecular characterization of the PEND protein, a novel bZIP protein present in the envelope membrane that is the site of nucleoid replication in developing plastids. Plant Cell 10: 859-872

Sato N, Rolland N, Block MA, Joyard J (1999a) Do plastid envelope membranes play a role in the expression of the plastid genome? Biochimie 81: 619-629

Sato N, Terasawa K, Miyajima K, Kabeya Y (2003) Organization, developmental dynamics, and evolution of plastid nucleoids. Int Rev Cytol 232: 217-262

Sato S, Nakamura Y, Kaneko T, Asamizu E, Tabata S (1999b) Complete structure of the chloroplast genome of Arabidopsis thaliana. DNA Res 6: 283-290

Sazanov LA, Burrows PA, Nixon PJ (1998) The plastid ndh genes code for an NADH-specific dehydrogenase: isolation of a complex I analogue from pea thylakoid membranes. Proc Natl Acad Sci U S A 95: 1319-1324

Schinkel AH, Koerkamp MJ, Touw EP, Tabak HF (1987) Specificity factor of yeast mitochondrial RNA polymerase. Purification and interaction with core RNA polymerase. J Biol Chem 262: 12785-12791

Schluckebier G, Zhong P, Stewart KD, Kavanaugh TJ, Abad-Zapatero C (1999) The 2.2 A structure of the rRNA methyltransferase ErmC' and its complexes with cofactor and cofactor analogs: implications for the reaction mechanism. J Mol Biol 289: 277-291

Schmitz-Linneweber C, Maier RM, Alcaraz JP, Cottet A, Herrmann RG, Mache R (2001) The plastid chromosome of spinach (Spinacia oleracea): complete nucleotide sequence and gene organization. Plant Mol Biol 45: 307-315

Schubot FD, Chen CJ, Rose JP, Dailey TA, Dailey HA, Wang BC (2001) Crystal structure of the transcription factor sc-mtTFB offers insights into mitochondrial transcription. Protein Sci 10: 1980-1988

Serino G, Maliga P . RNA polymerase encoded by the plastid rpo genes are not shared with the nucleus plastid enzyme. Plant Physiology 1998: 117; 1165-1170

Shadel GS, Clayton DA (1995) A Saccharomyces cerevisiae mitochondrial transcription factor, sc-mtTFB, shares features with sigma factors but is functionally distinct. Mol Cell Biol 15: 2101-2108

Shadel GS, Clayton DA (1997) Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates. Annu Rev Biochem 66: 409-435

Shinozaki K, Ohme M, Tanaka M, Wakasugi T, Hayashida T, Matsubayashi T, Zaita N, Chunwongse J, Obokota J, Yamaguchi-Shinozaki K, Ohto C, Torazawa K, Meng B, Sugita M, Deno H, Kamogashira H, Yamada K, Kusuda J, Takaiwa F, Kato A, Shimada A, Suguira M . The complete nucleotide sequence of tobacco chloroplast genome: its organization and expression. EMBO J. 1986; 5; 2043-2049

Shirano Y, Shimada H, Kanamaru K, Fujiwara M, Tanaka K, Takahashi H, Unno K, Sato S, Tabata S, Hayashi H, Miyake C, Yokota A, Shibata D (2000) Chloroplast development in Arabidopsis thaliana requires the nuclear-encoded transcription factor sigma B. FEBS Lett 485: 178-182

Shuey DJ, Attardi G (1985) Characterization of an RNA polymerase activity from HeLa cell mitochondria, which initiates transcription at the heavy strand rRNA promoter and the light strand promoter in human mitochondrial DNA. J Biol Chem 260: 1952-1958

Silhavy D, Maliga P (1998a) Mapping of promoters for the nucleus-encoded plastid RNA polymerase (NEP) in the iojap maize mutant. Curr Genet 33: 340-344

Silhavy D, Maliga P (1998b) Plastid promoter utilization in a rice embryogenic cell culture. Curr Genet 34: 67-70

Sousa R (1996) Structural and mechanistic relationships between nucleic acid polymerases. Trends Biochem Sci 21: 186-190

Sousa R, Chung YJ, Rose JP, Wang BC (1993) Crystal structure of bacteriophage T7 RNA polymerase at 3.3 A resolution. Nature 364: 593-599

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

Spence J, Gali RR, Dittmar G, Sherman F, Karin M, Finley D (2000) Cell cycle-regulated modification of the ribosome by a variant multiubiquitin chain. Cell 102: 67-76

Stone SL, Hauksdottir H, Troy A, Herschleb J, Kraft E, Callis J (2005) Functional analysis of the RING-type ubiquitin ligase family of Arabidopsis. Plant Physiol 137: 13-30

Strand A, Asami T, Alonso J, Ecker JR, Chory J (2003) Chloroplast to nucleus communication triggered by accumulation of Mg-protoporphyrinIX. Nature 421: 79-83

Suck R, Zeltz P, Falk J, Acker A, Kossel H, Krupinska K (1996) Transcriptionally active chromosomes (TACs) of barley chloroplasts contain the alpha-subunit of plastome-encoded RNA polymerase. Curr Genet 30: 515-521

Sugiura M (1992) The chloroplast genome. Plant Mol Biol 19: 149-168

Suzuki JY, Ytterberg AJ, Beardslee TA, Allison LA, Wijk KJ, Maliga P (2004) Affinity purification of the tobacco plastid RNA polymerase and in vitro reconstitution of the holoenzyme. Plant J 40: 164-172

Swain M, Ross NW (1995) A silver stain protocol for proteins yielding high resolution and transparent background in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. Electrophoresis 16: 948-951

Tahirov TH, Temiakov D, Anikin M, Patlan V, McAllister WT, Vassylyev DG, Yokoyama S (2002a) Structure of a T7 RNA polymerase elongation complex at 2.9 A resolution. Nature 420: 43-50

Tao W, Levine AJ (1999) Nucleocytoplasmic shuttling of oncoprotein Hdm2 is required for Hdm2-mediated degradation of p53. Proc Natl Acad Sci U S A 96: 3077-3080

Tiranti V, Savoia A, Forti F, D'Apolito MF, Centra M, Rocchi M, Zeviani M (1997) Identification of the gene encoding the human mitochondrial RNA polymerase (h-mtRPOL) by cyberscreening of the Expressed Sequence Tags database. Hum Mol Genet 6: 615-625

Trifa Y, Privat I, Gagnon J, Baeza L, Lerbs-Mache S (1998) The nuclear RPL4 gene encodes a chloroplast protein that co-purifies with the T7-like transcription complex as well as plastid ribosomes. J Biol Chem 273: 3980-3985

Vauclare P, Diallo N, Bourguignon J, Macherel D, Douce R (1996) Regulation of the Expression of the Glycine Decarboxylase Complex during Pea Leaf Development. Plant Physiol 112: 1523-1530

Wang Y, Shadel GS (1999) Stability of the mitochondrial genome requires an amino-terminal domain of yeast mitochondrial RNA polymerase. Proc Natl Acad Sci U S A 96: 8046-8051

Waterhouse PM, Helliwell CA (2003) Exploring plant genomes by RNA-induced gene silencing. Nat Rev Genet 4: 29-38

Waterhouse PM, Wang MB, Lough T (2001) Gene silencing as an adaptive defence against viruses. Nature 411: 834-842

Wiesenberger G, Fox TD (1997) Pet127p, a membrane-associated protein involved in stability and processing of Saccharomyces cerevisiae mitochondrial RNAs. Mol Cell Biol 17: 2816-2824

Winkley CS, Keller MJ, Jaehning JA (1985) A multicomponent mitochondrial RNA polymerase from Saccharomyces cerevisiae. J Biol Chem 260: 14214-14223

Wise MJ, Tunnacliffe A (2004) POPP the question: what do LEA proteins do? Trends Plant Sci 9: 13-17

Yan B, Pring DR (1997) Transcriptional initiation sites in sorghum mitochondrial DNA indicate conserved and variable features. Curr Genet 32: 287-295

Yao J, Roy-Chowdhury S, Allison LA (2003) AtSig5 is an essential nucleus-encoded Arabidopsis sigma-like factor. Plant Physiol 132: 739-747

Yin YW, Steitz TA (2002) Structural basis for the transition from initiation to elongation transcription in T7 RNA polymerase. Science 298: 1387-1395

Zimmermann P, Hennig L, Gruissem W (2005) Gene-expression analysis and network discovery using Genevestigator. Trends Plant Sci 10: 407-409

Zimmermann P, Hirsch-Hoffmann M, Hennig L, Gruissem W (2004) GENEVESTIGATOR. Arabidopsis microarray database and analysis toolbox. Plant Physiol 136: 2621-2632

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

PUBLICATION

436–444 *Nucleic Acids Research, 2006, Vol. 34, No. 2*
doi:10.1093/nar/gkj451

Sub-plastidial localization of two different phage-type RNA polymerases in spinach chloroplasts

Jacinthe Azevedo, Florence Courtois and Silva Lerbs-Mache*

Laboratoire Plastes et différenciation cellulaire, Université Joseph Fourier and Centre National de la Recherche Scientifique, B.P. 53, 38041 Grenoble, France

Received November 23, 2005; Revised December 23, 2005; Accepted January 3, 2005

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

ABSTRACT

Plant plastids contain a circular genome of ~150 kb organized into ~35 transcription units. The plastid genome is organized into nucleoids and attached to plastid membranes. This relatively small genome is transcribed by at least two different RNA polymerases, one being of the prokaryotic type and plastid-encoded (PEP), the other one being of the phage-type and nucleus-encoded (NEP). The presumed localization of a second phage-type RNA polymerase in plastids is still questionable. There is strong evidence for a sequential action of NEP and PEP enzymes during plant development attributing a prevailing role of NEP during early plant and plastid development, although NEP is present in mature chloroplasts. In the present paper, we have analysed two different NEP enzymes from spinach with respect to subcellular and intra-plastidial localization in mature chloroplasts with the help of specific antibodies. Results show the presence of the two different NEP enzymes in mature chloroplasts. Both enzymes are entirely membrane bound but, unlike previously thought, this membrane binding is not mediated via DNA. This finding indicates that NEP enzymes are not found as elongating transcription complexes on the template DNA in mature chloroplasts and raises the question of their function in mature chloroplasts.

INTRODUCTION

The plastid genome is transcribed by at least three different RNA polymerases. According to their different coding origins these enzymes are called plastid-encoded plastid RNA polymerase (PEP) and nucleus-encoded plastid RNA polymerase (NEP). PEP is a multimeric enzyme of the prokaryotic type and NEP enzymes are monomeric enzymes of the phage-type (1–3). The number of genes coding for NEP enzymes differs in different plant species, e.g. only two genes have been reported for monocotyledons (4–6) and for the moss *Physcomitrella patens* (7,8), but three genes exist in dicotyledons like *Arabidopsis thaliana* (9,10) and, correspondingly, six genes have been reported in *Nicotiana tabacum*, a natural allotetraploid plant (11). The localization of the corresponding proteins is not yet clear and the functional significance for this multiplicity of enzymes is not well understood. Results using transit peptide-GFP fusion constructs are controversial. It had been shown for *Arabidopsis* that one of the three phage-type RNA polymerases (AtRPOT;3) is imported into chloroplasts, one (AtRPOT;1) is imported into mitochondria and the third one (AtRPOT;2) is targeted to the two organelles (9,10). The dual targeting of AtRPOT;2 has been recently contradicted by Kabeya and Sato (12) who showed exclusively mitochondrial localization of this enzyme. Again in contradiction to an exclusively mitochondrial localization of AtRPOT;2 are results obtained from characterization of knock-out mutants that show changes only in plastid gene expression but not in mitochondrial gene expression (13).

Also not clear is the nomenclature of these enzymes. In different papers, the mitochondrial enzyme is named RPOT;1 or RPOY or RPOTm. The plastid enzyme is named RPOT;3 or RPOZ or RPOTp, and the dual targeted enzyme is named RPOT;2 or RPOX. In the present paper, to assure easy understanding, we will use the nomenclature RPOTm (for mitochondrial enzyme), RPOTp (for plastid enzyme) and RPOTmp (for dual targeted enzyme; mitochondria and plastid).

On the biochemical level, chloroplast RNA polymerases have been characterized so far in two different ways. Either they have been purified as soluble enzymes from supernatants of osmotically shocked and sheared chloroplasts or as protein–DNA complexes (named TAC for transcriptionally active chromosome) after solubilization from plastid membranes by Triton X-100 treatment [for a review see (14)]. A large portion of this DNA-bound RNA polymerase activity can be released from the protein–DNA complexes by salt treatment; but part of the RNA polymerase activity remains tightly bound to DNA, even after high-salt treatment (15,16).

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +33 04 76 63 57 44; Fax: + 33 04 76 63 55 86; Email: silva.lerbs-mache@ujf-grenoble.fr

© The Author 2006. Published by Oxford University Press. All rights reserved.

The online version of this article has been published under an open access model. Users are entitled to use, reproduce, disseminate, or display the open access version of this article for non-commercial purposes provided that: the original authorship is properly and fully attributed; the Journal and Oxford University Press are attributed as the original place of publication with the correct citation details given; if an article is subsequently reproduced or disseminated not in its entirety but only in part or as a derivative work this must be clearly indicated. For commercial re-use, please contact journals.permissions@oxfordjournals.org

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

Soluble RNA polymerases have been characterized by antibody cross-reactions and by protein sequencing of polypeptides present in highly purified transcriptionally active extracts (17–20). These experiments have shown that PEP as well as NEP enzymes can be recovered in form of soluble enzymes from chloroplast extracts. On the other hand, the membrane bound part of the chloroplast enzymes has been much less characterized with respect to the RNA polymerases that are present. Although some major polypeptides have been enriched in purified TAC fractions, none of these polypeptides has been identified unambiguously as subunit of a RNA polymerase (15,16,21). Actually, only the presence of the α-subunit of PEP has been demonstrated in high-salt TAC complexes by immuno-cross-reaction (22) thus indicating the presence of PEP in membrane bound TAC complexes.

Also, the nature of membrane binding of transcriptionally active protein–DNA complexes is not yet clear. It is generally assumed that RNA polymerases are localized to plastid membrane fractions via anchoring of its DNA templates. DNA-binding proteins like PEND (plastid envelope DNA-binding protein) and MFP1 represent reliable candidates for anchoring plastid DNA to plastid membranes (envelopes or thylakoids, respectively) (23–25).

In order to get more information on NEP enzymes, in the present paper we characterize two NEP enzymes from spinach in more detail (accession nos Y18852 and Y18853). These two enzymes are homologous to the *Arabidopsis* RPOTp and RPOTmp enzymes, i.e. to the plastid located and to the presumably dual targeted NEP enzyme. By using specific peptide antibodies to each of these enzymes we address the questions of whether both NEP enzymes are localized in plastids and whether both (one) of the enzymes are (is) attached to plastid membranes.

MATERIALS AND METHODS

Cloning of the spinach *RPOTp* and *RPOTmp* cDNAs

The two cDNAs have been isolated from a commercially available Lamda ZAP®II Library (Stratagene). In a first step, 5000 phages have been screened using a PCR-amplified DNA fragment. Primers (5′-TCGTGGTCGGGCATATCC-3′ and 5′-CACCTTCCTTCCAGTGGC-3′) had been designed using the sequence of a gene fragment that had been communicated by A. Weihe. From this experiment, one clone corresponding to a partial sequence of *RPOTmp* was obtained. In a second step, this clone was used to re-screen the library and to obtain full-length clones of *RPOTmp* and *RPOTp*.

Building up the phylogenetic tree

Sequences have been aligned by Multalin (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_server.html) and gaps have been removed manually. Only the most conserved C-terminal 441 amino acids (Supplementary Figure 1S) have been selected for tree construction using the PHYLIP program. The alignment was reformatted in PHYLIP using the CLUSTALW program. Trees based on parsimony as well as on distance were constructed by Protpars and Protdist programs, respectively, which are available on the Pasteur server (http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/phylogeny/intro-uk.html). Distances have been obtained by the Jones–Taylor–Thornton Matrix and the phylogenetic tree was constructed by the neighbour-joining method. Bootstraps have been performed before each analysis. The numbers on the branches correspond to bootstrap confidence levels obtained for 100 replicates. Only values above 50 are indicated.

Antibody preparation and purification

Peptide antibodies have been prepared in rabbits by Eurogentec using their standard protocol. Peptides that have been used for RPOTmp and RPOTp antibody production are indicated in Figure 1B. To prepare antibodies against the α subunit of spinach PEP the following peptides have been used: H_2N-WKCVESRTDSKCL-$CONH_2$; H_2N-HAEENVNLEDNQHK VC-$CONH_2$. For purification of specific IgG fractions the corresponding peptides have been coupled to activated immunoaffinity supports (Bio-Rad) and the sera have been purified according to the supplier's protocol.

Protein analysis

Proteins have been isolated and analysed by western immunoblotting as described previously (26). Briefly, protein extracts were prepared according to Hurkman and Tanaka (27). Protein concentrations were determined by using the BioRad DC protein assay and BSA as standard. After separation of equal amounts of protein by SDS–PAGE and subsequent transfer to nitrocellulose membranes (Schleicher & Schuell) proteins were either stained by Ponceau S or analysed for antibody reaction using the ECL western blotting detection system (Amersham Biosciences).

Chloroplast sub-fractionation

All operations were carried out at 0–5°C. Intact chloroplasts were obtained from spinach leaves and purified by isopycnic centrifugation using Percoll gradients according to Douce and Joyard (28). Stroma, thylakoids and the envelope fractions were purified from lysed chloroplasts by sucrose gradient centrifugation as described in Douce *et al*. (29).

Preparation of mitochondria

All steps were carried out at 0–5°C. Intact mitochondria were prepared from spinach leaves by isopycnic centrifugation using self-generating Percoll gradients as described by Neuburger *et al*. (30). Mitochondria accumulate as a white tight band near the bottom of the gradient, whereas thylakoids remain near to the top of the gradient. Mitochondria were then concentrated by centrifugation and finally re-suspended in phosphate buffer (10 mM, pH 7.2) containing Mannitol (0.3 M), EDTA (1 mM) and DTT (1 mM).

Membrane washing and DNase treatment

Aliquots containing purified intact chloroplasts corresponding to 60 μg of chlorophyll were lysed in hypotonic medium (10 mM MOPS, pH 7.8; 4 mM $MgCl_2$; 1 mM phenylmethlysulfonyl fluoride) and centrifuged immediately at 35 000 *g* for 30 min. The pellets (which is still contaminated by soluble proteins) were re-suspended in hypotonic medium and treated in a final volume of 600 μl with different concentrations of DNase by gentle agitation at room temperature for 1 h. The DNase reaction was stopped by addition of 10 mM EDTA

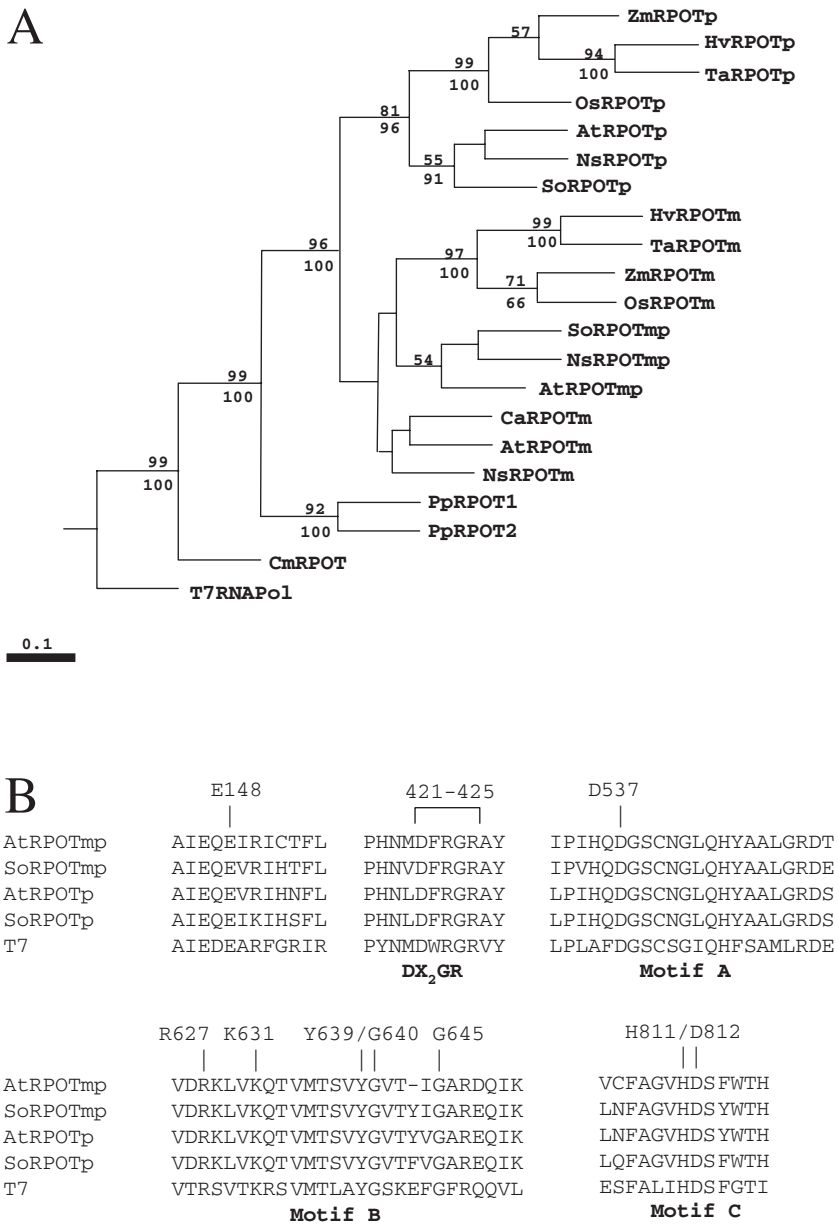


Figure 1. Sequence analyses of the two spinach plastid phage-type RNA polymerases. (**A**) Phylogenetic analysis of the two spinach enzymes. The alignment that has been used for tree construction is shown in Supplementary Figure 1S. The parsimony tree is shown including bootstrap confidence values obtained from parsimony (upper values) and neighbour-joining (lower values) analyses. (**B**) Conservation of functionally important amino acids and motifs in the two spinach phage-type RNA polymerases. Numbering on the top of the conserved sequence blocks indicate the position of the corresponding amino acid and annotations below the sequence blocks indicate the name of the corresponding motif in the T7 RNA polymerase sequence. Abbreviations and accession nos are At (*A.thaliana*, Y08463, Y08137, AJ001037), Ca (*Chenopodium album*, Y08067), Hv (*Hordeum vulgare*, HVU507395, AJ586899), Ns (*Nicotiana sylvestris*, AJ302020, AJ302019, AJ416568), Pp (*P.patens*, AJ416854, AJ416855), So (*Spinacia oleracea*, Y18852, Y18853), Ta (*Triticum aestivum*, U34402, AF091838), T7 (T7 RNA polymerase, AAB28111) and Zm (*Zea mays*, AF127022, AJ005343). The Cm (*C.merolae*) sequence has been obtained from the entry of the *Cyanidioschyzon* project page (CMJ257C) and the sequence has not yet been experimentally verified.

and reaction mixtures were centrifuged at 5000 *g* for 15 min. Proteins of the soluble fractions (S2, 4, 6 and 8) were precipitated by TCA (10% final volume) and directly solubilized in loading buffer for SDS–PAGE. Proteins of the pellets (M1, 3, 5 and 7) were solubilized in 20 µl of hypotonic medium. Aliquots corresponding to 7.5 µg of chlorophyll have been used for western immunoblotting. Chloroplast DNA degradation was controlled by analysing aliquots of the DNase treated membrane fractions (equivalent to 4 µg of chlorophyll) by gel electrophoretic separation on 0.8% agarose gels and ethidium bromide staining of DNA.

Thermolysin treatment

Thermolysin treatment was performed essentially as described by Joyard *et al.* (31). Briefly, the chlorophyll concentration of

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

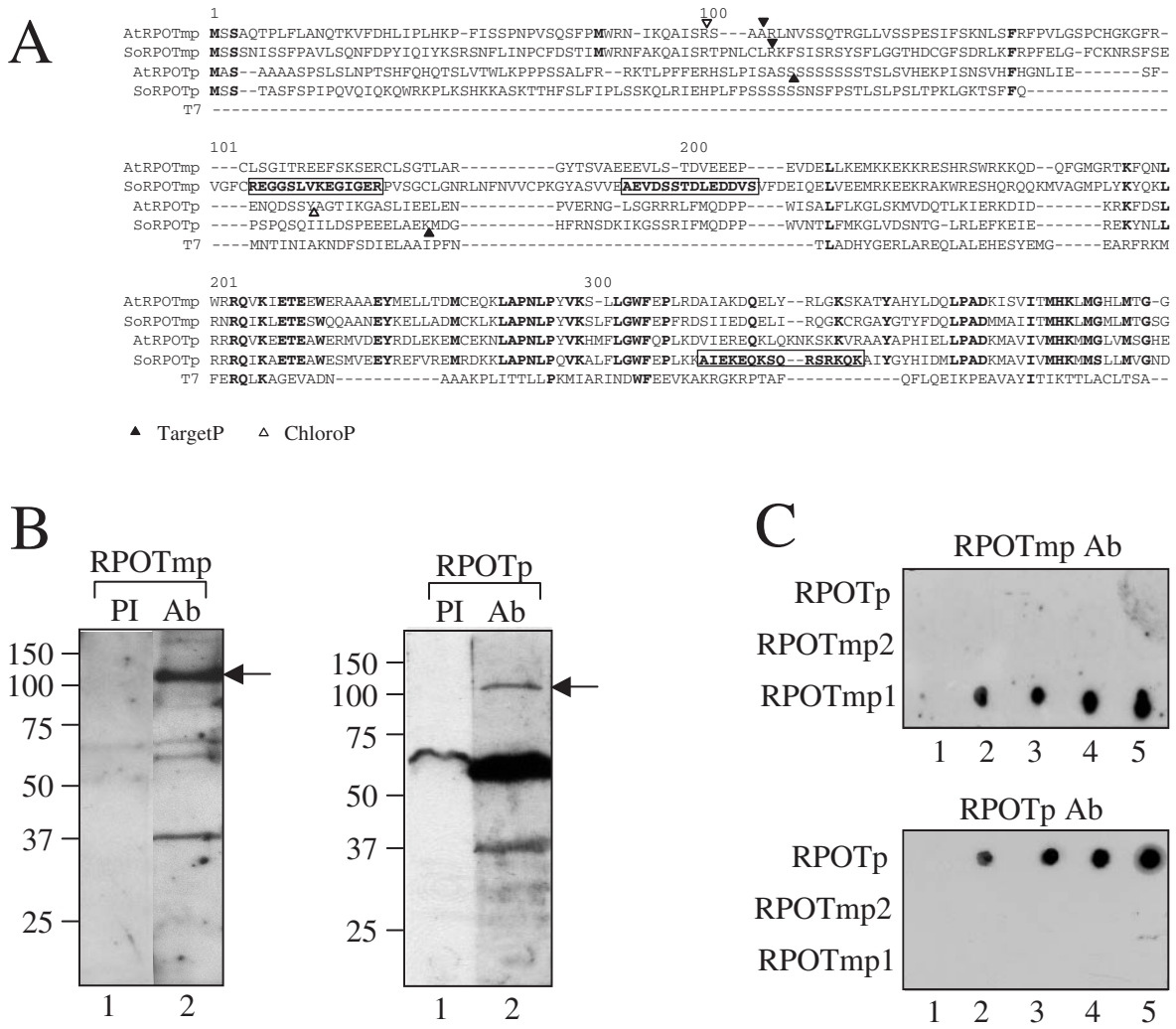


Figure 2. Characterization of RPOTp and RPOTmp specific antibodies. (**A**) Alignment of the N-terminal parts of the *Arabidopsis* and spinach RPOTmp and RPOTp amino acid sequences. Predicted target sequence cleavage sites are indicated by closed (TargetP) or open (ChloroP) triangles. In the case of SoRPOTmp and SoRPOTp, Target P and ChloroP indicate the same cleavage sites. Peptides that have been used for production of specific antibodies are boxed. (**B**) The antisera (lane 2) and the pre-immune sera (lane 1) of the RPOTmp (left panel) and RPOTp enzymes (right panel) have been analysed by immunoblotting using 40 µg of total spinach protein extracts. (**C**) The specificity of the RPOTmp and RPOTp antibodies has been verified by dot blot analyses on all three peptides. 5, 50, 100, 150 and 200 ng (lanes 1–5, respectively) of peptides (indicated as RPOTp, RPOTmp2 and RPOTmp1 on the left panel of the figure) have been spotted onto nitrocellulose filter and the antibody cross-reactions have been tested using purified antibodies, i.e. peptide specific IgG fractions of the RPOTmp (left) and RPOTp (right) antibodies.

isolated intact chloroplast was adjusted to 1 mg/ml. Plastids were incubated for 1 h at 4°C in buffer A [MOPS-NaOH, 10 mM, pH 7.8 containing 0.33 M of Sorbitol, 1 mM of $CaCl_2$ and different concentrations of thermolysin (Sigma)]. As control, EGTA had been added from the beginning to one of the reactions (10 mM final). All other reactions were stopped after 1 h by addition of EGTA (10 mM). All reactions are loaded on a Percoll cushion (40% in buffer A) and centrifuged at 5000 *g* (JS 7.5 rotor; Beckman) for 25 min in order to eliminate broken chloroplasts and thermolysin. The pellet of intact chloroplasts was re-suspended in buffer A and remaining Percoll was eliminated by dilution in 10 vol of buffer A and subsequent centrifugation (10 min at 3000 *g*). The pellet of intact chloroplasts was finally re-suspended in buffer A and sub-plastid fractions were obtained as described above.

RESULTS

Bioinformatic analysis of two different phage-type RNA polymerases from spinach

To get a first idea to which type of the enzymes, RPOTm, RPOTmp or RPOTp, the two spinach NEP sequences belong, we performed a phylogenetic analysis using hitherto known NEP sequences including monocotyledonous plants and the red alga *Cyanidioschyzon merolae*. Parsimony and neighbour-joining analyses have been used to construct the corresponding trees. Figure 1A shows the parsimony tree with bootstrap confidence values for branching above 50 out of 100 replicates using the two methods.

The tree shows distinct clades grouping plastid RPOTp(s) away from mitochondrial RPOTm(s) and RPOTmp(s). Within

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

the RPOTm/mp group only the monocotyledonous RPOTm enzymes form a solid clade. The two spinach phage-type enzymes analysed here group with RPOTp and RPOTm/RPOTmp, respectively. Although SoRPOTmp groups together with other RPOTmp(s) bootstrap values are not solid and do not permit clear separation of RPOTm(s) and RPOTmp(s).

The two *P.patens* RPOT sequences are clearly separated from *C.merolae* but are also not directly related to the plastid and mitochondrial groups. The two *P.patens* genes resulted probably from a duplication of an ancestral gene. The two proteins are located in mitochondria as shown recently using specific antibodies (12). Altogether, the phylogenetic data suggest that the plastid NEP appeared after the emergence of terrestrial plants as presented here by the bryophyte *P.patens*.

The predicted size of the two spinach phage-type RNA polymerases RPOTp (Y18853) and RPOTmp (Y18852) is about 101 and 111 kDa, respectively. Sequence alignment with T7 RNA polymerase shows that amino acids that have been shown previously by analysis of mutated T7 RNA polymerase to be important for RNA polymerase activity [D537, R627, Y639, G640, H811, D812; (32)], stabilization of the RNA:DNA hybrid during early stages of transcription initiation [motif DX2GR, residues 421–425; (33)], RNA binding [E148; (34)] and discrimination between NTPs and dNTPs [Y639; (35)] have been conserved (Figure 1B). This indicates that both spinach phage-type enzymes represent a priori transcriptionally active RNA polymerases.

Characterization of RPOTp and RPOTmp specific antibodies

Figure 2A shows the N-terminal part of the protein sequences of the *Arabidopsis* and spinach RPOTp and RPOTmp enzymes. In order to avoid immunological cross-reaction between the two enzymes immunogenic peptides have been designed in the least conserved parts of the protein sequences. The three peptides that are marked by open boxes have been chosen for antibody production. Two-peptides have been used to prepare antibodies against RPOTmp (Double X Program; Eurogentec) and one-peptide has been used to prepare antibodies against RPOTp. Both antibodies reveal polypeptides of about 110 kDa, i.e. of the expected size, but also some additional proteins of lower size are detected (Figure 2B). To reduce the unspecific reactions the antibodies have been purified on the corresponding peptides (Materials and Methods). After purification, the unspecific reactions are much reduced (data not shown).

To exclude cross-reaction between RPOTp and RPOTmp antibodies completely, both antibodies have been tested on different quantities of all three peptides that have been used for antibody production (Figure 2C). This experiment shows that only one of the two RPOTmp peptides has been immunoreactive, but both antibodies, anti-RPOTmp and anti-RPOTp, are completely specific.

Two phage-type RNA polymerases, RPOTp and RPOTmp, are localized in chloroplasts in mature spinach plants

Analysis of total, plastid and mitochondrial protein extracts by western immunoblotting reveals that both enzymes, RPOTp and RPOTmp, are exclusively localized in plastids. No immunoreactive protein could be detected in mitochondria (Figure 3). The purity of the mitochondrial and plastid fractions has been verified by antibody reaction using antibodies made against KARI [acetohydroxy acid reductoisomerase, (36)] as plastid control and anti-ProteinT antibodies as mitochondrial control (37). These control reactions show that the mitochondrial fraction is contaminated by plastids, but, importantly, the plastid fraction is not contaminated by mitochondria, i.e. the immunoreactive RPOTp and RPOTmp proteins that are present in the chloroplast fraction do not result from mitochondrial contamination.

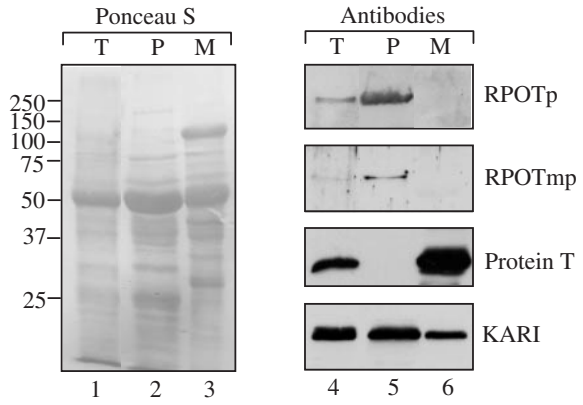


Figure 3. Both phage-type RNA polymerases, RPOTmp and RPOTp, are localized exclusively in plastids. Peptide specific IgG fractions have been obtained from the RPOTp and RPOTmp antisera as described in Materials and Methods. Equal amounts (40 µg) of total protein extracts (lanes 1 and 4), purified chloroplasts (lanes 2 and 5) and purified mitochondria (lanes 3 and 6) have been separated by PAGE. After transfer to nitrocellulose membranes the proteins have been stained by Ponceau S (lanes 1–3) or have been analysed by immunoblotting using antisera prepared against RPOTp, RPOTmp, ProteinT and KARI (lanes 4–6).

The two different plastid phage-type enzymes are membrane bound

Next we have analysed the sub-localization of the two NEP enzymes within plastids. To this aim, proteins of total chloroplast extract (P) have been separated together with proteins from soluble plastid extracts (S), thylakoid membranes (Tk) and envelope membranes (E) by SDS–PAGE. The corresponding fractions have been further characterized by immunoblotting using antibodies made against the plastid ribosomal protein L4 (38), the plastid inner envelope protein IE37 (39) and the membrane bound plastid terminal oxidase [PTOX, (40)] (Figure 4A). As expected, IE37 is only revealed in the envelope fraction and PTOX is only present in the thylakoid fraction thus indicating that the two membrane fractions, envelope and thylakoids, are not cross-contaminated. The r-protein L4, which has been shown recently to co-purify with the spinach T7-like transcription complex (41), is present in all fractions. The presence of L4 in the two membrane fractions might reflect the presence of membrane bound ribosomes and/or it might also reflect co-purification with at least one of the phage-type enzymes since analyses of the same fractions using the antibodies prepared against RPOTmp and RPOTp show that both enzymes are also present

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

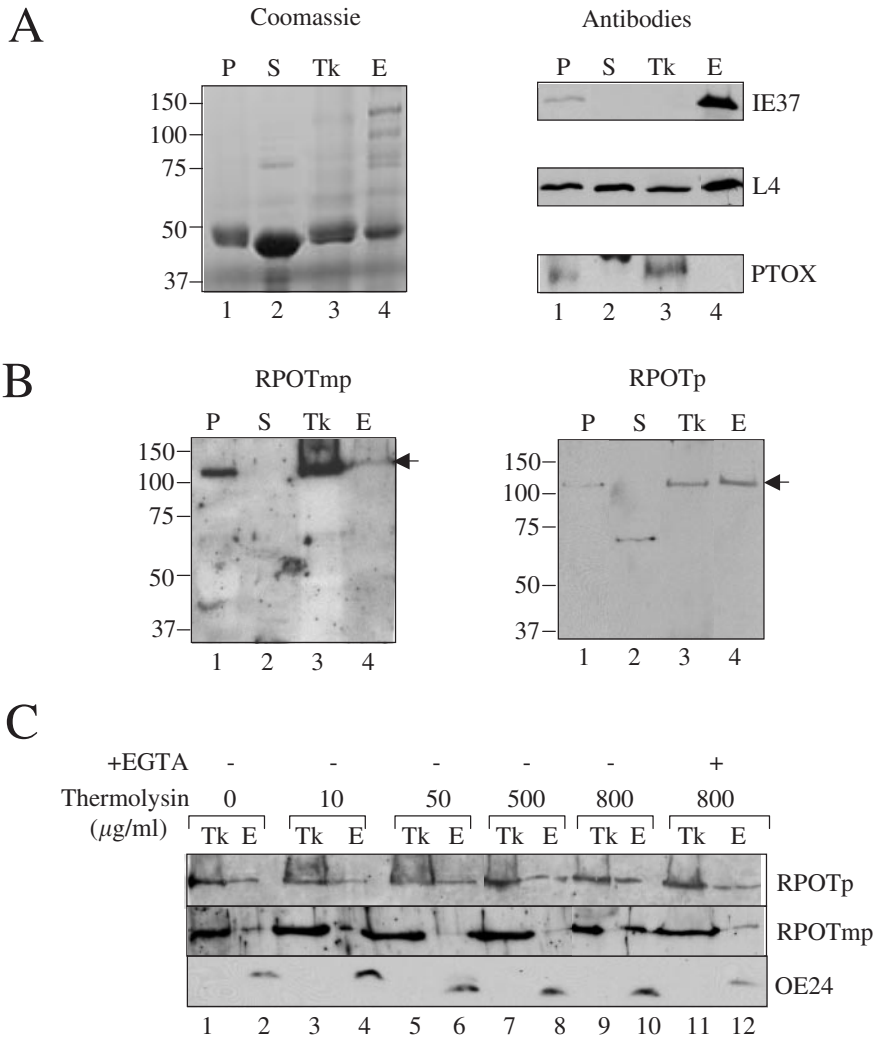


Figure 4. RPOTmp and RPOTp are bound to plastid thylakoid and envelope membranes. Aliquots (30 μg) of total chloroplast proteins (P), soluble chloroplast proteins (S), proteins obtained from purified thylakoid (Tk) and envelope (E) membranes have been separated by SDS–PAGE and transferred to nitrocellulose membranes. Membranes were analysed either (**A**) by staining with Coomassie (left panel) or by antibodies raised against plastid inner envelope protein IE37 (IE 37) plastid ribosomal protein L4 (L4) and plastid terminal oxidase (PTOX) (right panel) or (**B**) by purified anti-RPOTmp IgG (Figure 3B, left panel) and by purified anti-RPOTp IgG fractions (Figure 3B, right panel). (**C**) Aliquots of purified intact chloroplasts have been treated either with buffer (Co, lanes 1 and 2) or with different concentrations of thermolysin (lanes 3–12) in the absence (lanes 3–10) or in the presence (lanes 11 and 12) of EGTA (Materials and Methods). After purification of thylakoid and envelope fractions equal amounts of protein (30 and 15 μg, respectively) have been analysed by immunoblotting using antibodies made against RPOTp, RPOTmp and outer envelope protein 24 (OE24).

in thylakoids as well as envelopes (Figure 4B). The two phage-type enzymes are not present in the soluble protein fraction where the presence of L4 reflects probably the presence of ribosomes.

In order to verify whether the envelope-bound enzymes correspond to not yet imported precursor protein we performed thermolysin treatment of isolated plastids. After thermolysin digestion thylakoid and envelope fractions were analysed by western immunoblotting using RPOTp and RPOTmp specific antibodies (Figure 4C). Thermolysin is active in the range of 50–800 μg/ml as shown by the shortening of outer envelope protein 24 (lanes 6, 8 and 10; OE24) (30) and the addition of EGTA inhibits the cleavage reaction (lane 12). The two phage-type RNA polymerases, RPOTp and RPOTmp, do not disappear in the envelope fraction after treatment with thermolysin indicating that both enzymes are positioned at the inner face of the envelope and do not correspond to precursor proteins.

Membrane binding of the two NEP enzymes is not mediated via DNA

Having determined membrane localization of the two plastid phage-type enzymes we wanted to know whether the enzymes are localized to the membranes via the plastid DNA which is known to be attached to membranes. To answer this question we performed different DNase treatments of plastid membrane fractions (Figure 5). Different DNase concentrations have been used which all digest plastid DNA completely as shown by ethidium bromide staining after separation on agarose gels (Figure 5C, ptDNA). None of the three DNase

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

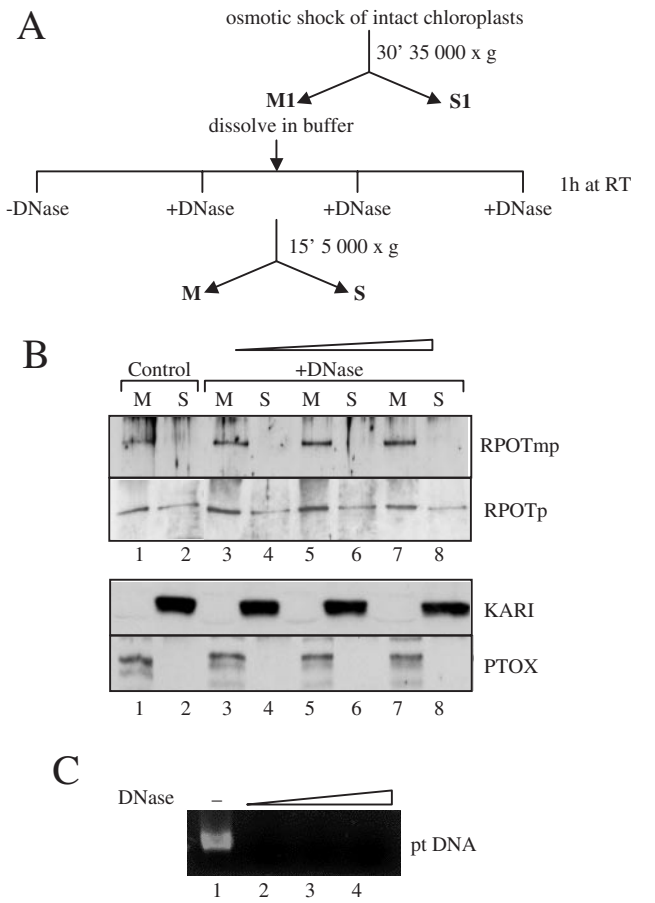


Figure 5. DNase treatment of purified plastid membrane fractions. (**A**) Schematic representation of the experiment. (**B**) Aliquots of fraction M1 corresponding to 60 µg of chlorophyll (A) have been re-suspended in low salt buffer. The solubilized membranes have been kept at room temperature for 1 h in the absence (−DNase, lanes 1 and 2) or presence (+DNase) of 7.5 µg (lanes 3 and 4), 15 µg (lanes 5 and 6) or 30 µg (lanes 7 and 8) of DNase before separating into membrane (M) and soluble (S) fractions by centrifugation. After separation of proteins by SDS–PAGE all fractions have been analysed using purified RPOTmp and RPOTp antibodies and antibodies made against the soluble plastid KARI and the membrane bound plastid terminal oxidase (PTOX). (**C**) DNase activity was verified by analysing the membrane fractions [M1, M3, M5 and M7, (A)] without (−, lane 1) and after DNase treatment (7.5, 15 and 30 µg of DNase, lanes 2–4, respectively) on agarose gels and staining the DNA by ethidium bromide.

concentrations used influence the membrane localization of the two NEP enzymes (Figure 5B, RPOTmp and RPOTp, upper panel) indicating that their membrane binding is not mediated via DNA. However, in contrast to RPOTmp that remains completely attached to the membrane fraction during the 1 h incubation period, RPOTp solubilizes partly from the membranes. As controls for the soluble and the membrane fractions, the stromal ketol-acid reductoisomerase (KARI) (36) and the membranous terminal oxidase (PTOX) (40) have been analysed by antibody reaction (Figure 5B, lower panel).

DISCUSSION

The existence in chloroplasts of a monomeric RNA polymerase that could be of the phage-type has been first demonstrated in 1993 (42). Later on, the cloning of cDNAs coding for phage-type enzymes confirmed their existence in monocotyledon as well as dicotyledon plants (4–11,43,44). But the function of the phage-type enzyme(s) in plastids is not yet clear. It is believed that phage-type enzymes are especially important during early phases of chloroplast differentiation and PEP represents the principal transcriptional activity in mature chloroplasts (45,46). Although NEP as well as PEP enzymes are present in mature chloroplasts (20,47), specific NEP transcriptional activity has not yet been isolated from mature chloroplasts (20) and transcripts, corresponding to transcription initiation on NEP promoters, are present only at a very low level in photosynthetically active tissues. Therefore, many NEP promoters have been mapped using either plant material in which the PEP transcription system is not functioning or largely reduced [for a review see (48)] or using *in vitro* transcription systems that have been established from PEP deficient plant material (49,50). The down-regulation of NEP transcriptional activity during chloroplast biogenesis might be due to direct binding of glutamyl-tRNA to the enzyme (51). However, the biological meaning of this down-regulation is not yet clear and the question of the function of phage-type enzymes in mature chloroplasts remains unanswered.

As a first step to characterize phage-type enzymes from green plant tissues biochemically we have produced specific antibodies against two spinach phage-type enzymes that should correspond to RPOTp and RPOTmp enzymes as revealed by amino acid sequence alignment of hitherto known phage-type enzymes (Figure 1). By using these antibodies we could demonstrate that both enzymes are present in mature chloroplasts. Regarding the contradiction concerning plastid localization of *Arabidopsis* RPOTmp that has been raised from the papers of Hedtke *et al*. (10) and Kabeya and Sato (12) our experiments confirm plastid localization of RPOTmp in mature leaf chloroplasts of higher plants (Figure 3). Whether the localization of RPOTmp in plastids varies between different higher plant species or whether the use of GFP fusion constructs to locate proteins might give unpredictable artefacts needs further investigation. Also, the fact that we could not detect RPOTmp in mitochondria does not exclude that the enzyme might be present in mitochondria in other developmental stages. However, at least one phage-type enzyme should be always present in mitochondria. Therefore, we suggest that a third enzyme, corresponding to RPOTm, should exist in spinach. The corresponding mRNA might be rare compared with *RpoTp* and *RpoTmp* since we could not isolate a third cDNA from the cDNA library that had been prepared from actively growing leaves (Lamda ZAP®II Library; Stratagene).

Sub-fractionation of purified spinach chloroplasts show further that both phage-type enzymes are membrane bound. They are associated to thylakoid membranes as well as to envelope membranes (Figure 4A and B). Envelope localization could correspond to un-cleaved precursor proteins that have not yet been imported into the plastid. However, the analysis of thylakoid and envelope fractions, isolated after thermolysin digestion of purified intact chloroplast, shows that the two envelope-associated RNA polymerases are not subject to digestion (Figure 4C). From this result we can conclude that RPOTp and RPOTmp are bound to the inner

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

face of the plastid envelope. To elucidate the functional implication(s) of either envelope or thylakoid membrane binding of the two phage-type RNA polymerases represents a challenge for future studies.

The affinity of the two different phage-type enzymes to the membranes seems to be different. While RPOTmp remains associated to the plastid membranes during a 1 h incubation period at room temperature, RPOTp solubilizes partly (Figure 5B). This difference might be used in further experiments to separate the two different enzymes for *in vitro* transcription studies. The question of how the two enzymes are attached to the membranes cannot be answered yet. Bioinformatic analyses of the amino acid sequences do not reveal transmembrane domains or hydrophobic motives that could indicate direct membrane binding of the enzymes. On the contrary to what was believed previously, the localization of the two phage-type enzymes to the membrane fraction is not mediated via template DNA. This could be shown by DNase treatment of the membrane fractions (Figure 5). From this result the question raises of whether these membrane bound NEP enzymes are engaged in transcription complexes in mature chloroplasts. Since NEP initiated transcripts are of very low abundance in mature chloroplasts, it is likely to assume that NEP enzymes are sequestered to membranes for (or after) inactivation.

Studies to analyse in which way the two phage-type enzymes are attached to the thylakoid membranes and whether they are transcriptionally active are currently under way in our laboratory.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Data are available at NAR Online.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank H. Pesey for excellent technical assistance. We would like to acknowledge the participation of J.-P. Alcaraz, M. Bligny, A. Weihe, T. Lagrange and T. Börner to the cloning and sequencing of the two spinach NEP cDNAs (see accession nos Y18852 and Y18853). Antibodies against KARI, ProteinT, PTOX, IE37 and OE24 were kindly provided by R. Dumas, J. Bourguignon, M. Kuntz and M. Block (IE37 and OE24), respectively. The work was financed by the European Community and funding to pay the Open Access publication charges for this article was also provided by the EC (FP6-2002-LifeSciHealth, PLASTOMICS, Proposal No. 503238).

Conflict of interest statement. None declared.

REFERENCES

1. Hess,R.W. and Börner,T. (1999) Organellar RNA polymerases of higher plants. *Int. Rev. Cytol.*, **190**, 1–59.
2. Liere,K. and Maliga,P. (2001) Plastid RNA polymerases in higher plants. In Aro,E.-M. and Andersson,B. (eds), *Regulation of Photosynthesis,* Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp. 29–49.
3. Cahoon,A.B. and Stern,D.B. (2001) Plastid transcription: a ménage à trios? *Trends Plant Sci.*, **6**, 45–46.
4. Chang,C.-C., Sheen,J., Niwa,Y., Lerbs-Mache,S. and Stern,D.B. (1999) Functional analysis of two Maize cDNAs encoding T7-like RNA polymerases. *Plant Cell*, **11**, 911–926.
5. Ikeda,T.M. and Gray,M.W. (1999) Identification and characterization of T3/T7 bacteriophag-like RNA polymerase sequences in wheat. *Plant Mol. Biol.*, **40**, 567–578.
6. Kusumi,K., Yara,A., Mitsui,N., Tozawa,Y. and Iba,K. (2004) Characterization of a rice nuclear-encoded plastid RNA polymerase gene *OsRpoTp*. *Plant Cell Physiol.*, **45**, 1194–1201.
7. Richter,U., Kiessling,J., Hedtke,B., Decker,E., Reski,R., Börner,T. and Weihe,A. (2002) Two *RpoT* genes of *Physcomitrella patens* encode phage-type RNA polymerases with dual targeting to mitochondria and plastids. *Gene*, **290**, 95–105.
8. Kabeya,Y., Hashimoto,K. and Sato,N. (2002) Identification and characterization of two phage-type RNA polymerase cDNAs in the moss *Physcomitrella patens*: implication of recent evolution of nuclear-encoded RNA polymerase of plastids in plants. *Plant Cell Physiol.*, **43**, 245–255.
9. Hedtke,B., Börner,T. and Weihe,A. (1997) Mitochondrial and chloroplast phage-type RNA polymerases in *Arabidopsis*. *Science*, **277**, 809–811.
10. Hedtke,B., Börner,T. and Weihe,A. (2000) One RNA polymerase serving two genomes. *EMBO Rep.*, **11**, 435–440.
11. Hedtke,B., Legen,J., Weihe,A., Herrmann,R.G. and Börner,T. (2002) Six active phage-type RNA polymerase genes in *Nicotiana tabacum*. *Plant J.*, **30**, 625–637.
12. Kabeya,Y. and Sato,N. (2005) Unique translation initiation at the second AUG codon determines mitochondrial localization of the phage-type RNA polymerases in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Physiol.*, **138**, 369–382.
13. Baba,K., Schmidt,J., Espinosa-Ruiz,A., Villarejo,A., Shiina,T., Gardeström,P., Sane,A.P. and Bhalerao,R.P. (2004) Organellar gene transcription and early seedling development are affected in the *rpoT;2* mutant of *Arabidopsis*. *Plant J.*, **38**, 38–48.
14. Igloi,G.L. and Kössel,H. (1992) The transcriptional apparatus of chloroplasts. *Crit. Rev. Plant Sci.*, **10**, 525–558.
15. Narita,J.O., Rushlow,K.E. and Hallick,R.B. (1985) Characterization of a *Euglena gracilis* chloroplast RNA polymerase specific for ribosomal RNA genes. *J. Biol. Chem.*, **260**, 11194–11199.
16. Lebrun,M., Briat,J.-F. and Laulhere,J.-P. (1986) Characterization and properties of the spinach chloroplast transcriptionally active chromosome isolated at high ionic strength. *Planta*, **169**, 505–512.
17. Lerbs,S., Bräutigam,E. and Partier,B. (1985) Polypeptides of DNA-dependent RNA polymerase of spinach chloroplasts: characterization by antibody-linked polymerase assay and determination of sites of synthesis. *EMBO J.*, **4**, 1661–1666.
18. Hu,J. and Bogorad,L. (1990) Maize chloroplast polymerase: The 180-, 120-, and 38-kilodalton polypeptides are encoded in chloroplast genes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **87**, 1531–1535.
19. Hu,J., Troxler,R.F. and Bogorad,B. (1991) Maize chloroplast RNA polymerase: the 78-kilodalton polypeptide is encoded by the plastid *rpoC1* gene. *Nucleic Acids Res.*, **19**, 3431–3434.
20. Bligny,M., Courtois,F., Thaminy,S., Chang,C.-C., Lagrange,T., Baruah-Wolff,J., Stern,D. and Lerbs-Mache,S. (2000) Regulation of plastid rDNA transcription by interaction of CDF2 with two different RNA polymerases. *EMBO J.*, **19**, 1851–1860.
21. Little,M.C. and Hallick,R.B. (1988) Chloroplast *rpoA*, *rpoB*, and *rpoC* genes specify at least three components of a chloroplast DNA-dependent RNA polymerase active in tRNA and mRNA transcription. *J. Biol. Chem.*, **263**, 14302–14307.
22. Suck,R., Zeltz,P., Falk,J., Acker,A., Kössel,H. and Krupinska,K. (1996) Transcriptionally active chromosome (TACs) of barley chloroplasts contain the α-subunit of plastome-encoded RNA polymerase. *Curr. Genet.*, **30**, 515–521.
23. Sato,N., Albrieux,C., Joyard,J., Douce,R. and Kuroiwa,T. (1993) Detection and characterization of a plastid envelope DNA-binding protein which anchor plastid nucleoids. *EMBO J.*, **12**, 555–561.
24. Sato,N., Ohshima,K., Watanabe,A., Ohta,N., Nishiyama,Y., Joyard,J. and Douce,R. (1998) Molecular characterization of the PEND protein, a novel bZIP protein present in the envelope membrane that is the site of nucleoid replication in developing plastids. *Plant Cell*, **10**, 859–872.
25. Young,S., Rose,A. and Meier,I. (2003) MFP1 is a thylakoid-associated, nucleoid-binding protein with a coiled-coil structure. *Nucleic Acids Res.*, **31**, 5175–5185.

26. Privat,I., Hakimi,M.-A., Buhot,L., Favory,J.-J. and Lerbs-Mache,S. (2003) Chracterization of *Arabidopsis* plastid sigma-like transcription factors SIG1, SIG2 and SIG3. *Plant Mol. Biol.*, **55**, 385–399.
27. Hurkman,W.J. and Tanaka,C.K. (1986) Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis. *Plant Physiol.*, **116**, 1209–1218.
28. Douce,R. and Joyard,J. (1982) Purification of the chloroplast. In Edelman,M., Hallick,R. and Chua,N.-H. (eds), *Methods in Chloroplast Molecular Biology*. Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam, pp. 239–256.
29. Douce,R., Holtz,R.B. and Benson,A.A. (1973) Isolation and properties of the envelope of spinach chloroplasts. *J. Biol. Chem.*, **25**, 7215–7222.
30. Neuburger,M., Journet,E.P., Bligny,R., Carde,J.P. and Douce,R. (1982) Purification of plant mitochondria by isopycnic centrifugation in density gradient percoll. *Arch. Biochem. Biophys.*, **217**, 312–323.
31. Joyard,J., Billecocq,A., Bartlett,S.G., Block,M.A., Chua,N.-H. and Douce,R. (1983) Localization of polypeptides to the cytosolic side of the outer envelope membrane of spinach chloroplasts. *J. Biol. Chem.*, **258**, 10000–10006.
32. Bonner,G., Patra,D., Lafer,E.M. and Sousa,R. (1992) Mutations in T7 RNA polymerase that support the proposal for a common polymerase active site structure. *EMBO J.*, **11**, 3767–3775.
33. Imburgio,D., Anikin,M. and McAllister,W.T. (2002) Effects of substitutions in a conserved DX2GR sequence motif, found in many DNA-dependent nucleotide polymerases, on transcription by T7 RNA polymerase. *J. Mol. Biol.*, **319**, 37–51.
34. He,B., Rong,M., Durbin,R.K. and McAllister,W.T. (1997) A mutant RNA polymerase that is defective in RNA binding and blocked in the early stages of transcription. *J. Mol. Biol.*, **265**, 275–288.
35. Sousa,R. and Padilla,R. (1995) A mutant T7 RNA polymerase as a DNA polymerase. *EMBO J.*, **14**, 4609–4621.
36. Dumas,R., Lebrun,M. and Douce,R. (1991) Isolation, characterization and sequence analysis of a full-length cDNA clone encoding acetohydroxy acid reductoisomerase from spinach chloroplasts. *Biochem. J.*, **277**, 469–475.
37. Vauclare,P., Diallo,N., Bourguignon,J., Macherel,D. and Douce,R. (1996) Regulation of the expression of the glycine decarboxylase complex during pea leaf development. *Plant Physiol.*, **112**, 1523–1530.
38. Trifa,Y., Privat,I., Gagnon,J., Baeza,L. and Lerbs-Mache,S. (1998) The nuclear *RPL4* gene encodes a chloroplast protein that co-purifies with the T7-like transcription complex as well as plastid ribosomes. *J. Biol. Chem.*, **273**, 3980–3985.
39. Block,M., Dorne,A.-M., Joyard,J. and Douce,R. (1983) Preparation and characterization of membrane fractions enriched in outer and inner envelope membranes from spinach chloroplasts. I. Electrophoretic and immunochemical analyses. *J. Biol. Chem.*, **258**, 13273–13280.
40. Josse,E.-M., Simkin,A.J., Gaffé,J., Labouré,A.-M., Kuntz,M. and Carol,P. (2000) A plastid terminal oxidase associated with carotenoid desaturation during chromoplast differentiation. *Plant Physiol.*, **123**, 1427–1436.
41. Trifa,Y., Privat,I., Gagnon,J., Baeze,L. and Lerbs-Mache,S. (1998) The nuclear *RPL4* gene encodes a chloroplast protein that co-purifies with the T7 transcription complex as well as plastid ribosomes. *J. Biol. Chem.*, **273**, 3980–3985.
42. Lerbs-Mache,S. (1993) The 110-kDa polypeptide of spinach plastid DNA-dependent RNA polymerase: single-subunit enzyme or catalytic core of multimeric enzyme complexes? *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **90**, 5509–5513.
43. Cermakian,N., Ikeda,T.M., Cedergren,R. and Gray,M.W. (1996) Sequence homologous to yeast mitochondrial and bacteriophage T3 and T7 RNA polymerases are widespread throughout the eukaryotic lineage. *Nucleic Acids Res.*, **24**, 648–654.
44. Weihe,A., Hedtke,B. and Börner,T. (1997) Cloning and characterization of a cDNA encoding a bacteriophage-type RNA polymerase from the higher plant *Chenopodium album*. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 2319–2325.
45. Mullet,J. (1993) Dynamic regulation of chloroplast transcription. *Plant Physiol.*, **103**, 309–313.
46. Maliga,P. (1998) Two plastid RNA polymerases of higher plants: an evolving story. *Trends Plant Sci.*, **3**, 4–6.
47. Iratni,R., Baeza,L., Andreeva,A., Mache,R. and Lerbs-Mache,S. (1994) Regulation of rDNA transcription in chloroplasts: promoter exclusion by constitutive repression. *Genes Dev.*, **8**, 2928–2938.
48. Weihe,A. and Börner,T. (1999) Transcription and the architecture of promoters in chloroplasts. *Trend Plant Sci.*, **4**, 169–170.
49. Kapoor,S. and Sugiura,M. (1999) Identification of two essential sequence elements in the nonconsensus type II *PatpB-290* plastid promoter by using plastid transcription extracts from cultures tobacco BY-2 cells. *Plant Cell*, **11**, 1799–1810.
50. Liere,K. and Maliga,P. (1999) *In vitro* characterization of the tobacco *rpoB* promoter reveals a core sequence motif conserved between phage-type plastid and plant mitochondrial promoters. *EMBO J.*, **18**, 249–257.
51. Hanaoka,M., Kanamaru,K., Fujiwara,M., Takahashi,H. and Tanaka,K. (2005) Glutamyl-tRNA mediates a switch in RNA polymerase use during chloroplast biogenesis. *EMBO Rep.*, **6**, 545–550.

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

tel-00011722, version 1 - 3 Mar 2006

Résumé :

Les ARN polymérases de type phagique, codées dans le noyau (NEP ; Nuclear Encoded RNA Polymerase), assurent une partie de la transcription du génome plastidial des végétaux supérieurs. Ces travaux mettent en évidence l'existence d'une nouvelle famille de protéines d'*A. thaliana* susceptibles d'interagir avec les NEP des plantes dicotylédones : les protéines NIP (NEP Interacting Protein). Les protéines NIP sont retrouvées uniquement dans les végétaux supérieurs et leur synthèse est dépendante de la lumière. Elles présentent un domaine d'interaction protéine-protéine RING finger en C-terminal. Nous avons montré pour la première fois par immunodétection que ces protéines sont intégrées aux membranes thylacoïdiennes et qu'elles retiennent probablement les NEP plastidiales à la surface de la membrane. Cette interaction avec les membranes pourrait apporter une nouvelle vision du fonctionnement des NEP dans le chloroplaste des plantes dicotylédones.

Abstract:

The phage-like RNA polymerases, encoded in thenucleus (NEP ; Nuclear Encoded RNA Polymerase) ensure partially plastidial genome transcription in higher plants. This work underlined the existence of a new protein family potentially able to interact with NEP in dicotyledon plants: NIP proteins (NEP Interacting Protein). NIP proteins are only present in higher plants and their synthesis is light dependant. Their C-terminal region presents a RING finger protein-protein interacting domain. Using immundetection, we show the first time that NIP proteins are integrated into thylakoid membranes, keeping probably NEP close to the membrane on the stroma side. This association to membranes offers new insights into NEP activity in chloroplasts of dicotyledon plants.