



HAL
open science

In vivo study of the Protochlorophyllide Oxydoreductase A function in *Arabidopsis thaliana*

Laurence Bolling

► **To cite this version:**

Laurence Bolling. In vivo study of the Protochlorophyllide Oxydoreductase A function in *Arabidopsis thaliana*. Biologie végétale. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2007. Français. NNT: . tel-00256027

HAL Id: tel-00256027

<https://theses.hal.science/tel-00256027>

Submitted on 14 Feb 2008

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

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

Université Joseph Fourier-Grenoble I
Ecole doctorale Chimie et Sciences du vivant

**Etude *in vivo* de la fonction de
la Protochlorophyllide Oxydoreductase A
chez *Arabidopsis thaliana***

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER

Discipline : BIOLOGIE VEGETALE

Présentée et soutenue publiquement par

Laurence BOLLING

le 15 novembre 2007

Directeur de thèse : Pr. Steffen Reinbothe

Composition du jury :

Pr. Michel Robert-Nicoud	Président
M Laurent Nussaume	Rapporteur
M Thierry Lagrange	Rapporteur
Pr. Steffen Reinbothe	Directeur de thèse

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Monsieur Robert-Nicoud d'avoir accepté de présider mon jury de thèse et Messieurs L. Nussaume et T. Lagrange pour avoir accepté de prendre de leur temps pour estimer mon travail.

Je tiens également à remercier Monsieur M. Herzog de m'avoir accueillie dans son laboratoire et de m'avoir accordé sa confiance dès le départ.

Ce travail n'aurait pu être réalisé sans l'énergie, la confiance et le soutien de ceux qui ont réellement été là pour moi jour après jour : Gabrielle et Jean-Marc. Un grand merci à vous deux, mais aussi à tous ceux qui ont su partager leur optimisme, leur volonté, leurs connaissances et parfois même leur amitié. Comme bien d'autre thésard avant moi, je crois que cent fois j'aurais pu renoncer, mais on dit toujours qu'une thèse c'est aussi une histoire humaine. Je n'ai pu que le vérifier. Merci à Florence, Emeline, Emilie, Joël, Jean-Pierre. Et même si je ne peux tous vous citer, sachez que tous avez été là, chacun le jour où il fallait, quand il le fallait.

Je profiterais de ces quelques lignes pour remercier mes parents, mon frère et mon père pour leur confiance, leur soutien et leur amour. Merci aussi à mes amies qui ont toujours été là malgré la distance et les vies qui se remplissent.

Merci à celui qui partage ma vie, à celui qui ne cesse de croire en moi chaque instant et qui m'offre le bonheur simple et pourtant si délicat de l'amour. Merci à toi, Régis.

Liste d'abréviations

aa :	acide aminé
ADN :	Acide Résoxyribo-Nucléotide
ADNc :	ADN complémentaire
5-ALA :	Acide δ -aminolévulinique
APS :	Ammonium Persulfate
ARN :	Acide RiboNucléotide
ARNm :	ARN messenger
ATP :	Adénosine TriPhosphate
BET :	Bromure d'éthidium
BSA :	Serum Albumine Bovine
Chl :	Chlorophylle
Chlide :	Chlorophyllide
cpm :	Coups Par Minute
cM :	centiMorgan
CTAB :	bromure d'hexadécyltriméthylammonium
DEPC :	diethylpyrocarbonate
DMF :	diméthylformamide
dNTP :	désoxyribonucléotide
ECL :	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA :	acide éthylène-diamine-tétraacétique
GFP :	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GTP :	Guanosine TriPhosphate
HPLC :	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HRP :	<i>Horseradish Peroxidase</i>
IgG :	Immunoglobuline
kDa :	kilo Dalton
LB :	<i>Luria Broth</i>
MES :	Monohydrate N-(Morpholino)ethanesulfonic acid
min :	minute(s)
MS :	sels <i>Murachig-Skoog</i>
NASC :	Nottingham Arabidopsis Stock Center
OligodT :	Oligodésoxyribonucléotide
pb :	Paire de Bases
Pchlde :	Protochlorophyllide
PCR :	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
POR :	Protochlorophyllide-Oxydoréductase
PSI :	Photosystème I
PSII :	Photosystème II
rpm :	rotation par minute
RT :	Rétro-Transcription
SSC :	tampon Salin au Citrate de Sodium
TAE :	tampon Tris-Acétate-EDTA
TBE :	tampon Tris-Borate-EDTA
TBS :	Tris-Buffered Saline
TIC :	<i>Translocon of the Inner membrane of Chloroplast</i>
Tm :	Temperature d'hybridation
TNE :	tampon Tris-NaCl-EDTA
TOC :	<i>Translocon of the Outer membrane of Chloroplast</i>

Table des matières

INTRODUCTION	1
1. Le plaste	1
1.1 Origine et évolution des plastes.....	1
1.2 Différents types de plastes pour de multiples fonctions	2
a. Les étioplastes	2
b. Les chloroplastes	3
c. Autres types de Plastes	4
1.3 La communication plaste-noyau	5
2. La voie de biosynthèse de la chlorophylle et ses régulations	6
2.1 Etapes de la voie de biosynthèse de la chlorophylle.....	6
2.2 La régulation de la voie de biosynthèse de la chlorophylle.....	11
▪ La régulation de l'activité de la Glutamate-tRNA réductase (GluTR).....	11
▪ La réduction de la Pchlde en Chlide	12
▪ Le cycle de la chlorophylle.....	12
3. Une étape clé de la voie de biosynthèse : la réduction de la protochlorophyllide	13
3.1 Deux voies de réduction de la Protochlorophyllide coexistent.	14
a. La voie lumière-indépendante	14
b. La voie lumière-dépendante	15
c. Choix évolutifs	15
3.2 Mécanisme réactionnel de la réduction de la Pchlde par POR.....	16
a. Caractéristiques structurales de POR	16
b. Activité enzymatique de POR.....	18
4. Mise en place d'une POR fonctionnelle <i>in planta</i>	19
4.1 Organisation et expression des gènes <i>POR</i>	19
▪ Plusieurs isoformes de l'enzyme peuvent coexister au sein d'une même espèce.....	20
▪ L'expression des gènes <i>POR</i> est régulée par la lumière lors du dé-étiolement.....	24
<i>Expression des gènes POR chez Arabidopsis</i>	25
4.2 Import de la Pchlde-Oxydoreductase dans les plastes	26
a. Le système d'import général TIC/TOC	26
b. Les deux voies d'import de pPORA.....	28
4.3 Localisation et organisation de POR dans les plastes.	30
a. Au sein des étioplastes	30
b. Au sein des chloroplastes	32
4.4 Rôle des différents isoformes de POR chez <i>A. thaliana</i>	34

CHAPITRE I : ETUDE DE L'EXPRESSION DES GENES *POR* CHEZ *Arabidopsis thaliana* 37

1. <u>Expression des gènes et des protéines POR au cours du développement</u>	37
1.1 Germination à l'obscurité : la skotomorphogenèse	37
1.2 Transition de l'obscurité à la lumière : le dé-étiolement	41
1.3 Développement à la lumière : la photomorphogenèse	43
a. Germination et développement de la jeune plante	43
b. De la plantule à la plante mature	46
2. <u>Patron d'expression des gènes et des protéines POR dans les organes de la plante en développement</u>	48
3. <u>Modulation de l'expression des gènes et protéines POR en fonction de l'intensité lumineuse</u>	51

CHAPITRE II : CARACTERISATION DE MUTANT *por* D'*Arabidopsis thaliana* ... 55

1. <u>Mutant d'insertion <i>porA-Salk</i></u>	56
1.1 <u>Caractérisation moléculaire du mutant <i>porA-Salk</i></u>	56
a. Présentation du mutant <i>porA-Salk</i> (Salk_036137)	56
b. Isolement de plantes homozygotes <i>porA-Salk</i>	57
c. Description phénotypique	57
d. Vérification du nombre d'insertions par Southern-blot	59
1.2 <u>Analyses d'expression</u>	60
a. Analyse par RT-PCR semi-quantitative et quantitative	61
b. Analyse par Western-blot.....	66
2. <u>Mutant d'insertion <i>porA-Ds</i></u>	68
2.1 <u>Caractérisation moléculaire du mutant <i>porA-Ds</i></u>	68
a. Présentation du mutant <i>porA-Ds</i>	68
b. Développement du mutant <i>porA-Ds</i>	69
c. Test de résistance à la kanamycine	70
d. Détermination du nombre d'insertions par Southern-blot	72
2.2 <u>Analyse d'expression de la protéine PORA chez le mutant <i>porA-Ds</i></u>	73
3. <u>Obtention d'un double mutant <i>porA-Ds * porB-Salk</i></u>	74
3.1 <u>Description du mutant <i>porB-Salk</i></u>	74
3.2 <u>Création d'un double mutant <i>porA*porB</i></u>	78

Chapitre III : Etude fonctionnelle de la protéine PORA *in vivo*81

1. <u>Rôle de la protéine PORA lors de la skotomorphogenèse et du dé-étiolement</u>	81
▪ Expérience de dé-étiolement	83
▪ Test de photoblanchiment.....	85

2. Rôle de la protéine PORA dans le développement de la plante d'<i>Arabidopsis</i> à la lumière	90
2.1 Implication de la protéine PORA lors de la germination.....	90
2.2 Implication de la protéine PORA dans le développement post-germinatif.....	93
a. Développement du mutant <i>porA-Ds</i>	93
b. Essai de complémentation de la lignée <i>porA-Ds</i>	96
c. Etudes complémentaires portant sur le mutant <i>porA-Ds</i>	100
▪ Dosage des pigments par HPLC.....	101
▪ Détermination de l'efficacité photosynthétique	104
Discussion	107
Matériels et méthodes	116
1. Souches bactériennes, plasmides et techniques de clonage	116
1.1 Génotype, milieux et conditions de culture.....	116
1.2 Constructions plasmidiques et techniques de clonage.....	116
2. Matériel végétal et conditions de culture	118
2.1 Ecotypes et allèles mutants.....	118
2.2 Culture en terre	118
2.3 Culture <i>in vitro</i>	118
2.4 Conditions de culture	119
2.5 Test de photoblanchiment	119
3. Manipulations génétiques des plantes	120
3.1 Fécondation croisée.....	120
3.2 Transformation stable	120
a. Transformation par « <i>floral dip</i> »	120
b. Sélection des transformants	121
4. Analyse des acides nucléiques	121
4.1 ADN	121
a. Extraction d'ADN génomique	121
b. Southern Blot.....	122
▪ Digestion de l'ADN génomique	122
▪ Marquage radioactif de la sonde, purification et quantification.....	122
▪ Hybridation et révélation	123
4.2 ARN	124
a. Extraction des ARN totaux d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	124
b. Traitement à la DNase I	124
c. RT-PCR semi-quantitative	124
▪ Rétro-transcription (RT).....	124
▪ PCR	124
d. RT-PCR quantitative en temps réel	125
▪ Choix des oligonucléotides	125
▪ Réaction de PCR quantitative	125
▪ Analyse des résultats et quantification.....	127

5. <u>Analyse des protéines</u>	127
5.1 <u>Extraction des protéines</u>	127
5.2 <u>Gel et électrophorèse</u>	127
5.3 <u>Transfert sur membrane (Western-blot)</u>	129
5.4 <u>Révélation immunologique de la membrane</u>	129
6. <u>Dosage et analyse des pigments</u>	130
6.1 <u>Spectrophotométrie</u>	130
6.2 <u>HPLC</u>	130
a. <u>Préparation des échantillons</u>	130
b. <u>Extraction des pigments</u>	131
c. <u>Dosage et analyse des pigments</u>	131
7. <u>Mesure de fluorescence de la chlorophylle</u>	131
8. <u>Microscopie électronique</u>	132
8.1 <u>Fixation</u>	132
8.2 <u>Inclusion et observation</u>	133
9. <u>Analyse bio-informatique</u>	133

ANNEXES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Organites caractéristiques des végétaux, les chloroplastes jouent un rôle fondamental dans le fonctionnement de la cellule hôte, principalement par le biais de la photosynthèse qui confère l'autotrophie aux plantes. La mise en place de l'appareil photosynthétique dépend notamment de la présence de chlorophylle. La voie de biosynthèse de ce composé est un processus aux régulations multiples qui fait intervenir de nombreuses enzymes, dont la Protochlorophyllide-Oxydoréductase (POR) qui a été l'objet de ce travail. Cette enzyme, qui catalyse la pénultième étape de la voie de biosynthèse de la chlorophylle de façon lumière-dépendante, possède des caractéristiques moléculaires et biochimiques particulières qui seront détaillées au cours de cette introduction.

1. Le plaste

1.1 Origine et évolution des plastes

Résultant de l'endocytose d'une cyanobactérie ancestrale photosynthétique par une cellule hôte eucaryote il y a plus d'un milliard d'années (Dyall *et al.*, 2004), les plastes ont acquis au cours de l'évolution un rôle fondamental dans le fonctionnement de la cellule hôte. Siège de la photosynthèse, ils sont aussi responsables de nombreux autres processus métaboliques comme la synthèse de tétrapyrolles, de lipides, d'amidon ou encore de la plupart des acides aminés.

La transformation des cyanobactéries symbiotiques en organelles s'est accompagnée d'une profonde restructuration de leur génome. Ce dernier a été considérablement réduit par transfert progressif de gènes vers le génome nucléaire, qui « centralise » ainsi les informations génétiques permettant une régulation métabolique efficace au sein de la cellule. Une comparaison du génome plastidial actuel avec celui de l'organisme le plus proche de l'ancêtre symbiote laisse supposer que seuls 2 à 5% des gènes ancestraux ont été maintenus dans le génome chloroplastique actuel (Martin and Herrmann, 1998). Ce transfert de gènes implique en retour la mise en place d'un système d'import pour que les protéines plastidiales, désormais codées par le noyau, puissent être adressées au plaste et assurer leurs fonctions (voir § 4.2 de l'Introduction). Ce système d'import composé d'éléments procaryotes et

eucaryotes est une des évolutions majeures suivant l'intégration de l'endosymbionte (Cavalier-Smith, 2000).

Un autre élément illustrant cette co-évolution est le contrôle de la division des plastes. L'élongation de la cellule lors de la croissance s'accompagne généralement d'une augmentation du nombre de plastes par division binaire des plastes photosynthétiques pré-existants (Pyke, 1999). Cette division est contrôlée par une combinaison de protéines eucaryotes et procaryotes, permettant à la cellule hôte de réguler le nombre de plastes en fonction des besoins de la cellule (Aldridge *et al.*, 2005).

Les plastes sont dotés d'une double membrane lipidique, ou enveloppe. L'espace interne contenu par ces membranes, le stroma, peut contenir différentes structures et réseaux membranaires qui peuvent se développer au sein du stroma selon le type de plaste. On y trouve également plusieurs copies du génome plastidial (ADN circulaire d'environ 120 kb) ainsi que toute la machinerie de transcription/traduction nécessaire à son expression (Stern *et al.*, 1997), faisant du plaste un organite semi-autonome.

1.2 Différents types de plastes pour de multiples fonctions

Plusieurs types de plastes existent possédant chacun une fonction principale qui leur est propre : étioplaste, chloroplaste, chromoplaste, amyloplaste et leucoplaste. La plupart sont issus de la différenciation de proplastides, présents dans les cellules méristématiques à raison d'une vingtaine par cellule. Des interconversions entre types de plaste peuvent également avoir lieu. Dans les deux cas, la différenciation vers un type en particulier dépend du tissu ou de l'organe auquel la cellule appartient.

a. Les étioplastes

Les étioplastes sont des proplastides différenciés en absence de lumière. Les structures membranaires internes y sont peu abondantes (prothylacoïdes), contrastant avec des structures paracrystallines majoritaires constituées de protéines, de pigments et de lipides appelées « corps prolamellaires » (Figure 1-A – cf. § 4.3). Ces structures optimisent l'absorption des photons lors du passage à la lumière. Ce type de plastes se rencontre généralement lors d'un développement à l'obscurité (skotomorphogenèse), notamment dans le cas d'une germination sous terre ou sous un couvert végétal. A titre d'exemple, la plantule d'*A.thaliana* étiolée se

caractérisé par un hypocotyle long, terminé par une crosse apicale supportant des cotylédons jaunes et fermés (Figure 1-B). Lorsqu'un signal lumineux est perçu, les étioplastes se différencient en chloroplastes, la croissance de l'hypocotyle est inhibée alors que la crosse apicale s'ouvre et que les cotylédons se déploient en même temps qu'ils verdissent (dé-étiolement).

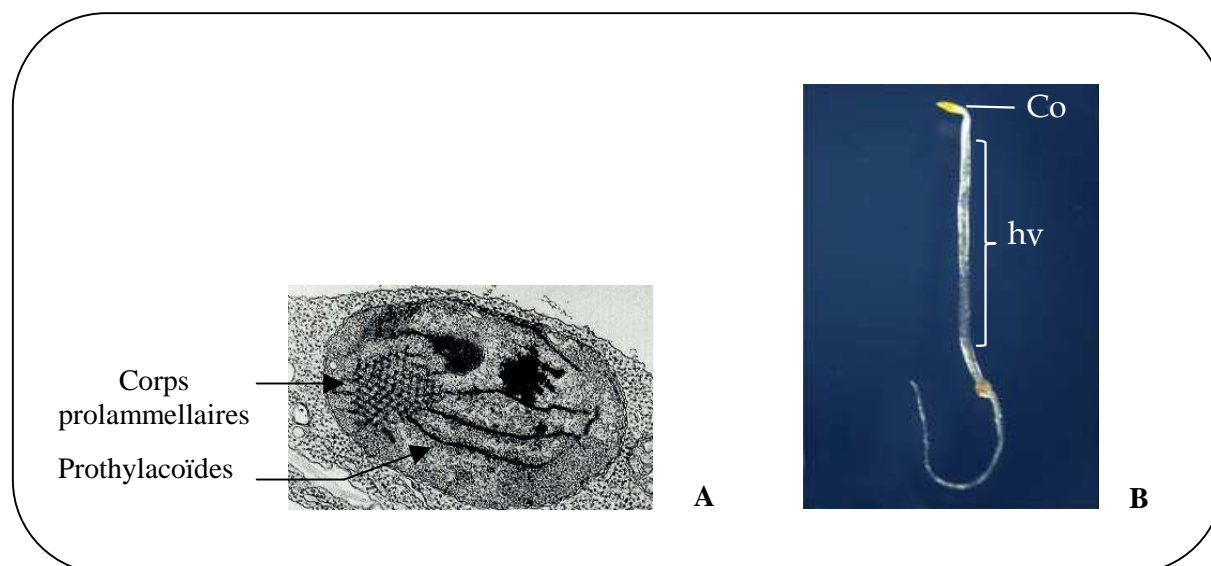


Figure 1 : Caractéristiques d'un développement à l'obscurité.

A. Ultrastructure d'un étioplaste de cotylédon en microscopie électronique à transmission. Origine A. Springer. **B.** Phénotype étioilé d'une plantule d'*A.thaliana* ayant germée à l'obscurité. Cot : cotylédons. Hyp : hypocotyle. Origine de la photographie F.Bühr.

b. Les chloroplastes

En présence de lumière, les proplastides se différencient en chloroplastes dans les tissus chlorophylliens (tige, feuille et fruit vert). Les chloroplastes assurent principalement la photosynthèse mais également la synthèse de tétrapyrolles (dont fait partie la chlorophylle), d'acides aminés et d'acides gras. A l'intérieur, baignant dans le stroma, se trouve un réseau membranaire constitué de thylacoïdes empilés (*granum*), liés les uns aux autres par des thylacoïdes intergranaires (Figure 2). Ces membranes thylacoïdiennes sont le lieu de la collecte de l'énergie lumineuse et de sa transformation en énergie chimique.

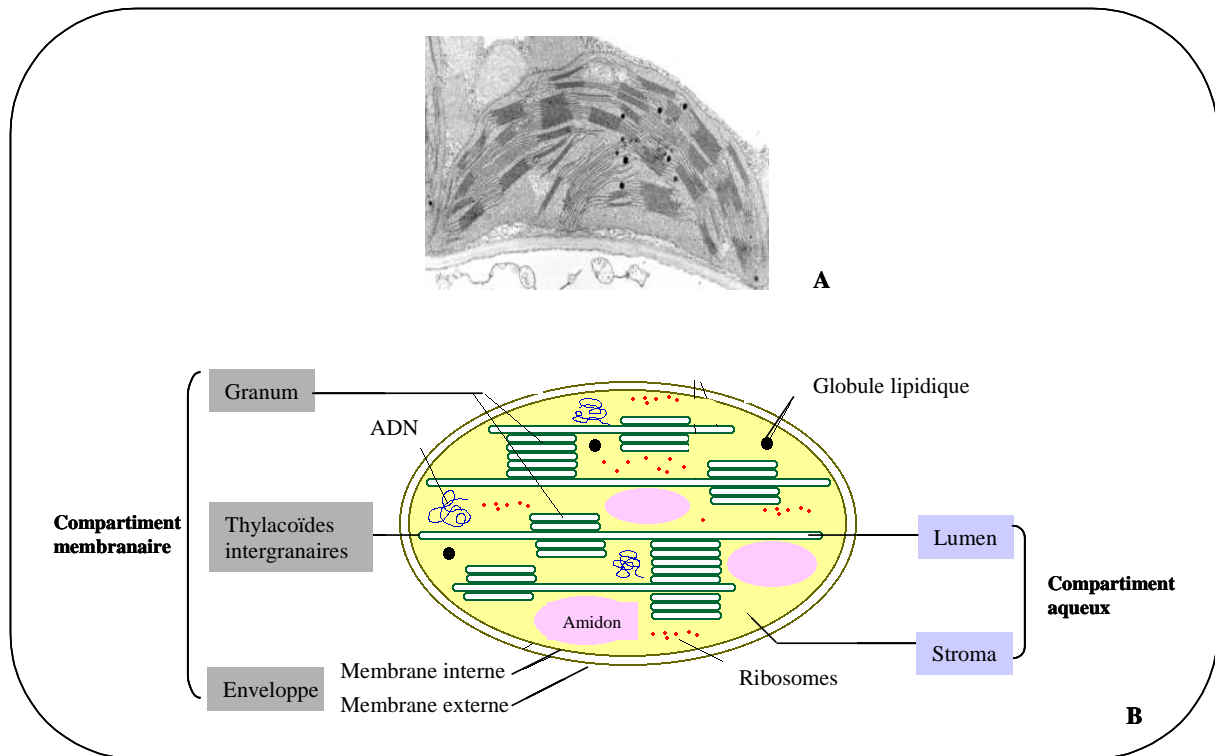


Figure 2 : Structure d'un chloroplaste.

A. Ultrastructure d'un chloroplaste par microscopie électronique à transmission. Origine : A. Springer.
B. Représentation schématique d'un chloroplaste et de ses constituants. Schéma modifié à partir de <http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/Chloroplaste/met.htm>

c. Autres types de Plastes

Il existe trois autres types de plastides. Les amyloplastides, présents dans les racines et tubercules, sont des plastides spécialisés dans la synthèse et le stockage de l'amidon. Ils sont également impliqués dans la signalisation gravitropique au niveau des cellules de la coiffe racinaire (Morita and Tasaka, 2004). Les chromoplastides sont riches en pigments non chlorophylliens (caroténoïdes) qui contribuent à la coloration des fleurs et des fruits. Contrairement aux autres plastides, les chromoplastides sont principalement issus de la différenciation des chloroplastides, par déstructuration des membranes thylacoïdiennes et accumulation de caroténoïdes. Cette différenciation a notamment lieu lors du mûrissement des fruits qui passent alors de la couleur verte à une couleur jaune, rouge, etc. Les leucoplastides sont des plastides sans pigments que l'on retrouve dans les fleurs blanches et à la surface des feuilles, dans les trichomes.

Des interconversions entre certains types de plastides peuvent avoir lieu en réponse aux besoins de la cellule selon l'environnement extérieur et le développement de la plante. Pour

cela noyau et plastes travaillent en étroite collaboration afin de maintenir la cellule dans un état fonctionnel optimal, en relation permanente avec son environnement. La régulation de la synthèse des protéines plastidiales nécessite une coordination de l'expression des génomes plastidiaux et nucléaires via un signal dit rétrograde.

1.3 La communication plaste-noyau

Lorsque le développement et/ou le fonctionnement des plastes sont affectés par des conditions environnementales non propices, on constate une répression de l'expression des gènes nucléaires codant pour des protéines photosynthétiques (pour revue voir (Nott *et al.*, 2006)). Ainsi la stœchiométrie entre protéines plastidiales et nucléaires nécessaires à l'assemblage fonctionnel des complexes photosynthétiques est maintenue. Le signal émit alors par le plaste (signalisation rétrograde) peut être de différentes natures.

Une des principales voies de signalisation rétrograde implique la Mg-protoporphyrine IX (Mg-protoIX), intermédiaire de la voie de biosynthèse de la chlorophylle (voir § 2 de l'Introduction). En effet, lorsque la voie de biosynthèse est bloquée en aval de ce précurseur et que ce dernier s'accumule (Strand *et al.*, 2003; Pontier *et al.*, 2007), on observe une répression des gènes nucléaires, notamment *RBCS* et *LHCB* qui codent respectivement pour la petite sous-unité de la Rubisco et pour une protéine de l'antenne périphérique du photosystème II (Johanningmeier, 1988). L'excès de Mg-protoIX est exporté dans le cytosol par un mécanisme encore indéterminé à ce jour (Ankele *et al.*, 2007), transmettant un signal qui conduit à la répression de l'expression de gènes cibles (voir revue (Nott *et al.*, 2006)). L'étude de mutants *gun* (*genome uncoupled*) affectés dans la transmission du signal plaste-noyau, et en particulier du mutant *gun1*, a permis une avancée importante dans la compréhension de la transmission du signal. En présence d'un excès de Mg-protoIX, la protéine GUN1 activerait le facteur de transcription ABI4 impliqué dans la répression de la transcription de gènes nucléaires, comme *LHCB* (Koussevitzky *et al.*, 2007). Les autres composants de la voie de transduction du signal restent à découvrir.

Une deuxième voie de signalisation rétrograde existe faisant intervenir directement l'expression du génome plastidial. Lorsque cette dernière est bloquée, on observe une inhibition de l'expression de gènes nucléaires photosynthétiques (Rapp and Mullet, 1991; Sullivan and Gray, 1999). Peu d'informations sont connues concernant cette voie de signalisation mais il semble que GUN1 et ABI4 y jouent un rôle, tout comme dans la voie de régulation par la Mg-protoIX.

Une troisième voie de signalisation fait intervenir l'état redox du plaste. Les conditions environnementales, comme l'intensité de la lumière, modifient l'état redox des éléments de la chaîne de transport des électrons et peuvent également faire apparaître des espèces réactives de l'oxygène (ROS, pour *Reactive Oxygen Species*). Cela a notamment pour conséquence l'inhibition de l'expression de gènes nucléaires photosynthétiques (Karpinski *et al.*, 1997; Pfannschmidt *et al.*, 2001) et l'activation de la transcription de gènes de stress (Karpinski *et al.*, 1997; Kimura *et al.*, 2003). La transduction du signal par l'état redox semble passer par une cascade de phosphorylation de protéines (Kovtun *et al.*, 2000; Chandok *et al.*, 2001) dont les protéines cibles restent encore à identifier.

2. La voie de biosynthèse de la chlorophylle et ses régulations

La chlorophylle (Chl) est le principal pigment chez les organismes phototrophes. Isolée en 1817 par Joseph Bienaimé Caventou, ce pigment joue un rôle fondamental dans la photosynthèse en captant l'énergie lumineuse. Cette dernière sera alors transformée en énergie chimique utilisable par l'ensemble des êtres vivants.

La chlorophylle fait partie de la famille des tétrapyrroles avec les hèmes, sirohèmes, bilines et phycobilines. Sous forme d'un chlorine, elle est constituée de quatre noyaux pyrroles en cercle dont le dernier est réduit (A, B, C et D), renfermant un ion magnésium en son centre et se terminant par un alcool à longue chaîne, le phytol (Figure 3).

2.1 Etapes de la voie de biosynthèse de la chlorophylle

La biosynthèse de la chlorophylle est un processus qui se déroule entièrement au sein du plaste et fait intervenir quinze réactions enzymatiques (Figure 4) dont certaines sont communes à la synthèse des autres tétrapyrroles. L'ensemble des gènes codant pour ces enzymes de cette voie a été identifié il y a seulement quelques années (voir revues de (Beale, 1999) et (Eckhardt *et al.*, 2004)). Ces avancées relativement récentes ont permis de mieux comprendre les mécanismes qui régulent cette voie de biosynthèse au sein du plaste.

Elle peut être divisée en trois phases (détails en Figure 4) :

- **Une première partie** de la voie de biosynthèse de la chlorophylle est commune avec celle des hèmes. Ces molécules sont impliquées dans la fixation d'O₂, la respiration ou encore le transport des électrons photosynthétiques *via* les cytochromes. Cette première phase se

compose de neuf étapes, allant du glutamate - acide aminé synthétisé dans le plaste - à la protoporphyrine IX, constituée d'un noyau tétrapyrrolle sans ion associé.

- **La seconde partie** est spécifique à la synthèse de la chlorophylle : elle commence par la chélation d'un ion Mg^{2+} au cœur du cycle (alors que c'est un ion Fe^{2+} dans le cas de l'hème) et conduit à la formation de chlorophylle *a* (Chl *a*) en cinq autres étapes.

- **La troisième et dernière partie** est la conversion de la Chl *a* en Chl *b* (Figure 2) par la Chlorophylle *a* Oxygénase (CAO) (Oster *et al.*, 2000) qui peut également oxyder la Chlorophyllide *a* (Chlide *a*) en Chlorophyllide *b* (Chlide *b*) ((Reinbothe *et al.*, 2006a) ; Figure 5).

D'autres inconversions ont lieu entre les formes *a* et *b* de certains produits (Figure 3). Elles concernent la Protochlorophyllide *a* (Pchlde *a*), convertit en Protochlorophyllide *b* (Pchlde *b*) par l'intermédiaire de PTC52 (Protochlorophyllide *a* Oxygenase) (communication personnelle, S.Reinbothe), mais également la Chl *b* qui peut être reconvertit en Chl *a* en deux étapes *via* la Chlorophylle(ide) *b* Reductase (CBR) et l'Hydroxy-Chlorophylle(ide) *a* Reductase (CAR) (Scheumann *et al.*, 1998) ; Figure 5).

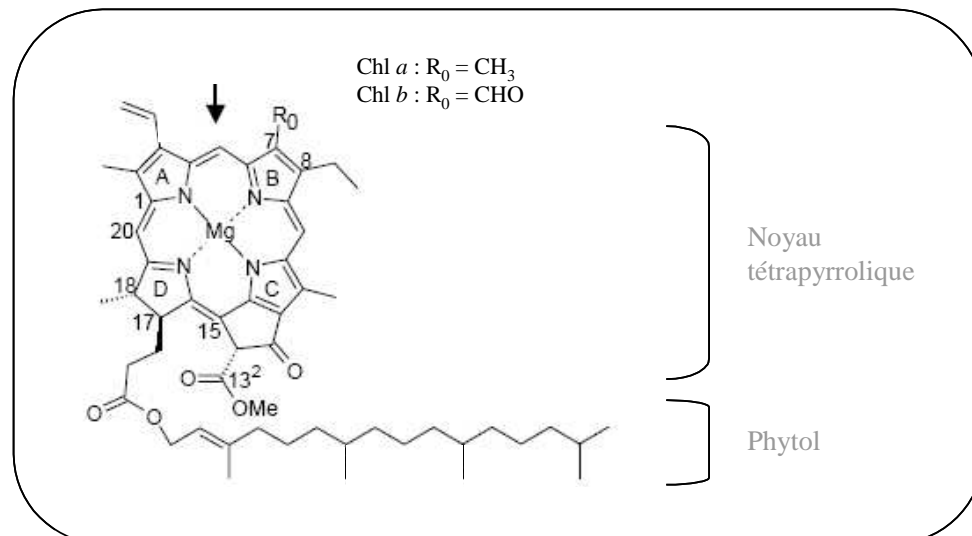


Figure 3 : Structure de la chlorophylle.

Au centre, le noyau tétrapyrrolique renfermant un atome de magnésium. En C7, présence d'un groupement méthyl (Chl *a*) ou formyl (Chl *b*). En C17, présence d'un alcool à longue chaîne, le phytol. D'après (Eckhardt *et al.*, 2004), avec modifications.

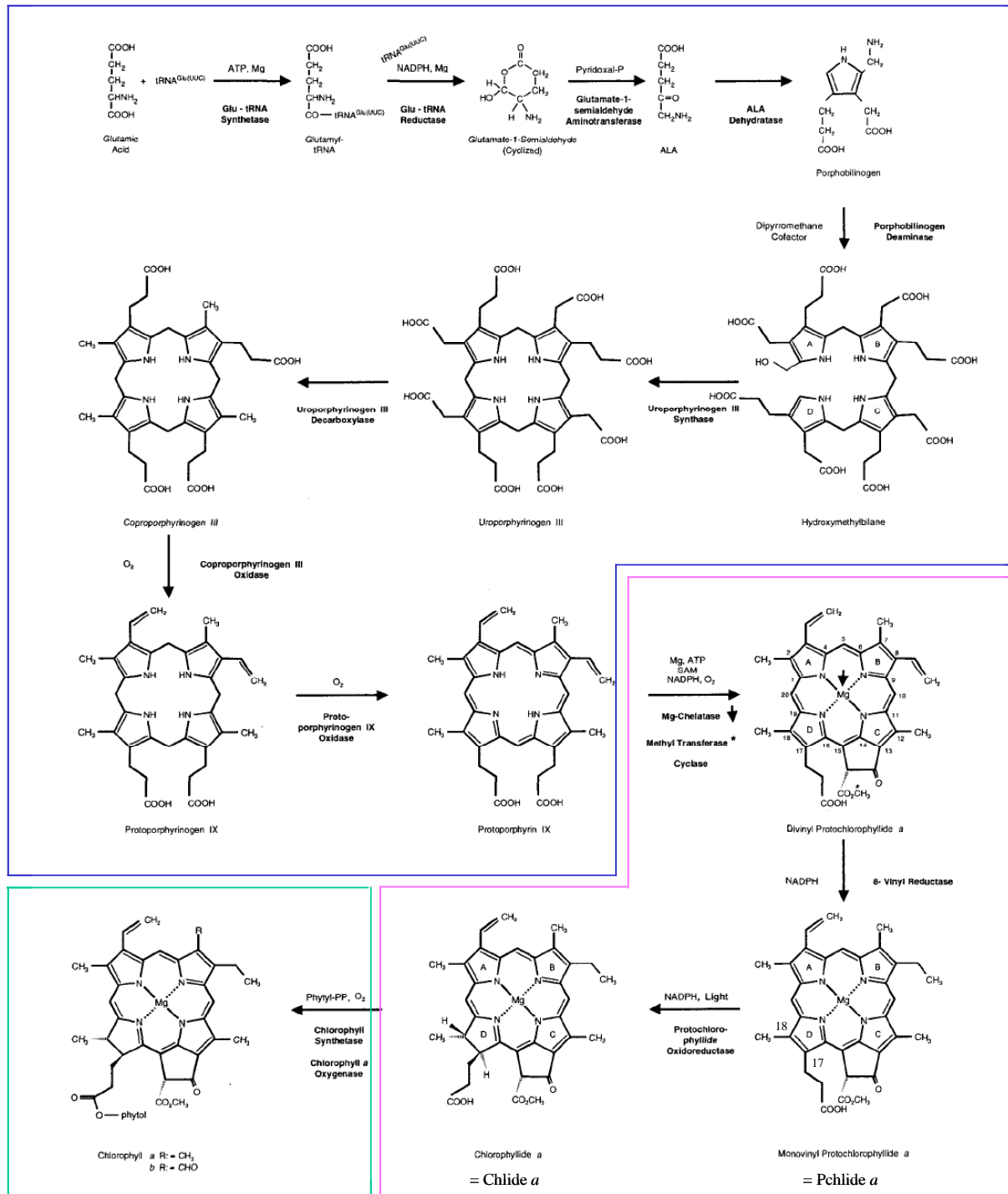


Figure 4 : Principales étapes de la voie de biosynthèse de la chlorophylle.

D'après (Reinbothe and Reinbothe, 1996) avec modifications. Pchlide *a* : Monovinyl Protoporphorphyllide *a*. Chlide *a* : Chlorophyllide *a*. La biosynthèse de la chlorophylle peut être divisée en trois phases représentées ci-dessus par des compartiments de couleurs différentes. On peut trouver sur TAIR une représentation interactive de cette voie avec de nombreux liens et références (<http://www.arabidopsis.org:1555//ARA/NEW-IMAGE?object=CHLOROPHYLL-SYN>).

Figure 4 : Principales étapes de la voie de biosynthèse de la chlorophylle.**Phase 1 : Du glutamate à la protoporphyrine IX (en bleu)**

Cette phase correspond à une série de trois premières réactions faisant intervenir un ARNt plastidial particulier, l'ARNt^{Glu}, et conduisent à la formation de l'acide δ -aminolévulinique (5-ALA) à partir du glutamate. L'étape suivante est la condensation asymétrique de deux molécules de 5-ALA pour former le porphobilinogène. Puis quatre molécules de porphobilinogène sont à leur tour condensées en hydroxyméthylbilane, premier tétrapyrrole synthétisé de la voie. Les réactions suivantes consistent en une cyclisation (= uroporphyrinogène III), deux décarboxylations consécutives (= coproporphyrinogène III puis protoporphyrinogène IX) et une oxydation (= protoporphyrine IX). L'uroporphyrinogène III peut également entrer dans la voie de biosynthèse des sirohèmes .

Phase 2 : De la protoporphyrine IX à la protochlorophyllide (en rose)

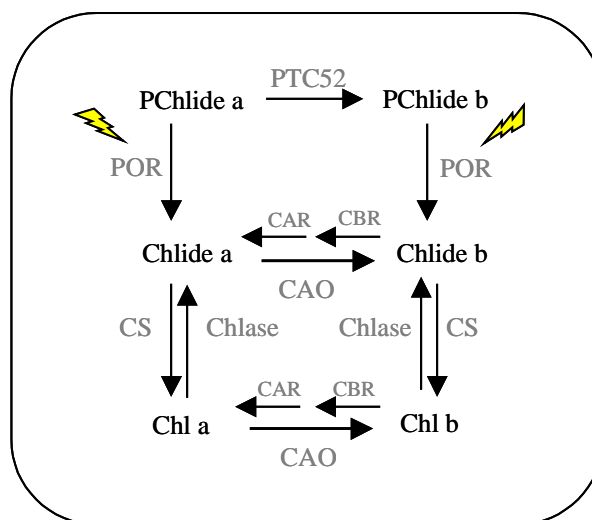
C'est à partir de là que les voies de biosynthèse de la chlorophylle et celle des hèmes divergent. La chélation d'un ion Mg^{2+} au centre de la protoporphyrine IX (= Mg-protoporphyrine IX) est suivie d'une estérification (= Mg-protoporphyrine monométhyl ester). Un cycle supplémentaire est alors formé, accolé au cycle C du tétrapyrrole (= Mg-divinyl protochlorophyllide *a*). Le groupe vinyl en C8 est ensuite réduit pour former de la protochlorophyllide *a* (ou Mg-monovinyl protochlorophyllide *a* = Pchl *a*).

L'étape suivante est catalysée par l'enzyme qui a fait l'objet de mon travail : la NADPH-Protochlorophyllide-Oxydoreductase (POR). Il s'agit de la réduction lumière-dépendante de la double liaison C17-C18 du cycle D de la Pchl *a*, conduisant à la formation d'une chlorine, la Chl *a*.

La dernière étape de cette phase consiste en la fixation par estérification en C17 d'une longue chaîne alcoolique appelée phytol, transformant ainsi la Chl *a* en une molécule de Chl *a* hautement lipophile.

Phase 3 : Conversion de la Chl *a* en Chl *b* (en vert)

Le fonctionnement des antennes collectrices de l'appareil photosynthétique nécessite aussi la présence de Chl *b*. Cette dernière est synthétisée à partir de la Chl *a* par oxygénation du groupement méthyl en formyl au niveau du C7.

**Figure 5** : Interconversions entre les formes *a* et *b* de la chlorophylle et de ses précurseurs.

Les enzymes sont mentionnées sous forme d'acronyme en gris. PTC52 : protochlorophyllide *a* oxygénase. POR : protochlorophyllide-oxydoreductase. Activité lumière-dépendante. CAR : hydroxy-chlorophylle(*ide*) *a* reductase (ou 7-formyl reductase). CBR : chlorophylle(*ide*) *b* reductase. CS : chlorophylle synthetase. Chlase : chlorophyllase. CAO : chlorophylle(*ide*) *a* oxygénase

La localisation des enzymes intraplastidiales impliquées dans cette voie montre que trois sous-compartiments du chloroplaste sont concernés : l'enveloppe, le stroma et la membrane des thylacoïdes. Cette répartition dépend principalement de la nature biochimique des enzymes. Celles catalysant les étapes de la phase 1 sont hautement solubles et se retrouvent donc dans le stroma. Les étapes suivantes sont catalysées par des enzymes associées ou liées à la membrane des thylacoïdes et/ou à l'enveloppe du chloroplaste comme par exemple la protoporphyrinogène IX oxydase (PPIXO) et son substrat (Matringe *et al.*, 1992). La Figure 6 résume la localisation des enzymes et de leurs substrats (pour revue (Eckhardt *et al.*, 2004)) avec cependant quelques incertitudes, plusieurs enzymes ayant été localisées à la fois dans l'enveloppe et dans les membranes des thylacoïdes (par exemple la POR ou la CAO).

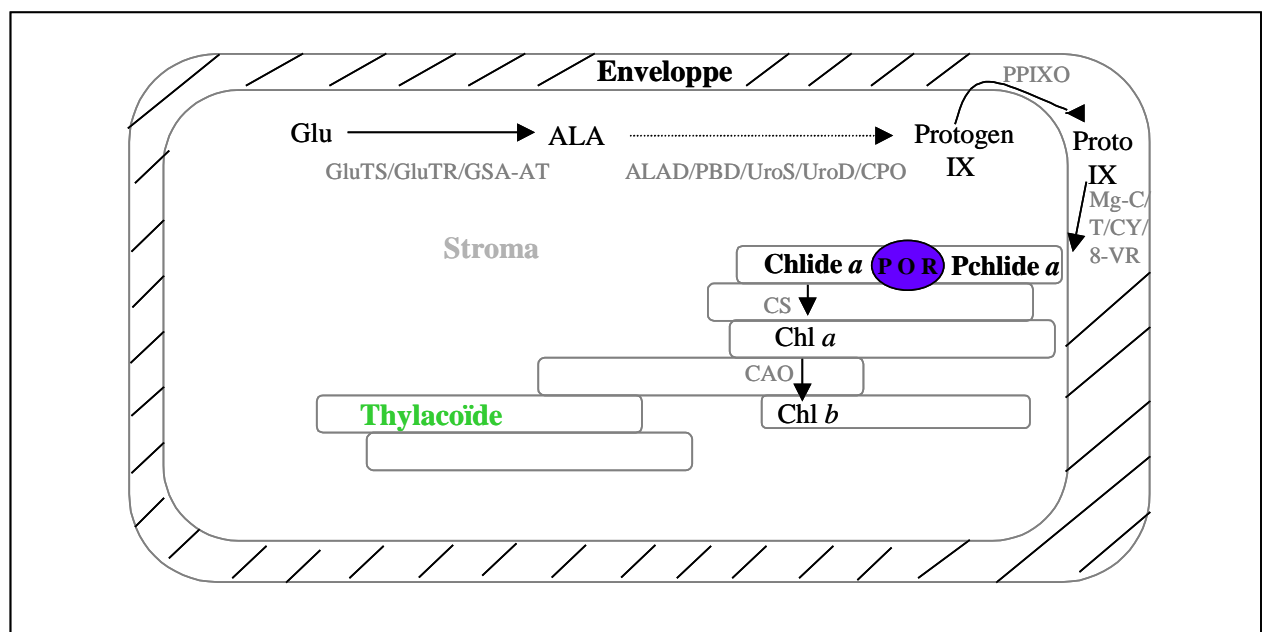


Figure 6 : Représentation schématique de la voie de biosynthèse de la chlorophylle au sein de trois sous-compartiments différents du chloroplaste (enveloppe, thylacoïdes et stroma).

En gris l'acronyme du nom des enzymes. GluTS : Glutamate-tRNA synthetase ; GluTR : Glutamate-tRNA reductase ; GSA-AR : Glutamate-1-semialdéhyde aminotransférase ; ALAD : ALA-déshydratase ; PBD : Porphobilinogène desaminase ; UroS : Uroporphyrinogène III synthase ; UroD : Uroporphyrinogène III décarboxylase ; CPO : Coproporphyrinogène III oxydase ; PPIXO : Protoporphyrinogène IX oxydase ; Mg-C : Mg-chelatase ; MgT : Mg-protoporphyrine IX méthyl transférase ; Mg-CY : Mg-protoporphyrine IX monoéthyl ester cyclase ; 8-VR : 8-Vinyl reductase ; POR : NADPH-Protochlorophyllide-oxydoreductase ; CS : Chlorophylle synthetase ; CO : Chlorophylle a oxygenase. En noir le nom des intermédiaires. Glu : acide glutamique ; ALA : acide δ-aminolévulinique ; Protogène IX : Protoporphyrinogène IX ; Proto IX : Protoporphyrine IX ; Pchlide a : Protochlorophyllide a ; Chlide a : Chlorophyllide a ; Chl a/b : Chlorophylle a/b.

La cellule étant en adaptation permanente par rapport à son milieu, ses besoins varient au cours du temps. La régulation de la synthèse de chlorophylle et en particulier de ses intermédiaires, est donc très importante.

2.2 La régulation de la voie de biosynthèse de la chlorophylle

Une partie de la voie de biosynthèse étant **commune à d'autres voies métaboliques** (hèmes, sirohèmes, phycobilines et phytochromes (Cornah *et al.*, 2003)), la production d'intermédiaires doit être finement régulée en fonction des besoins de la cellule, du tissu ou de l'organe. D'autre part, les intermédiaires de cette voie et la chlorophylle elle-même, sont des **molécules extrêmement photosensibles**. En effet, en présence de lumière les tétrapyrroles libres sont capables de générer des espèces réactives de l'oxygène. Ces ROS sont impliqués dans des processus de dégradation cellulaire tels que le peroxydation des lipides, la dégradation des protéines ou encore l'activation des gènes de la voie de défense contre les pathogènes (Overmyer *et al.*, 2003; Apel and Hirt, 2004). Ces processus, révélateurs d'un stress photo-oxydatif, conduisent à un arrêt de la croissance pouvant aller jusqu'à la mort cellulaire.

Plusieurs stratégies sont donc mises en œuvre pour limiter l'accumulation de tétrapyrroles libres dans la cellule. L'une d'entre elle est le *channeling* du produit d'une réaction, substrat de la prochaine, vers l'enzyme suivante de la voie. Certaines enzymes consécutives dans la voie de biosynthèse s'associent pour former des complexes au sein desquels les produits-substrats sont directement mis en contact avec l'enzyme concernée (exemple de la Mg-chelatase avec la Mg-protoporphyrine méthyl transférase - (Alawady *et al.*, 2005). D'autres mécanismes visant à limiter l'accumulation de tétrapyrroles libres mais aussi permettant un ajustement entre les deux branches majeures de la voie (hèmes-chlorophylle) selon les besoins de la cellule, sont mises en place principalement au niveau de trois points de contrôle stratégiques.

✓ La régulation de l'activité de la Glutamate-tRNA réductase (GluTR).

La réduction du Glutamyl-tRNA est la première étape spécifique aux voies de biosynthèse de la chlorophylle et des hèmes. Elle est aussi à l'origine du précurseur universel des tétrapyrroles, le 5-ALA. Cette réduction est donc une étape clé qui nécessite une régulation fine. Elle fait intervenir deux enzymes : la glutamate-tRNA réductase (GluTR) et la

glutamate-1-semialdéhyde aminotransférase (GSA-AT). Chez *Arabidopsis*, la GluTR peut être codée par deux gènes, *HEMA1* et *HEMA2*, qui présentent des profils d'expression différents. *HEMA1* s'exprime dans les tissus photosynthétiquement actifs alors que *HEMA2* est présent dans les racines (McCormac *et al.*, 2001). Hormis le fait que la transcription de *HEMA1* soit positivement régulée par la lumière (McCormac *et al.*, 2001), deux autres mécanismes de régulation sont connus. Tous deux concernent directement la protéine et font intervenir les produits des deux voies de biosynthèse (hème et chlorophylle) impliquant respectivement les domaines N- et C-terminaux de la Glu-TR. Au niveau N-terminal, un rétrocontrôle négatif allostérique par fixation d'un hème a été observé (Vothknecht *et al.*, 1998). Quant à la régulation par la voie de biosynthèse de la chlorophylle, elle se fait au niveau C-terminal de la Glu-TR, *via* une protéine chloroplastique dénommée FLU.

Le rôle de la protéine FLU a été initialement identifié chez le mutant *flu* (*fluorescent*) d'*A. thaliana* (Meskauskiene *et al.*, 2001). Chez les angiospermes, la synthèse de chlorophylle est bloquée à l'obscurité au niveau de la réduction de la protochlorophyllide (voir §2 de l'Introduction). Pour ne pas que cet intermédiaire s'accumule en trop grande quantité, augmentant le risque photo-oxydatif en cas d'illumination, sa production est régulée. Cependant, chez le mutant *flu* d'*A.thaliana* placé à l'obscurité, la synthèse de 5-ALA et la quantité de Pchlde sont nettement supérieures à celles du sauvage (Meskauskiene *et al.*, 2001), suggérant un rôle de la protéine FLU dans la régulation de la voie de biosynthèse de la chlorophylle. Des expériences de double hybride ont montré que la protéine FLU interagissait avec la GluTR codée par *HEMA1*, au niveau C-terminal de l'enzyme (Meskauskiene and Apel, 2002), expliquant l'accumulation de Pchlde chez le mutant *flu*. A ce jour, on ne sait pas encore comment la protéine FLU détecte la quantité de Pchlde.

✓ **La réduction de la Pchlde en Chlide**

Pénultième étape de la voie de biosynthèse de la chlorophylle, la régulation de cette étape sera traitée ultérieurement en détail (voir § 3 et 4 de l'Introduction).

✓ **Le cycle de la chlorophylle**

Deux types de chlorophylle coexistent dans l'appareil photosynthétique des végétaux supérieurs, la Chl *a* et la Chl *b*. La Chl *a*, majoritaire, se trouve dans les centres réactionnels (photosystèmes) et les antennes collectrices périphériques. La Chl *b* se trouve quant à elle principalement au niveau des antennes collectrices de lumière. Lorsque l'intensité lumineuse

change, la plante s'adapte rapidement en modifiant l'équilibre Chl *a* / Chl *b* afin d'augmenter ou de diminuer le nombre d'antennes collectrices. La CAO, qui catalyse l'interconversion de la Chl(ide) *a* en Chl(ide) *b*, est donc sujette à régulations. Tout d'abord au niveau transcriptionnel, avec une expression en relation inverse avec l'intensité lumineuse. En condition de faible intensité, la CAO est fortement exprimée, la production de Chl *b* s'accroît et la taille des antennes collectrices augmente (Tanaka and Tanaka, 2005). A l'inverse, une modification structurale de la CAO est observée en cas d'excès de Chl *b*, rendant l'enzyme sensible à la protéase chloroplastique Clp (Nakagawara *et al.*, 2007). Cette inactivation favorise la réduction de l'excès de Chl *b* en Chl *a* par l'intermédiaire des enzymes CBR et CAR.

3. Une étape clé de la voie de biosynthèse : la réduction de la protochlorophyllide

Si les gymnospermes, les algues vertes ou encore les mousses sont capables de verdir à l'obscurité, ce n'est pas le cas des angiospermes. Chez ces derniers, la voie de biosynthèse de la chlorophylle est bloquée au niveau de la pénultième étape : la réduction de la Pchlde en Chlide. En effet, selon les espèces, deux enzymes sans relation phylogénétique peuvent catalyser cette réaction : (a) une enzyme lumière-indépendante, trimérique (DPOR pour *Dark-POR*) ou (b) une enzyme strictement dépendante de la lumière, monomérique (POR) (Figure 7). Ces deux systèmes enzymatiques coexistent chez la plupart des organismes photosynthétiques excepté les bactéries photosynthétiques anaérobies qui possèdent uniquement DPOR et les angiospermes qui ne détiennent que POR

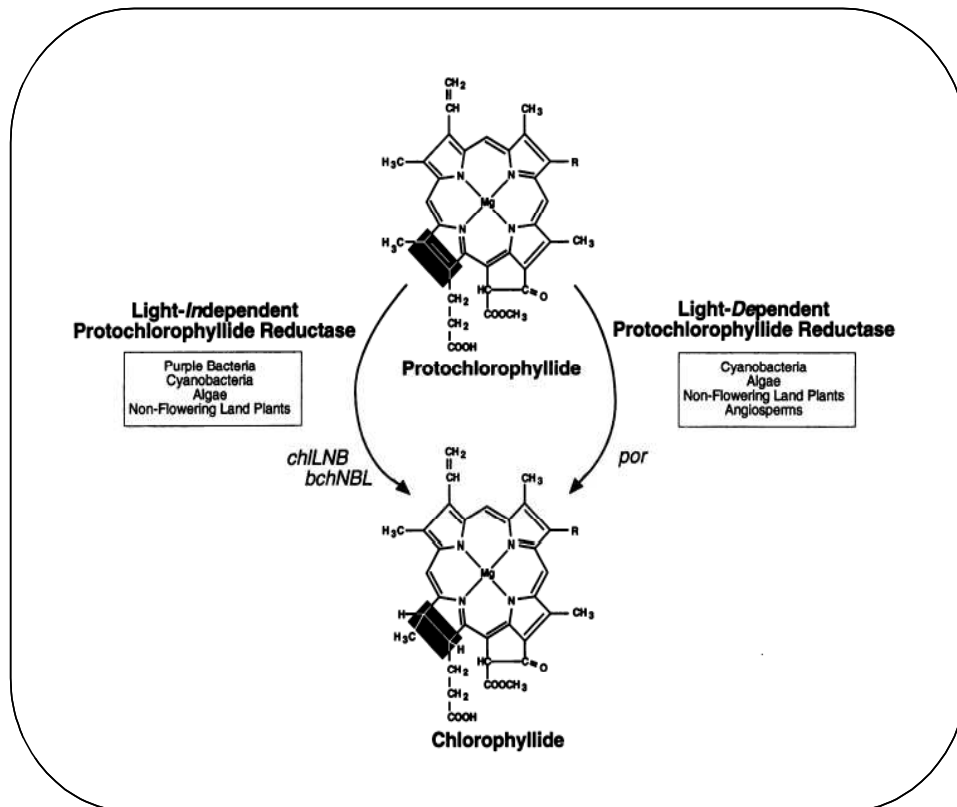


Figure 7 : Deux voies de réduction de la protochlorophyllide en chlorophyllide sont possibles selon les organismes concernés. D'après (Suzuki and Bauer, 1995).

3.1 Deux voies de réduction de la Protochlorophyllide coexistent

a. La voie lumière-indépendante

Les trois sous-unités qui constituent DPOR sont codées par trois gènes situés dans le génome plastidial : *chlL*, *chlB* et *chlN* (ou *bchL*, *bchB* et *bchN*) (Choquet *et al.*, 1992; Suzuki and Bauer, 1992; Fujita *et al.*, 1996). L'analyse de la séquence de ces gènes a révélé de fortes identités avec celle codant les sous-unités de la nitrogenase. Cette similitude a été confirmée par l'étude de l'activité *in vitro* de DPOR de *Rhodobacter capsulatus* (Fujita and Bauer, 2000), notamment en ce qui concerne le besoin d'énergie (ATP), la nécessité d'un réductant de type thiol (NADPH) et une extrême sensibilité à l'oxygène. Nous verrons plus loin que cette dernière caractéristique fut déterminante dans l'apparition de POR au cours de l'évolution.

Présent chez la plupart des organismes photosynthétiques, allant des cyanobactéries aux gymnospermes, cet ensemble de gènes a été perdu au cours de l'évolution lors de l'apparition des angiospermes.

b. La voie lumière-dépendante

Plusieurs caractéristiques définissent la réductase de cette voie, à commencer par son **activité strictement lumière-dépendante** qui en fait la seule enzyme connue qui requiert de la lumière, avec l'ADN-photolyase (Kelner, 1949; Weber, 2005). POR possède aussi la capacité de former des **complexes ternaires**, en se liant à son substrat (la Pchl_{id}) et à son cofacteur (le NADPH). Au sein des étiooplastes, ces complexes ternaires s'associent étroitement avec des lipides et forment une structure caractéristique : les corps prolamellaires. Contrairement à l'obscurité où elle est très stable, cette enzyme présente une **instabilité à la lumière** expliquée par une double régulation au niveau du messenger et de la protéine (voir § 3.1 de l'Introduction).

Ainsi l'activité lumière-dépendante de POR, réductase unique des angiospermes, bloque la biosynthèse de la chlorophylle à l'obscurité au niveau de la réduction de la Pchl_{id}. Les caroténoïdes, présents avec la Pchl_{id}, confèrent une couleur jaune aux cotylédons étiolés.

c. Choix évolutifs

La distribution de DPOR et de POR selon les organismes photosynthétiques nous amènent à nous poser plusieurs questions

« Pourquoi la POR est-elle apparue en plus de la DPOR chez les organismes phototrophes? »

Une étude de la distribution des POR et DPOR dans le règne végétal indique que POR est apparue il y a 2-3 milliards d'années (Blankenship, 2001). Sa présence chez les cyanobactéries nous informe que ce système a évolué avant l'émergence des eucaryotes photosynthétiques. L'apparition de POR est donc antérieure à l'endosymbiose dont sont issus les chloroplastes, et reflète le passage de la photosynthèse anaérobie en aérobie.

En effet, la grande sensibilité à l'oxygène de DPOR est un inconvénient majeur face à l'augmentation du taux d'oxygène dans l'atmosphère au cours de l'évolution. Son efficacité s'en trouve directement affectée, conduisant à une accumulation de Pchl_{id} et autres intermédiaires photosensibles. L'émergence d'une réductase insensible à l'oxygène semble donc une solution adéquate pour diminuer le risque photo-oxydatif et permettre une production de chlorophylle.

Une observation faite chez les cyanobactéries corrobore cette théorie évolutive. Chez cet organisme qui possède les deux types de réductase, une répartition d'activité entre DPOR et POR a été constatée en fonction de l'intensité lumineuse. A mesure que cette dernière augmente, la contribution de DPOR diminue en faveur de celle de POR (Fujita *et al.*, 1998). Dans les faits, plus la lumière augmente, plus la pression en oxygène dans la plante augmente par l'intermédiaire d'une activité photosynthétique croissante, inhibant peu à peu l'activité de DPOR. Cette illustration, certes indirecte, nous indique que la pression de sélection exercée par l'oxygène semble être le principal facteur ayant conduit à l'apparition de POR (pour revue voir (Suzuki and Bauer, 1995; Reinbothe *et al.*, 1996)).

« Quels avantages y a-t-il à ne posséder que la voie lumière-dépendante pour synthétiser la chlorophylle ? »

Posséder uniquement POR présente un avantage majeur. Cela permet d'optimiser la dépense énergétique nécessaire à la mise en place de l'appareil photosynthétique. En présence de DPOR, la chlorophylle peut être synthétisée à l'obscurité. Elle stabilise alors les protéines des photosystèmes et des antennes collectrices, conduisant à la mise en place de l'appareil photosynthétique à l'obscurité et ce sans aucune utilité ni même aucune garantie que la plantule voit la lumière du jour. Avec la voie lumière-dépendante, la synthèse de la chlorophylle correspond à une mise en place rapide et fonctionnelle de l'appareil photosynthétique, avec une synthèse des protéines de l'appareil photosynthétique parallèle à l'activité de la POR.

3.2 Mécanisme réactionnel de la réduction de la Protochlorophyllide par POR

a. Caractéristiques structurales de POR

La comparaison de la séquence des POR avec d'autres protéines montre des homologies de séquence et de structure très importantes avec la famille des déshydrogénases à chaîne courte (SDR pour *Short chain Deshydrogenase Reductase*), qui appartiennent à la super-famille des Réductases-Epiméras-Déshydrogénases (RED) (Baker, 1994). Ces similarités nous suggèrent une évolution de la protéine ancestrale depuis cette famille.

Les séquences primaires des protéines POR et SDR partagent de caractéristiques structurales comme la présence d'un pentapeptide Tyr-X-X-X-Lys hautement conservé qui

forme une partie du domaine catalytique, ou encore celle d'un ensemble de trois glycines situées en position N-terminale (Gly-X-X-X-Gly-X-Gly) dont la première est directement impliquée dans la liaison du NADPH (Figure 8A) (Baker, 1994).

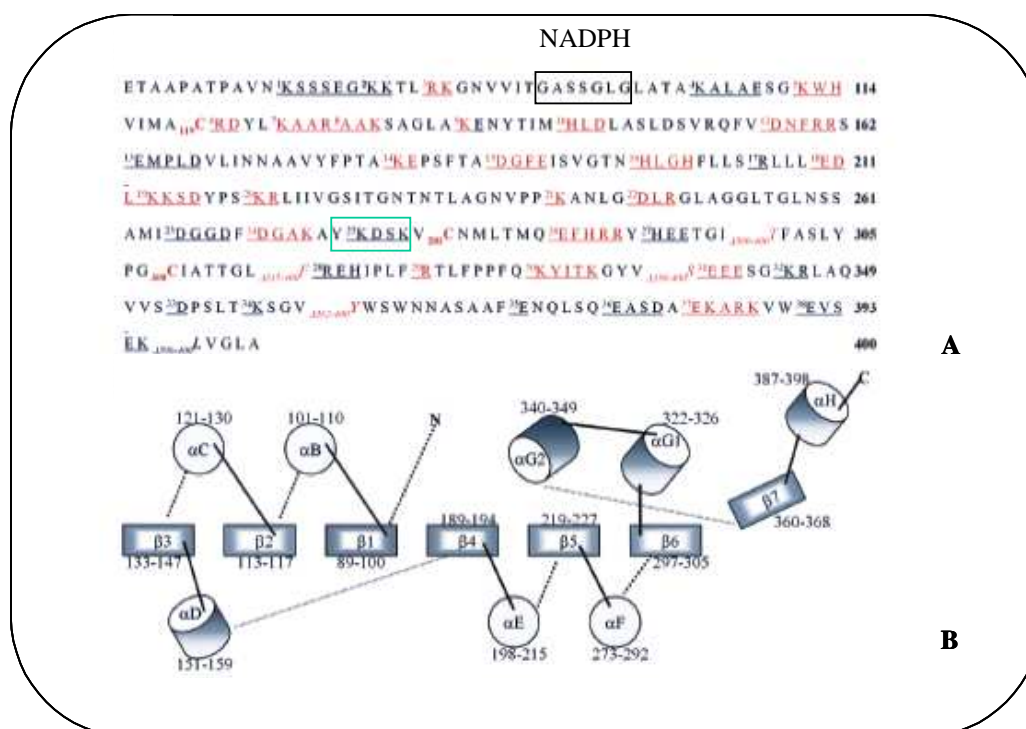


Figure 8 : Séquence primaire de la POR mature et sa structure secondaire prédite.

A. Séquence de la protéine POR de pois faisant état des feuillets β (soulignés en noir) et des hélices α (mentionnées et soulignées en rouge). Encadré noir : motif Gly-X-X-X-Gly-X-Gly dont la première glycine est impliquée dans la liaison du NADPH. Encadré vert : motif Tyr-X-X-X-Lys nécessaire à l'activité catalytique **B.** Modèle de structure secondaire de la protéine POR de pois.

La structure secondaire prédite de la protéine POR à partir de spectres de dichroïsme circulaire UV (Birve *et al.*, 1996; Dahlin *et al.*, 1999) consiste en un squelette de 7 feuillets β , autour duquel se trouvent 9 hélices α faisant de POR une protéine globulaire et soluble (Figure 8B). Une de ses caractéristiques est la présence d'une grande boucle située entre le 5^{ème} et le 6^{ème} feuillet β (Reinbothe *et al.*, 2003b) qui contient notamment deux acides aminés hautement conservés car cruciaux pour l'activité catalytique de la POR (Tyr275 et Lys279, basé sur la séquence de la POR unique de pois) (Wilks and Timko, 1995). D'autre part un résidu Cys hautement conservé est quant à lui impliqué dans la liaison de la PChlide (Reinbothe *et al.*, 2006b).

b. Activité enzymatique de POR

La POR catalyse la réduction de la double liaison C17-C18 du cycle D de la Pchlide par transfert de l'hydrogène du NADPH. Son mécanisme réactionnel est principalement basé sur celui des SDR et le modèle suivant a été proposé (Figure 9) (Wilks and Timko, 1995).

L'absorption d'un photon par la Pchlide engendre une modification de sa structure, favorisant la réaction de réduction. Cette dernière se fait par une attaque nucléophile du proton du NADPH sur le C17 de la Pchlide. La Tyr275 fournit alors un proton pour neutraliser le radical produit par la réduction de la double liaison C17-C18. Le résidu Lys279, situé à proximité, favorise la déprotonation du groupement phénol de la Tyr275, en diminuant son pKa, favorisant ainsi sa déprotonation. Cette réaction catalysée par la POR est très rapide, s'effectuant en quelques nanosecondes à température ambiante.

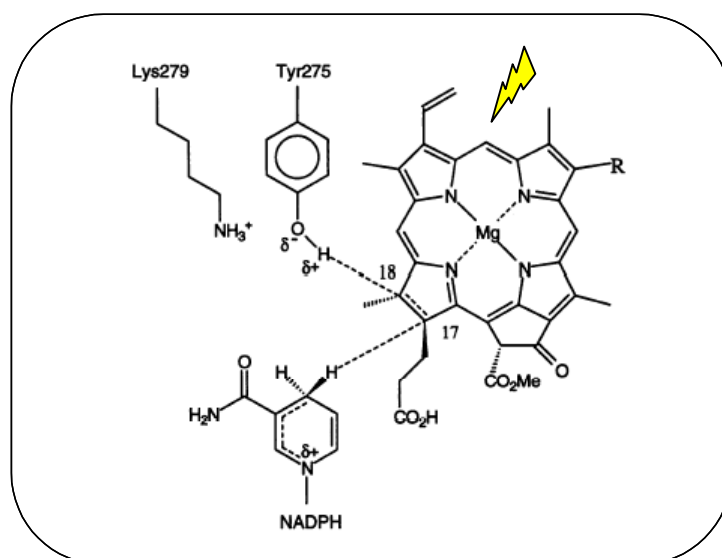


Figure 9 : Modèle proposé pour la réduction de la Pchlide par POR.

R : Pchlide a : -CH₂-CH₃ ou Pchlide b : -CH=CH₂. D'après (Wilks and Timko, 1995).

Mais la lumière n'est pas ici qu'un simple déclencheur d'activité enzymatique. Elle intervient également dans l'expression, l'import et la mise en place de POR dans le plaste.

4. Mise en place d'une POR fonctionnelle *in planta*

Pour être fonctionnelle *in planta*, l'enzyme POR codée par le noyau, doit être importée dans le plaste où elle est mise en place pour assurer sa fonction réductrice cruciale au

développement photosynthétique de la plante. Deux conditions physiologiques sont à considérer :

- La transition obscurité-lumière, ou dé-étiolement, lors de la germination. Dans ce cas, les besoins en chlorophylle sont soudains et massifs pour la mise en place de l'appareil photosynthétique du chloroplaste.
- Le développement ultérieur de la plante en lumière alternative jour/nuit. Cette situation nécessite un *turn-over* des pigments et une adaptation permanente de l'appareil photosynthétique selon les paramètres lumineux.

Ces deux conditions physiologiques font intervenir des signaux lumineux directement responsables des profils d'expression de POR, de son import dans le plaste substrat-dépendant ou non, ou encore de son organisation en structures fonctionnelles.

4.1 Organisation et expression des gènes *POR*

L'activité lumière-dépendante de POR conduit à une accumulation contrôlée de Pchl_{ide} dans les cotylédons ou les feuilles d'angiospermes à l'obscurité. Dès 1956, un complexe photoactif Pchl_{ide}-protéines, appelé « *Pchl_{ide} Holochrome* », a été isolé dans des feuilles de haricot par Smith (Smith and Kupke, 1956). Ce ne sont que des années plus tard que les composants de ce complexe et le mécanisme dépendant de la lumière ont commencé à être identifiés (Smith and Kupke, 1956; Canaani and Sauer, 1977; Griffiths, 1978). Le « *Pchl_{ide} Holochrome* » consiste en une association étroite entre la Pchl_{ide}, une protéine - l'enzyme POR, et son cofacteur le NADPH, formant un complexe ternaire POR-Pchl_{ide}-NADPH.

L'identification des polypeptides responsables de l'activité catalytique ne s'est faite que dans un deuxième temps par l'intermédiaire de techniques de fractionnement cellulaire et de modification chimique (Apel *et al.*, 1980; Oliver and Griffiths, 1980; Beer and Griffiths, 1981; Oliver and Griffiths, 1981). Puis le criblage de banques d'ADNc a permis d'identifier les séquences codantes, nucléaires, correspondant à ces polypeptides chez différentes espèces [chez l'orge -(Schulz *et al.*, 1989) ; l'avoine (Darrah *et al.*, 1990) ; *A. thaliana* (Benli *et al.*, 1991; Armstrong *et al.*, 1995) ; le pois et le pin (Spano *et al.*, 1992b; Spano *et al.*, 1992a), ou encore chez le blé (Teakle and Griffiths, 1993). Plusieurs constats sont ressortis de ces études :

- **Plusieurs isoformes de l'enzyme peuvent coexister au sein d'une même espèce.**

Les techniques de biochimie et le criblage de banques d'ADNc ont permis d'identifier plusieurs isoformes de POR chez certaines espèces. C'est le cas en particulier chez *Pinus mugo* (Forreiter and Apel, 1993), chez l'orge (Holtorf *et al.*, 1995) et chez *A. thaliana* (Armstrong *et al.*, 1995; Oosawa *et al.*, 2000). La présence de plusieurs gènes *POR* au sein d'une même espèce n'est pas une généralité. Un gène *POR* est présent chez les cyanobactéries, l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii*, la mousse *Marchantia paleacea*, le pois, le concombre et la carotte. Cependant, ce constat est à prendre avec prudence dans la mesure où les génomes de ces quatre dernières espèces n'ont pas encore été entièrement séquencés. On ne peut donc pas exclure la possibilité que ces espèces possèdent également plusieurs isoformes de POR.

Le tableau 1, extrait de (Masuda and Takamiya, 2004), récapitule la distribution des gènes *POR* dans le règne végétal avec les références correspondantes ainsi que leurs profils d'expression chez les jeunes individus étiolés, non étiolés et les plantes adultes.

Dans les cas où plusieurs isoformes ont été identifiés, on retrouve deux types de nomenclature. Une première chiffrée, allant de 1 à 3, ne représentant que la seule chronologie de leur découverte au sein d'une espèce donnée. Une seconde lettrée, allant de A à C, reflétant un profil d'expression commun entre les isoformes A, B ou C des différentes espèces en relation avec celui des phytochromes A et B, la forme A étant régulée négativement par la lumière. Aucun lien phylogénétique n'est donc à rapporter entre les formes A, B ou C des différentes espèces (Figure 10).

D'une façon générale, de fortes homologies de séquence polypeptidique (> 65%) sont observées entre les POR des différentes espèces. Importantes dans un même groupe taxonomique, elles tendent à diminuer à mesure que l'on s'éloigne phylogénétiquement. Par exemple entre les cyanobactéries et les plantes supérieures on trouve 55% à 75% de similitudes, alors qu'entre l'orge et l'avoine, deux monocotylédones, plus de 95% de similitudes est observé (Suzuki and Bauer, 1995). Toutefois entre les isoformes d'une même espèce ce pourcentage est variable, avec par exemple 75% de similitudes entre PORA et PORB d'orge (Holtorf *et al.*, 1995) pour 88% entre PORA et PORB d'*A.thaliana* (Armstrong *et al.*, 1995).

La phylogénie de la famille POR (Figure 10) nous montre que leur évolution a dans un premier temps suivi l'émergence des taxons (cyanobactéries - algues vertes - mousses – gymnospermes - angiospermes monocotylédones et dicotylédones). Puis des événements de duplication indépendants ont donné naissance aux différents isoformes au sein d'une même espèce (Oosawa *et al.*, 2000; Masuda *et al.*, 2002).

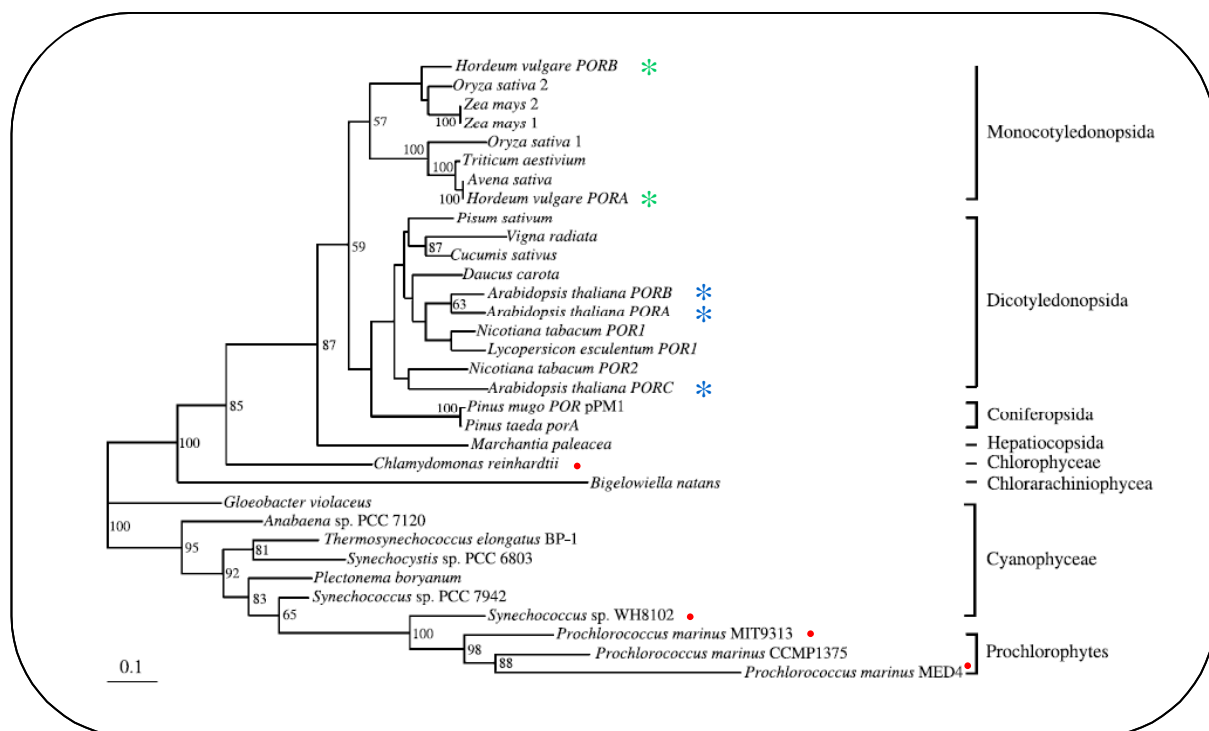


Figure 10 : Arbre phylogénétique de la famille des protéines POR.

D'après (Masuda and Takamiya, 2004) avec modifications. Arbre construit par la méthode de vraisemblance à partir du programme phylum (www.lirmm.fr/guindon/phylm.html). Les nombres situés aux embranchements représentent les valeurs de bootstrap (> 50%) réalisées sur 100 arbres répliqués. L'échelle indique le nombre attendu de substitutions d'acides aminés par site. * Isoformes A et B de l'orge. * Isoformes A, B et C d'*A.thaliana*. • Organisme dont le génome a été entièrement séquencé, et dont les publications ne font état que d'un seul isoforme.

Phylum	Class	Order/family	Species	Gene annotation ^a	Accession no. ^b (ORF ID)	Expression in dark-grown cells	Light-response during greening	Expression in mature cells	Reference/comments	
Cyanobacteria	Prochlorophytes	Prochlorococaceae	<i>Prochlorococcus marinus</i> CCMP1375	por	AE017162 (Pro0543)				Dufresne et al. (2003)	
			<i>P. marinus</i> MED4	por, pcr	BX572091 (PMM0542)				Prochlorococcus genome consortium	
			<i>P. marinus</i> MIT9313	pcr	BX572098 (PMT1218)				Prochlorococcus genome consortium	
	Cyanophyceae	Chroococcales	<i>Gloeobacter violaceus</i> PCC 7421	por	(glr2486)				CyanoBase ^b	
			<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	por	L37783 (slr0506)				Suzuki and Bauer (1995), CyanoBase ^c	
			<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942	por	U30252 (SEA0022)					
			<i>Synechococcus</i> sp. WH8102	pcr, por	BX569693 (SYNW1726)				Synechococcus genome consortium	
			<i>Thermosynechococcus elongatus</i> BP-1		AP005370 (tlr0575)				Nakamura et al. (2002), CyanoBase ^c	
			Nostocales	<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	por	AP003587 (all1743)				Kaneko et al. (2001), CyanoBase ^c
				Oscillatoriales	<i>Plectonema boryanum</i>	por	AB005556			
Chlorophyta	Chlorophyceae	Chlamydomonadales	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	lpcr	U36752	High	Negative		Li and Timko (1996)	
Chlorarachniophyta	Chlorarachniophyceae	Chlorarachniales	<i>Bigeloviella natans</i>		AY267660				Archibald et al. (2003)	
Bryophyta	Hepaticopsida	Marchantiales	<i>Marchantia paleacea</i> (liverwort)		AB007321	Undetectable	Positive	Yes	Takio et al. (1998)	
Spermatophyta	Coniferopsida	Coniferales	<i>Pinus mugo</i> (mountain pine)	POR pPm1	S63824	High	Negative		Forreiter and Apel (1993)	
				POR pPm2	S63825 (partial)	High	Constitutive		Forreiter and Apel (1993)	
			<i>P. taeda</i> (loblolly pine)	porA	X66727	High	Positive		Spano et al. (1992)	
			<i>P. strobes</i> (white pine)	porB	AF027350 (partial)	High	Positive		Skinner and Timko (1998)	
				porA	AF027356 (partial)				Spano et al. (1992)	
lpcr/porB	AF027355 (partial)				Spano et al. (1992)					
Anthophyta	Dicotyledonopsida	Capparales	<i>Arabidopsis thaliana</i>	PORA	U29699	High	Dramatically negative	Very low	Armstrong et al. (1995)	
				PORB	U29785	High	Negative-constitutive	Yes	Benli et al. (1991)	
				PORC	AB035746	Undetectable	Positive	Yes	Oosawa et al. (2000)	

Phylum	Class	Order/family	Species	Gene annotation ^a	Accession no. ^b (ORF ID)	Expression in dark-grown cells	Light-response during greening	Expression in mature cells	Reference/comments
		Fabales	<i>Pisum sativum</i> (pea)	pcr	X63060	Medium	Constitutive		Spano et al. (1982)
			<i>Vigna radiata</i>	CipPor	AF279251	High	Constitutive	Yes	
		Solanales	<i>Nicotiana tabacum</i> (tobacco)	POR1	AB074570	High	Positive	Yes	Masuda et al. (2003)
			<i>Lycopersicon esculentum</i> (tomato)	POR2 POR1	AB074571 AF243520 (partial)	Medium	Positive	Yes	Masuda et al. (2003)
				POR2 POR3	AF243522 (partial) AF243524 (partial)				
		Cucurbitales	<i>Cucumis sativus</i> (cucumber)	NPR	D50085	Low	Positive	Yes	Kuroda et al. (1995)
		Apiales	<i>Daucus carota</i> (carrot)	POR1	AF207691	High	Positive		Sato-Nara et al. (2004)
		Asterales	<i>Lactuca sativa</i> (lettuce)		AF162207				
		Caryophyllales	<i>Amaranthus tricolor</i>	POR1 POR2	AB050122 (partial) AB050124 (partial)				Iwamoto et al. (2001)
	Monocotyledonopsida	Poales	<i>Triticum aestivum</i> (wheat)		X76532	High	Negative		Teakle and Griffiths (1993)
			<i>Hordeum vulgare</i> (barley)	PORA (PCR) PORB	X15869 X84738	Very high High	Dramatically negative Constitutive	Undetectable Yes	Schulz et al. (1989) Holtorf et al. (1995)
			<i>Avena sativa</i> (oat)		X17067	High	Negative		Darrah et al. (1990)
			<i>Oryza sativa</i> (rice)		AL606456				The rice full-length cDNA consortium
					AE017109				The rice full-length cDNA consortium
			<i>Zea mays</i> (corn)		AY103784 AY106314				Maize mapping project Maize mapping project

Tableau 1 : Les gènes *POR* chez les organismes phototrophes.

D'après (Masuda and Takamiya, 2004), avec modifications. **a.** L'annotation des gènes est basée sur celle de la base de données GenBank. **b.** Numéro d'accèsion dans la base de données GeneBank. (partial): la séquence reportée est partielle. **c.** Séquences obtenues de CyanoBase (www.kazuka.or.jp/cyano/).

Un deuxième constat ressort de l'étude de la famille POR

▪ **L'expression des gènes *POR* est régulée par la lumière lors du dé-étiolement.**

Bien que très homologues, les protéines POR présentent des profils d'expression différents, principalement à la lumière.

Avant même que l'on identifie plusieurs isoformes, un effet négatif de la lumière a été détecté sur l'activité enzymatique, la quantité de protéine et celle du transcrit. Cet effet est plus ou moins marqué et rapide selon les espèces (Mapleston and Griffiths, 1980; Apel, 1981; Santel and Apel, 1981; Griffiths *et al.*, 1985; Forreiter *et al.*, 1990), avec par exemple à la lumière une réduction chez l'orge de plus de 90% de la quantité de transcrits initialement présents à l'obscurité (Forreiter *et al.*, 1990). Lorsque ces travaux ont été réalisés, l'effet négatif de la lumière sur POR apparut paradoxal : Pourquoi une enzyme, dont l'activité est dépendante de la lumière, serait inhibée par ce même signal lumineux ? Le *turn-over* des pigments et la croissance de la plante nécessitent une synthèse constante de chlorophylle. La faible activité enzymatique restante peut-elle suffire à cette néosynthèse ?

Cette apparente contradiction a été résolue quelques années plus tard par l'identification d'isoformes de l'enzyme, PORA et PORB, présents chez la plupart des gymnospermes et angiospermes étudiés. De nombreux travaux ont montré que leur profil d'expression, leur abondance et leur rôle diffèrent au cours du développement (cf. références Tableau 1).

Cette régulation de l'expression de POR par la lumière permet une adaptation physiologique de la plante aux conditions d'éclairement. Les corps prolamellaires permettent la phototransformation directe de la Pchl_a en Chl_a dès qu'un signal lumineux est perçu, assurant ainsi rapidement la synthèse de chlorophylle. Une fois que le pool initial de chlorophylle nécessaire à la mise en place de l'appareil photosynthétique est synthétisé, seuls doivent être assurés le *turn-over* de pigments et la néosynthèse de chlorophylle pour les nouveaux organes. Il n'est donc pas nécessaire de maintenir une grande quantité d'enzyme active à la lumière.

La régulation de l'expression des gènes *POR* par la lumière se fait à la fois aux niveaux transcriptionnel et traductionnel.

Une instabilité des messagers *POR* est observée à la lumière, en particulier celui de *PORA* dont l'expression est directement régulée par le phytochrome A (Holtorf and Apel, 1996). En effet, des expérimentations dans le rouge lointain montrent une régulation négative de l'expression de *PORA* à cette longueur d'onde, observation absente dans le cas du mutant *phyA* (Barnes *et al.*, 1996; Runge *et al.*, 1996). La voie de régulation négative d'expression du gène *PORA* implique donc le phytochrome A.

Au niveau post-traductionnel, une protéase présente à la lumière dégrade spécifiquement le complexe POR-Chlide (Reinbothe *et al.*, 1995a).

Cependant, la lumière ne régule pas toujours négativement l'expression de POR. En effet, chez certaines espèces, notamment chez celles pour lesquelles on ne connaît qu'un seul isoforme, l'expression du gène *POR* est régulé positivement par la lumière (mousse (Takio *et al.*, 1998), concombre (Kuroda *et al.*, 1995), carotte (Sato-Nara *et al.*, 2004)) mais aussi chez des espèces qui présentent plusieurs isoformes (*Pinus taeda* (Skinner and Timko, 1998) et le tabac (Masuda *et al.*, 2002)). La régulation d'expression négative de *POR* par la lumière n'est donc pas généralisable même si elle reste majoritaire.

Expression des gènes *POR* chez *Arabidopsis*

L'expression des isoformes de POR chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana* a été particulièrement étudiée par le groupe de Klaus Apel (Armstrong *et al.*, 1995; Su *et al.*, 2001; Frick *et al.*, 2003). Les profils d'accumulation des ARNm ont été caractérisés par Northern-blot au cours du développement à l'obscurité (skotomorphogénèse), en sortie d'étiollement (dé-étiollement) ou à la lumière (photomorphogénèse) selon différentes conditions lumineuses.

Les trois isoformes présentent des profils de transcrits différents, aussi bien à l'obscurité qu'à la lumière. Dans le cas d'une germination à l'obscurité, *PORA* et *PORB* sont transcrits très fortement dans un ratio constant, avec un maximum d'expression à 3 jours pour les deux gènes (Armstrong *et al.*, 1995), tandis que *PORC* reste indétectable (Su *et al.*, 2001). Lors d'un développement à la lumière, l'expression de *PORA* est restreinte au deuxième jour d'exposition, ce qui correspond à la germination *sensu stricto* (sortie de la radicule), alors que *PORB* et *PORC* sont transcrits chez la jeune plantule et chez la plante adulte mais une proportion environ dix fois plus faible qu'à l'obscurité (Armstrong *et al.*, 1995). D'autre part, l'étude de la fluctuation de l'expression de ces deux gènes au cours de la journée montre que

l'expression de *PORB* suit le rythme circadien alors que celle de *PORC* est régulée par la photopériode (Su *et al.*, 2001). Des études en conditions d'intensité lumineuse croissante montrent également une augmentation de l'expression de *PORC* en parallèle à celle de l'intensité de la lumière, *PORB* restant constant et *PORA* indétectable (Su *et al.*, 2001).

Il semble donc que la répartition des rôles entre les différents isoformes de POR chez *Arabidopsis* varie selon le stade de développement ou les conditions lumineuses, avec tout de même un rôle constant supposé pour *PORB*.

Cependant, avant de pouvoir remplir leurs fonctions, les protéines POR doivent être importées dans le plaste. En effet, suite au transfert des gènes chloroplastiques vers le génome nucléaire, les protéines désormais codées par le noyau doivent entrer dans le plaste pour assurer leur fonction. Un système d'import pour permettre aux protéines d'atteindre leur destination finale a donc émergé. Les protéines, de leur côté, ont acquis pour la plupart une séquence localisatrice appelée « peptide de transit » située en position N-terminale.

4.2 Import de la Protochlorophyllide-Oxydoreductase dans les plastes

a. Le système d'import général TIC/TOC

L'import d'un précurseur au travers de la membrane chloroplastique se fait principalement *via* deux complexes hétéro-oligomériques associés, dénommés TOC (*Translocon at the Outer membrane of Chloroplasts*) et TIC (*Translocon at the Inner membrane of Chloroplasts*). Ce système, énergie-dépendant, est considéré comme le système d'import principal. Il fait intervenir de multiples acteurs protéiques aux fonctions différentes : récepteur, canal, senseur redox, hydrolyse GTP/ATP et chaperon (Figure 11).

L'import se déroule en trois étapes (pour revue (Keegstra and Cline, 1999; Gutensohn *et al.*, 2006)). Dans un premier temps, le précurseur se lie de façon réversible à la surface des protéines réceptrices (Toc34 et Toc159), puis une étape d'hydrolyse d'ATP/GTP par ces mêmes protéines permet la translocation partielle du précurseur au travers de la membrane externe par une protéine canal (Toc75). Enfin une hydrolyse d'ATP au sein du stroma permet la translocation finale du précurseur au travers de la membrane interne par un pore (Tic110 / Tic20). Des protéines chaperonnes cytosoliques (hsp70) et/ou plastidiales (hsp70, hsp100 et

cpn60) sont associées à cette translocation mais leur rôle exact reste encore à déterminer (Schnell *et al.*, 1994; Akita *et al.*, 1997; Kouranov *et al.*, 1998).

Une fois dans le stroma, le précurseur acquiert sa forme mature par excision de la séquence de transit par une peptidase de maturation (Figure 11) (SPP pour *Stromal Processing Peptidase*; (Richter and Lamppa, 1998). La protéine est alors dirigée vers sa localisation finale. Dans le cas de protéines adressées aux thylacoïdes, une séquence de transit bipartite est présente, adressant dans un deuxième temps la protéine aux membranes des thylacoïdes ou au lumen (Cline and Henry, 1996).

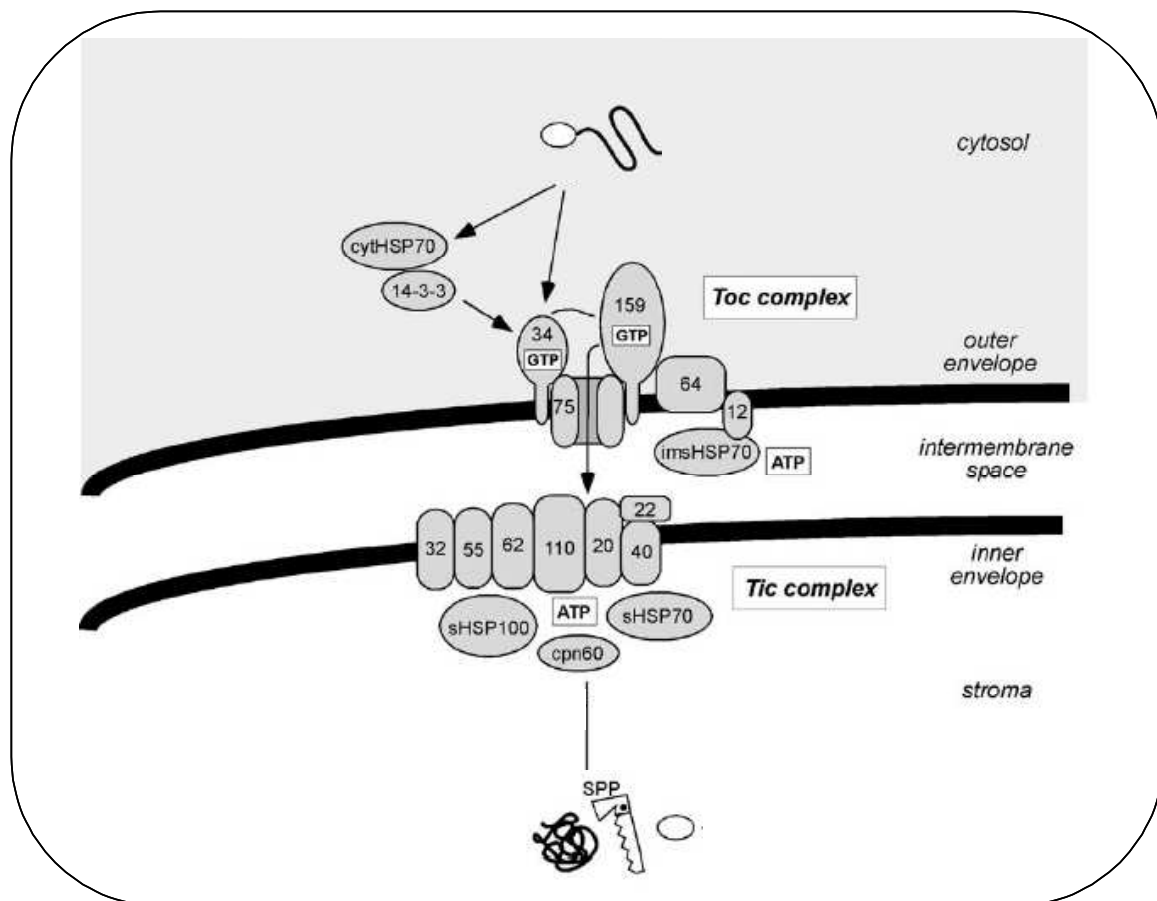


Figure 11 : Représentation schématique de la machinerie d'import général du plaste.

D'après (Gutensohn *et al.*, 2006), avec modifications. Les composants des complexes Toc et Tic sont désignés par leur poids moléculaire (ex : Toc34 = 34 kDa). La séquence de transit de la protéine à importer est représentée par une ellipse blanche. Les fonctions connues ou supposées de chaque protéine sont : Toc159/Toc34 : récepteur et hydrolyse d'ATP/GTP ; Toc75/Tic20/Tic110 : canal ; (Toc64)/Toc12 : protéine d'ancrage du complexe à la membrane ; Tic32/Ti55/Tic62 : senseur de l'état redox ; Tic40 : recrutement de chaperonne. Tic22 : fonction indéterminée. *Cyt-/ims-/s-HSP70* : protéine *Heatschock* de 70 kDa cytosolique/inter-membranaire/stromale. *SPP* : peptidase de maturation du stroma. Voir également les revues de (Keegstra and Cline, 1999; Bedard and Jarvis, 2005).

Plusieurs variants du complexe Tic/Toc existent, impliquant notamment d'autres protéines réceptrices que Toc34 et Toc159 (Toc33 et Toc120/132 respectivement; (Ivanova *et al.*, 2004; Bedard and Jarvis, 2005)). Les différentes combinaisons possibles de ces protéines peuvent conférer une spécificité d'interaction au niveau des précurseurs importés mais également une spécificité tissulaire d'expression, et répondre ainsi au mieux aux besoins des cellules d'un tissu ou d'un organe. En effet, une forte association des deux composants majeurs Toc159 et Toc33 dans les jeunes tissus chlorophylliens suggèrent leur rôle dans l'import de protéines photosynthétiques, très exprimées lors de la biogenèse des chloroplastes. Quant à l'association Toc120-Toc132/Toc34, elle formerait un complexe d'import pour les protéines de ménage peu abondantes (Ivanova *et al.*, 2004). L'existence de complexes spécifiques au substrat éviterait tout effet de compétition entre protéines plus ou moins abondantes lors de la mise en place des structures fonctionnelles chloroplastiques.

a. Les deux voies d'import de pPORA

De structures proches et de fonctions similaires, les protéines PORA et PORB diffèrent sensiblement au niveau de leur peptide de transit. Cela s'accompagne de mécanismes d'import régulés différemment. En effet, si pPORB (protéine précurseur de PORB) est importée de façon constitutive par le système général Tic/Toc (Reinbothe *et al.*, 1995b), l'import de pPORA est quant à lui modulé par la disponibilité de son substrat, la Pchl_{id}e, mais aussi par le stade de développement de la plante. Quant à PORC, aucune publication ne fait référence à son import.

Des tests d'import *in vitro* réalisés sur des étioplastes et des chloroplastes d'orge, de tabac, d'*Arabidopsis* et ainsi que cinq autres espèces de monocotylédones et dicotylédones ont montré un import de pPORA Pchl_{id}e-dépendant (Reinbothe *et al.*, 1995c; Reinbothe *et al.*, 1997; Reinbothe *et al.*, 2000). Cependant il existe des conditions *in vitro* pour lesquelles l'import de pPORA n'est pas dépendant de son substrat (Aronsson *et al.*, 2000; Dahlin *et al.*, 2000; Schemenewitz *et al.*, 2007).

La question étant restée longtemps ouverte, une approche *in vivo* a été utilisée chez *A.thaliana* par Kim et Apel permettant d'y répondre. L'import de protéines de fusion AtpPORA-GFP ou AtpPORB-GFP a été suivi chez des plantules de 5 jours étiolées ou illuminées (Kim and Apel, 2004). Trois génotypes différents ont été utilisés (sauvage, *xantha2* et *flu*) chez qui la disponibilité et la quantité de Pchl_{id}e varient. Le mutant *xantha2* est

incapable de former de la Mg-Protoporphyrine IX et donc de la Pchl_{id}e. A l'inverse, le mutant *flu* présente une accumulation excessive de Pchl_{id}e à l'obscurité (voir §2 de l'introduction).

Les résultats des observations en microscopie confocale suggèrent fortement que pPORA peut être importé à la fois de façon substrat-dépendante et indépendante, le facteur déterminant étant le stade de développement. Dans les cotylédons, l'import de pPORA est substrat-dépendant alors que dans les feuilles post-embryonnaires son import se fait indépendamment de la présence de Pchl_{id}e. Ces résultats valident les deux observations contradictoires obtenues *in vitro*. Des expériences complémentaires ont montré que la régulation de l'import Pchl_{id}e-dépendant de pPORA se fait par l'intermédiaire de son peptide de transit (Reinbothe *et al.*, 1997; Kim and Apel, 2004).

L'import substrat-dépendant d'une protéine au niveau du système Tic/Toc n'étant pas connue à ce jour, la possibilité d'une voie d'import de pPORA différente de la voie générale a été testée. Un complexe de protéines interagissant avec pPORA a été isolé chez l'orge par des expériences de photo-crosslinking (Reinbothe *et al.*, 2000; Reinbothe *et al.*, 2004b; Reinbothe *et al.*, 2004c). Ce nouveau complexe d'import, nommé PTC pour *Pchl*_{id}*e*-*dependant Translocon Complex*, comprend 10 à 12 protéines dont 4 sont identifiées (Ptc52, Ptc47, Ptc33 et Ptc16) dénommées selon leur poids moléculaire en kDa. Trois d'entre elles présentent des homologies avec des protéines du système Tic/Toc (Ptc33 avec Toc33 et Ptc52 avec Tic 55) laissant envisager leur rôle respectif dans l'import de pPORA. Bien que ce complexe n'ait pas encore été identifié chez d'autres espèces que chez l'orge, son rôle dans l'import de pPORA est actuellement étudié au laboratoire par l'intermédiaire de la caractérisation de mutants des gènes homologues d'*A.thaliana* (*ptc52*, *oep16* pour Ptc16). La spécificité restrictive du PTC pour l'import de pPORA n'a pas été encore démontrée et il est possible que ce complexe serve également à l'import d'autres protéines.

L'existence de ces deux voies d'import différentes, impliquant ou non la Pchl_{id}e selon le stade de développement, peut s'expliquer par la présence même de la Pchl_{id}e au sein de l'organe. En effet, dans les cotylédons, la mise en place des structures photosynthétiques nécessitent la synthèse d'un pool initial de chlorophylle expliquant la présence en grande quantité de Pchl_{id}e et de POR à l'obscurité et au début du développement à la lumière. Ainsi un système d'import Pchl_{id}e-dépendant au début du développement limite la présence de Pchl_{id}e libre photosensible et permet d'augmenter la quantité de Pchl_{id}e réduite sans prendre le risque d'une apparition brutale d'oxygène singulet. Au niveau des feuilles post-

embryonnaires développées à la lumière, seuls sont nécessaires une synthèse de chlorophylle en lien avec la croissance des organes et le *turn-over* des pigments chlorophylliens. La quantité de Pchl_{ide} est donc non seulement peu importante mais elle est réduite immédiatement par l'intermédiaire de PORB et PORC, PORA n'étant que très faiblement exprimé à la lumière. L'import substrat-dépendant de pPORA à la fonction photoprotectrice ne semble plus pouvoir porter son rôle. On peut donc émettre l'hypothèse que le PTC ne soit présent ou fonctionnel qu'au niveau des cotylédons, notamment étiolés, important pPORA dans le plaste de manière Pchl_{ide}-dépendante, alors que dans les feuilles, le relais soit pris par la voie générale d'import (Schemenewitz *et al.*, 2007).

4.3 Localisation et organisation de POR dans les plastes.

La distribution de POR dans les plastes varie selon l'état de différenciation de ces derniers. Composante majoritaire de l'étioplaste au sein du stroma, la protéine POR s'associe à la surface des membranes de l'enveloppe et des thylacoïdes sous éclaircissement, toujours sous la forme de complexes ternaires POR-Pchl_{ide}-NADPH.

a. Au sein des étioplastes

Chez les plantes étiolées, POR s'accumule en de larges agrégats dénommées « corps prolamellaires » (PLB pour *prolamellar bodies*) mais aussi dans les membranes des prothylacoïdes, en faibles quantités (Dahlin *et al.*, 1995; Barthélemy *et al.*, 2000). Ces deux structures constituent la majeure partie du contenu d'un étioplaste (Figure 12A), faisant de POR la protéine majeure de ce dernier.

Les corps prolamellaires sont constitués d'un réseau de complexes ternaires POR-Pchl_{ide}-NADPH étroitement liés entre eux par des galacto-sulfo lipides (Dehesh and Ryberg, 1985). L'ensemble présente une structure paracristalline (Williams *et al.*, 1998) (Figure 12-B) qui ne peut se former en cas d'absence de POR. La Pchl_{ide} qui se trouve dans le complexe ternaire est sous forme photoconvertible, c'est à dire capable d'être convertie en Chl_{ide}. En effet, plusieurs formes spectrales de Pchl_{ide} existent. Une corrélation directe entre la formation de ces structures et l'apparition de la Pchl_{ide} photoconvertible F655 a été établie (maximum de fluorescence à 655nm) (Lebedev *et al.*, 1995).

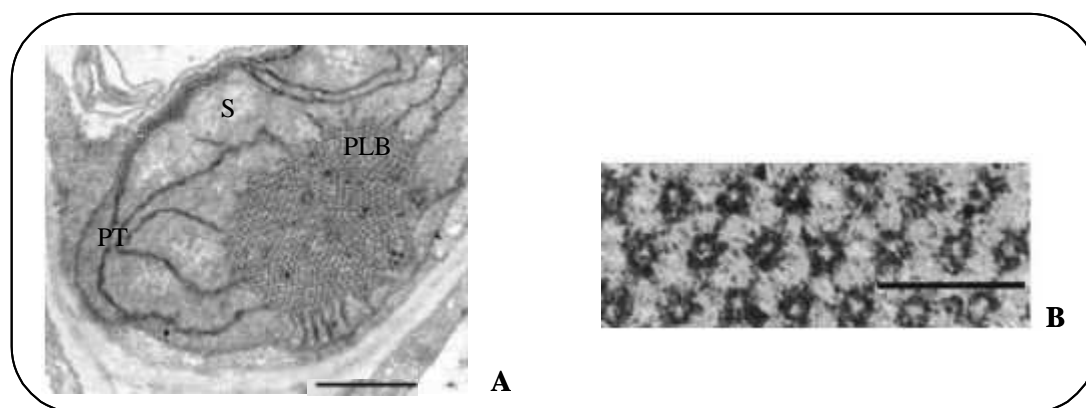


Figure 12 : Ultrastructure d'étioplaste.

A. Coupe ultrafine de cotylédons d'*Arabidopsis* étioilé de 7 jours observée par microscopie électronique à transmission. Echelle 1 µm. D'après (Frick *et al.*, 2003). S: Stroma. PT: Prothylacoïdes. PLB: corps prolamellaires (*Prolamellar Body*) **B.** Section transversale de corps prolamellaires de *Zea mais* issus de plantules étioilées de 8-9 jours, observée par microscopie électronique à transmission. Barre d'échelle 100 nm. D'après (Williams *et al.*, 1998).

Les isoformes PORA et PORB s'exprimant fortement à l'obscurité, les corps prolamellaires sont constitués à la fois de complexes PORA-Pchl_{ide}-NADPH et de complexes PORB-Pchl_{ide}-NADPH dans un ratio PORA/PORB encore indéterminé. Un modèle a été proposé à partir d'études réalisées chez l'orge. D'après ce modèle, un ensemble de 5 PORA-Pchl_{ide}-NADPH pour 1 PORB-Pchl_{ide}-NADPH constitue un complexe stable collecteur de lumière (LHPP: *Light Harvesting POR-Pchl_{ide} Complex*) (Reinbothe *et al.*, 1999; Reinbothe *et al.*, 2003a). Au sein de ce complexe, les deux isoformes ne présentent pas la même affinité pour la Pchl_{ide} *a* ou *b*, avec une affinité forte de PORA pour la Pchl_{ide} *b* et inversement de PORB pour la Pchl_{ide} *a* (Figure 13A). En se basant sur le fonctionnement du LHCII (*Light Harvesting Complex*) où l'on peut observer un transfert d'énergie de la Chl *b* vers la Chl *a*, l'hypothèse d'un transfert d'énergie de la Pchl_{ide} *b* vers la Pchl_{ide} *a* a été proposée au sein du LHPP. Le rôle de PORA dans ce modèle est principalement un rôle d'antenne, *via* la Pchl_{ide} *b*, plutôt que d'enzyme réductrice (Figure 13-B).

Dans ce cas, le rôle du LHPP serait double. Il permettrait une collecte d'énergie optimale pour garantir une synthèse rapide de Chl *a* *via* un transfert d'énergie de la Pchl_{ide} *b* vers la Pchl_{ide} *a* et ainsi permettre une mise en place rapide de l'appareil photosynthétique dès les premiers photons perçus. L'activité photoréductrice de PORA ne serait existante que lors du démantèlement des corps prolamellaires et serait donc très fugace du fait d'une dégradation de l'enzyme à la lumière (Reinbothe *et al.*, 1995a). Le second rôle du LHPP serait un rôle photoprotecteur, sa structure permettant une dissipation de l'excès d'énergie, *via* la Pchl_{ide} *b*

par émission de fluorescence. A ce jour le LHPP n'a pas été identifié chez d'autres espèces et son existence est controversée pour diverses raisons liées notamment à la difficulté de détecter la Pchl *b in vivo* (Armstrong *et al.*, 2000). Il n'en reste pas moins que les corps prolamellaires, organisés ou non sous forme d'un complexe de type LHPP, conservent leurs rôles de collecte d'énergie et de photoprotection.

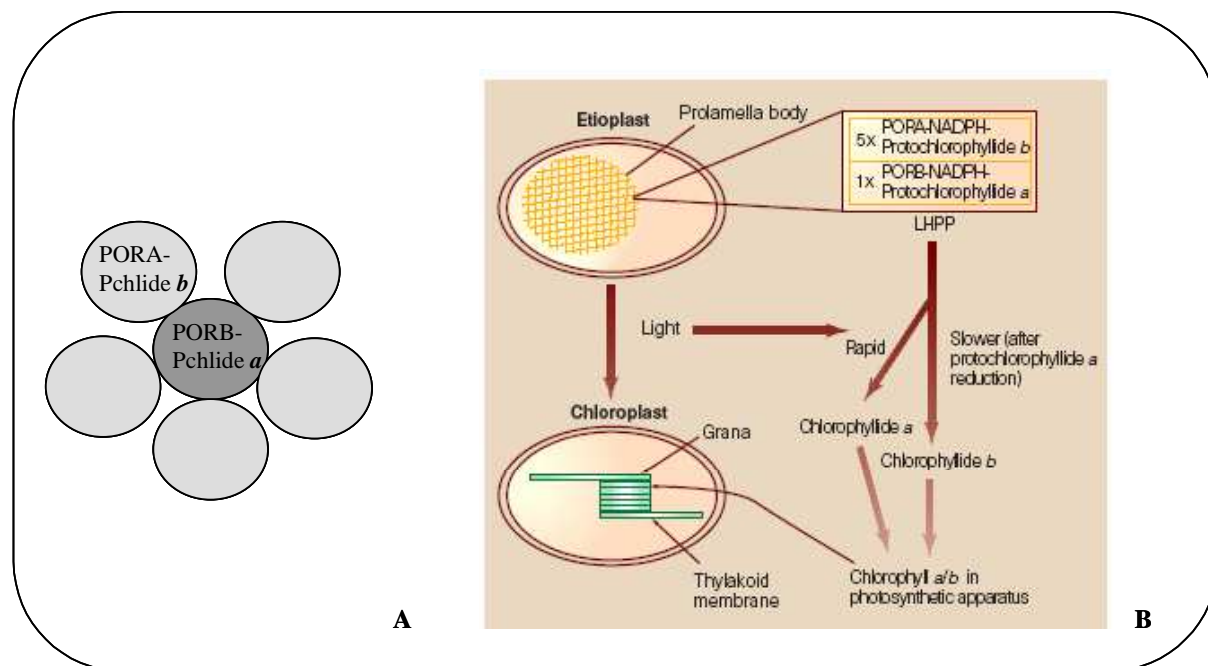


Figure 13 : Modèle du LHPP (Light Harvesting POR-Protochlorophyllide complex).

A. Structure proposée du LHPP. Les complexes ternaires PORA-Pchl *b* –NADHP et PORB-Pchl *a* –NADHP se trouvent dans un ratio 5 : 1, en association étroite avec des galacto-sulfo lipides. **B.** Rôle du LHPP lors de la transformation d'un chloroplaste en étioplaste. D'après (Willows, 1999), Figure construite à partir de (Reinbothe *et al.*, 1999).

Lors de la transition à la lumière, la réaction de photoréduction de la Pchl est catalysée par POR au sein des corps prolamellaires. On observe alors une désagrégation rapide de ceux-ci parallèlement à la mise en place des structures thylacoïdiennes. Une expérience d'immunolocalisation chez le blé réalisée en condition de dé-étiolement (Ryberg and Dehesh, 1986) montre que POR, principalement localisée dans les corps prolamellaires des étioplastes, se retrouve au niveau des prothylacoïdes 30 min après le début de l'exposition à la lumière.

b. Au sein des chloroplastes

Différentes études, dont celle de Ryberg et Dehesh, montrent via des approches différentes que POR est localisée à la fois au niveau de l'enveloppe et des thylacoïdes du chloroplaste.

Des expériences d'immunoprécipitation révèlent la présence de POR au niveau de l'enveloppe du chloroplaste (Joyard *et al.*, 1990) où de la Pchl_{id}e et de la Chl_{id}e ont également été détectées par fluorescence. De leur côté, Teakle et Griffiths ont réalisé des tests d'import de pPOR sur des chloroplastes de pois suivis d'un fractionnement membranaire (Teakle and Griffiths, 1993). Des deux fractions 'stroma' et 'thylacoïde', seule la fraction correspondant aux 'thylacoïdes' contient la POR. De la trypsine a été ajoutée à la fraction 'thylacoïdes', et POR est devenue quasiment indétectable. Ce résultat indique que la protéine se situe principalement à la surface des thylacoïdes. Aucune protéine de type récepteur, qui pourrait jouer le rôle d'intermédiaire de liaison, n'est connue à ce jour. L'étude de la structure secondaire de la protéine par dichroïsme circulaire (Birve *et al.*, 1996) ainsi que des travaux de mutagenèse (Dahlin *et al.*, 1999) ont permis de déterminer que les acides aminés chargés de la POR sont impliqués dans l'interaction avec les membranes thylacoïdiennes. De plus trois résidus Tryptophane, situés au niveau C-terminal de la protéine et à la surface de la structure secondaire de la protéine, seraient aussi impliqués dans l'ancrage de la POR à la membrane des thylacoïdes (Birve *et al.*, 1996). La stabilisation de la POR au niveau de la membrane des thylacoïdes nécessite la présence de NADPH (Dahlin *et al.*, 1999). Ce dernier agit probablement sur la conformation de la protéine, favorisant l'interaction avec la membrane.

La double localisation de la POR au niveau de l'enveloppe et des thylacoïdes pose le problème de la discontinuité topologique de la synthèse de la chlorophylle. Comment la chlorophylle synthétisée dans l'enveloppe peut-elle atteindre les thylacoïdes où les dernières enzymes de la voie se trouvent ? Aucune continuité membranaire n'ayant été démontrée entre l'enveloppe et les thylacoïdes, il est possible que des protéines intermédiaires jouent le rôle de transporteur (Reinbothe *et al.*, 2004a), ou que POR elle-même ait cette fonction, libérant la Chl_{id}e au niveau des thylacoïdes lors de sa dégradation par la protéase.

En résumé, une fois importée dans le plaste, la protéine POR est redirigée soit vers les corps prolamellaires soit vers la membrane des thylacoïdes à laquelle elle va se lier, en présence de Pchl_{id}e et de NADPH. Le complexe une fois en place et en présence de lumière, photoréduit la Pchl_{id}e en Chl_{id}e en quelques nanosecondes. Les dernières enzymes de la voie se trouvant également dans les thylacoïdes, les molécules de Chl fraîchement synthétisées sont donc directement disponibles pour une stabilisation des protéines de l'appareil

photosynthétique lors de sa mise en place (dé-étiolement) ou pour le *turnover* des pigments (à la lumière).

4.4 Rôle des différents isoformes de POR chez *A. thaliana*

La fonction *in vivo* des différents isoformes de POR a été étudiée chez *A. thaliana* avec pour question de fond l'étendue et les limites de leur redondance fonctionnelle.

Les fonctions de PORB et PORC ont été étudiées par la caractérisation des mutants correspondants (Frick *et al.*, 2003; Masuda *et al.*, 2003). Le mutant *porB*, tout comme le mutant *porC*, ne présente pas de phénotype visible au niveau de la plante entière. Toutefois au niveau cellulaire, les étiooplastes du mutant *porB* présentent une nette diminution des corps prolamellaires avec une organisation concentrique des prothylacoïdes (Figure 14), contrairement au mutant *porC* dont la structure des étiooplastes est inchangée par rapport au sauvage (Figure 13A). Dans les deux cas, les concentrations en Pchl_a totale et en Pchl_a libre ne sont pas modifiées et la dé-étiolement ainsi que le verdissement ultérieur de la plante se déroulent normalement, même chez le mutant *porB*. *PORC* ne s'exprimant qu'après 6 heures d'éclaircissement, la protéine PORA semble donc être suffisante pour assurer la synthèse du pool initial de Chl, et permet ainsi la mise en place de structures thylacoïdiennes fonctionnelles lors du dé-étiolement.

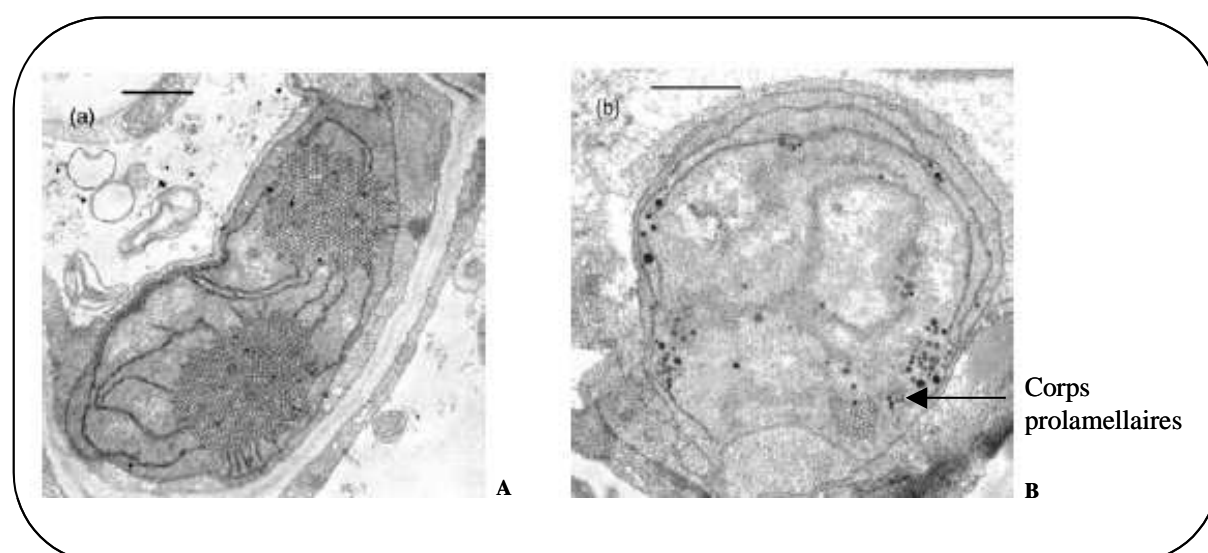


Figure 14 : Ultrastructure des étiooplastes du mutant *porB*.

Observation au microscope électronique à transmission. Plantules d'*Arabidopsis* étioilées de 7 jours. Barre d'échelle : 1 μ m. **A.** Wt col. Une structure similaire est observée chez le mutant *porC*. **B.** Mutant *porB*. D'après (Frick *et al.*, 2003).

Un double mutant *porB porC* a été créé (Frick *et al.*, 2003). Bien que ce mutant germe normalement, il présente au-delà de trois jours un phénotype *xhanta* (jaune) au niveau de cotylédons (faibles quantités de Chl *a* et absence quasi totale de *grana*), conduisant à la mort de la plantule lors d'une exposition à la lumière au-dessus de $30 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. L'enzyme PORA ne semble donc pas pouvoir assurer à elle seule la synthèse de chlorophylle suffisante au développement et à la croissance de la plantule d'*Arabidopsis* à la lumière, rôle partagé par PORB et PORC de façon redondante. Une certaine spécificité d'action de PORC est supposée selon l'intensité lumineuse, avec une présence prépondérante du transcrit lors d'un éclairage de forte intensité (Su *et al.*, 2001; Masuda *et al.*, 2003), laissant supposer un rôle photoprotecteur supplémentaire pour PORC.

Le rôle de PORA n'a pour l'instant été étudié que dans des conditions de surexpression ou à l'inverse d'inhibition d'expression indirecte, aucune étude fonctionnelle faisant état d'un mutant *porA* n'étant publiée à ce jour.

Des expérimentations d'inhibition de l'expression de *PORA* par l'intermédiaire d'un éclairage au rouge lointain (FR pour *Far Red*) inhibant également partiellement l'expression de *PORB* (Barnes *et al.*, 1996; Runge *et al.*, 1996), l'utilisation du mutant photomorphogénétique *cop1 (det140)* chez lequel l'expression de *PORA* est inhibée (Lebedev *et al.*, 1995), ou encore la constitution d'un surexpresser (Sperling *et al.*, 1997) ont permis de confirmer les observations faites précédemment sur la fonction de PORA *in planta* au travers des études d'expression et de la caractérisation des mutants *porB* et *porC*. A savoir, un rôle redondant avec PORB dans la constitution des corps prolamellaires lors d'un développement à l'obscurité, assurant une fonction photoprotectrice et de production d'un pool de chlorophylle initial. A la lumière, le rôle de PORA se limiterait à la synthèse du pool de Chl initial lors de la mise en place des chloroplastes pendant la germination.

Objectif de ce travail

Les approches utilisées jusqu'à maintenant pour caractériser la fonction de PORA impliquent des effets pléiotropiques sur le développement du chloroplaste, faisant principalement intervenir des modifications dans la voie de signalisation de la lumière (FR et mutant *cop1*). Pour répondre plus précisément à la question du rôle de PORA *in planta* nous avons donc caractérisé des mutants d'insertion dans le gène *PORA*, mais aussi étudié l'expression des gènes *POR* au cours du développement et créé un double mutant *porAporB*. Pour des raisons de compréhension nous exposerons d'abord les études d'expression des gènes *POR*, puis la caractérisation de mutants *por* dont fait partie le double mutant *porAporB*, et enfin une série d'expériences menées sur ces mutants nous permettant d'approfondir la fonction de PORA *in vivo*.

CHAPITRE I

Etude de l'expression des gènes *POR*
chez *Arabidopsis thaliana*

CHAPITRE I

Etude de l'expression des gènes *POR* chez *Arabidopsis thaliana*

Les données disponibles dans la littérature sur l'expression des gènes *POR* concernent principalement l'accumulation de leurs transcrits. Nous avons donc décidé d'étudier de façon plus systématique l'expression des gènes et des protéines *PORA*, *PORB* et *PORC* chez *Arabidopsis thaliana* pour compléter ces données. L'accumulation des transcrits et des protéines correspondantes a ainsi été suivie chez l'écotype sauvage Columbia au cours du développement de la plante en modulant notamment les paramètres d'éclairement. Trois conditions de culture ont été étudiées : le développement à l'obscurité (skotomorphogenèse), la sortie d'étiollement (dé-étiollement) et le développement à la lumière (photomorphogenèse). Ces analyses ont été menées par RT-PCR quantitative et immunodétection, et en exploitant les résultats d'études du transcriptome rendus publics.

1. Expression des gènes et des protéines POR au cours du développement

1.1 Germination à l'obscurité : la skotomorphogenèse

Afin de suivre les transcrits et les protéines *POR* lors de la skotomorphogenèse, des graines d'*Arabidopsis* ont été semées sur milieu gélosé et les plantules étiolées ont été récoltées 1 à 6 jours après le déclenchement de la germination.

L'étude de l'expression des transcrits *PORA*, *PORB* et *PORC* a été réalisée sur des ARN totaux extraits de ces plantules par RT-PCR quantitative. L'amplification par PCR en temps réel utilise un couple d'amorces spécifique à chaque gène. La quantité de transcrits détectée à partir du même extrait initial peut varier d'un couple d'amorces à l'autre compte-tenu de la spécificité d'hybridation propre à chaque amorce. Les quantités relatives de transcrits ne

peuvent donc pas être comparées gène à gène, mais seulement pour un même gène (toujours amplifié avec le même couple d'amorces) entre deux échantillons correspondant éventuellement à deux stades différents. Les résultats d'amplification ont été normalisés par rapport à l'amplification du messager de l'actine dans chaque échantillon, ce qui permet d'éliminer les fluctuations liées à des différences quantitatives d'ADNc utilisés pour la PCR. Enfin les quantités de transcrits sont exprimées relativement à la quantité détectée au jour 1, qui constitue donc notre référence interne. L'amplification a été réalisée en triplicat pour un seul ADNc.

Les résultats de l'analyse de l'expression des transcrits *POR* au cours de la skotomorphogenèse se trouvent Figure 15. Les transcrits *PORA*, *PORB* et *PORC* possèdent des profils d'accumulation globalement similaires, avec une induction rapide et importante de l'expression à 3 jours. Cette forte expression est limitée au jour 3, qui correspond chez l'écotype Columbia à la sortie des cotylédons. Cependant l'importance relative de ce maximum d'expression varie d'un transcrit à l'autre : l'expression de *PORA* est très fortement induite avec environ 37000 fois plus de transcrits à 3 jours qu'à 1 jour. Le transcrit *PORB* est quant à lui exprimé 2100 fois plus à 3 jours par rapport au stade de référence, alors que *PORC* ne l'est que 13 fois plus.

Ces profils d'expression obtenus par RT-PCR quantitative confirment les résultats de Northern-blot publiés sur la transcription de *PORA* et de *PORB* au cours de la germination à l'obscurité qui montrent un pic transitoire d'expression à 3 jours (Armstrong *et al.*, 1995). Nous savions par ailleurs que *PORC* n'est pas détecté à l'obscurité par Northern-blot (Su *et al.*, 2001). Le petit pic d'expression détecté à 3 jours par RT-PCR doit donc correspondre à une réelle production de transcrits mais à un niveau très faible.

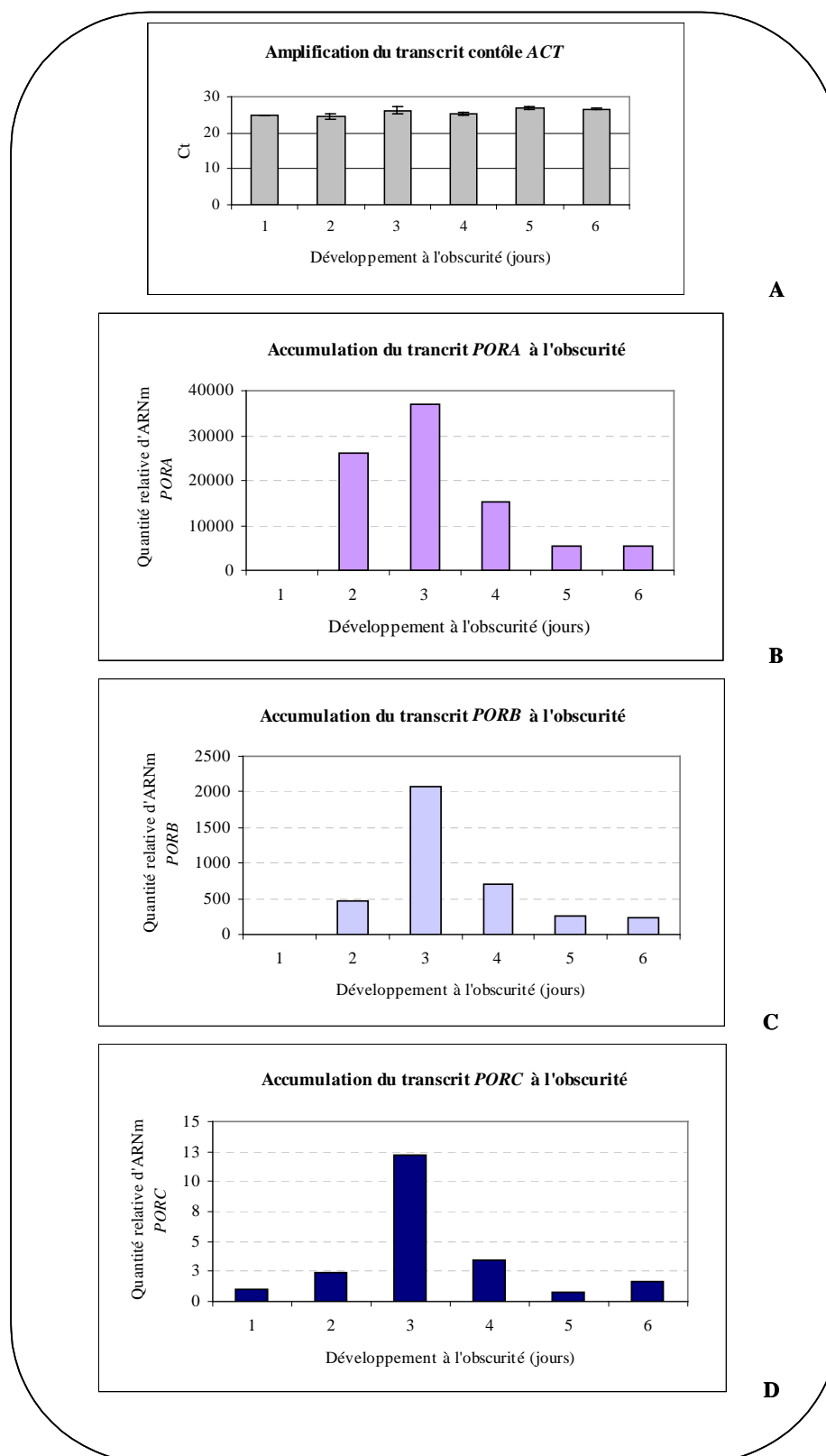


Figure 15 : Profils d'accumulation des transcrits *POR* au cours de la skotomorphogénèse chez *A.thaliana* déterminés par RT-PCR en temps réel.

Le stade « 1 jour » constitue la référence avec une quantité relative de transcrits égale à 1. Les données indiquées représentent la moyenne de trois amplifications pour chaque échantillon. **A.** Expression du gène contrôle *ACT*, en Ct (Ct : nombre de cycles au seuil de la phase exponentielle). **B.** **C** et **D.** Quantification des transcrits *PORA*, *PORB* et *PORC* respectivement.

Les protéines totales ont été extraites du lot de plantules ayant servi à l'analyse d'expression des transcrits. Pour l'ensemble des Western-blot présentés dans ce chapitre, les protéines ont été séparées par SDS-Page en gradient 8%-16% et analysées par Western-blot en utilisant un anticorps anti-PORA d'orge.

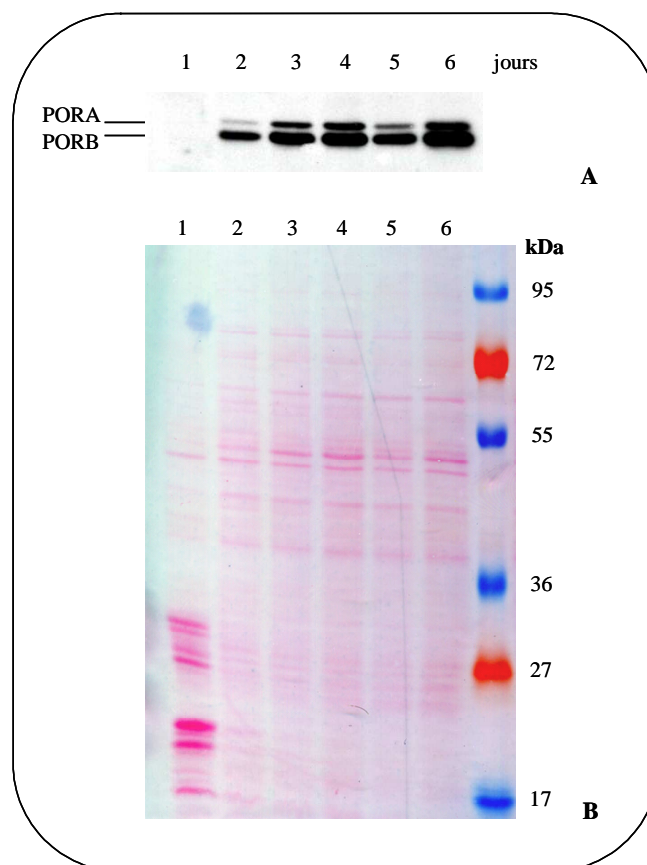


Figure 16 : Accumulation des protéines PORA, PORB et PORC au cours de la germination à l'obscurité.

10 μ g de protéines totales ont été déposées par puits. L'âge des plantules après déclenchement de la germination est indiqué en jours. **A.** Immunodétection des isoformes PORA, PORB et PORC par un anticorps anti-PORA d'orge. **B.** Profil de protéines obtenu par coloration au Rouge Ponceau de la membrane après transfert.

Deux polypeptides de masses moléculaires attendues pour PORA et PORB (37 kDa et 36 kDa respectivement) sont détectées dans l'ensemble des échantillons excepté à 1 jour d'obscurité (Figure 16-A). On note que la protéine PORB est toujours plus abondante que la protéine PORA pour un même stade, contrairement à ce qui a été décrit chez l'orge (Holtorf and Apel, 1996) avec le même anticorps anti-PORA d'orge (Schulz *et al.*, 1989). La différence d'intensité du signal observée pour les stades 2 et 5 jours correspond à une quantité plus faible de protéines chargées, comme l'atteste la coloration de la membrane au Rouge

Ponceau (Figure 16-B). Il n'y a donc pas de variation notable de la quantité de protéines PORA et PORB au cours du temps à partir du moment où elles deviennent détectables, soit dès le 2^{ème} jour de développement, qui correspond à la sortie de la radicule. L'isoforme PORC est quant à lui indétectable quel que soit le stade de développement, bien qu'un transcrit soit détecté par RT-PCR quantitative. Il est possible qu'une très faible quantité de protéine soit présente mais qu'elle soit à un niveau plus bas que le seuil de détection par Western-blot.

La présence relativement constante des isoformes PORA et PORB dans l'ensemble des échantillons contraste avec les profils de transcrits qui montraient un pic important à 3 jours. Cela suggère l'existence de possibles régulations post-transcriptionnelles contrôlant l'accumulation des protéines POR.

1.2 Transition de l'obscurité à la lumière : le dé-étiolement

Des plantules étioilées de 4 jours, cultivées sur milieu gélosé, ont été placées sous une lumière continue d'intensité moyenne ($70 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) pendant plusieurs heures ce qui induit leur dé-étiolement et notamment l'ouverture des cotylédons et le verdissement. Des prélèvements ont été réalisés après différents temps d'exposition à la lumière, c'est à dire de dé-étiolement, et analysés par Western-blot (Figure 17).

Le profil protéique en sortie d'étiolement (4O) correspond de façon attendue à celui vu précédemment lors du développement à l'obscurité : seules les protéines PORA et PORB sont détectées, PORB étant la forme prépondérante. Par la suite, PORA et PORB restent abondantes sans variation notable de leur quantité et ce jusqu'à 3h d'éclairement. Au delà, leurs quantités diminuent fortement, de façon parallèle, pour visiblement se stabiliser entre 8 et 16h : la protéine PORB reste présente en quantité facilement détectable bien que nettement moins abondante qu'à l'obscurité, alors que la protéine PORA est tout juste détectable.

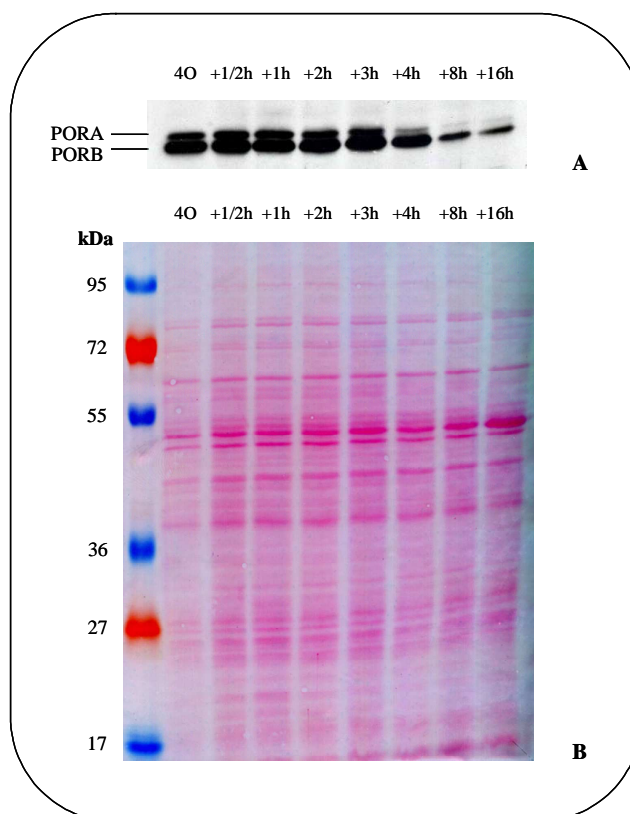


Figure 17 : Accumulation des protéines POR au cours du dé-étiolement.

20 μ g de protéines totales ont été déposées par puits. Les plantules étioilées de 4 jours (40) ont été placées à la lumière continue pendant plusieurs heures (+ 1/2h, + 1h, etc.) **A.** Immunodétection des isoformes PORA, PORB et PORC par un anticorps anti-PORA d'orge. **B.** Profil de protéines obtenu par coloration au Rouge Ponceau de la membrane après transfert.

Ces profils d'expression obtenus à l'obscurité et en dé-étiolement confirment la régulation négative de la quantité des protéines PORA et PORB par la lumière, PORA étant d'avantage concerné (Armstrong *et al.*, 1995). Les profils d'expression de transcrits sont en partie corrélés à une accumulation différentielle des isoformes de la protéine au cours des premiers jours de développement, mais on remarquera que toutes les variations d'expression au niveau des transcrits ne se répercutent pas au niveau de l'accumulation des protéines.

1.3 Développement à la lumière : la photomorphogénèse

a. Germination et développement de la jeune plante

Pour étudier la photomorphogénèse, des graines ont été mises à germer sur milieu gélosé à la lumière continue d'intensité moyenne ($70 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Des jeunes plantes issues de ces germinations sont prélevées chaque jour pendant une semaine, puis à 10 et à 14 jours.

L'étude de l'expression des transcrits *PORA*, *PORB* et *PORC* a été réalisée sur des ARN totaux extraits de ces jeunes plantes par RT-PCR quantitative (Figure 18). Les transcrits *PORA*, *PORB* et *PORC* présentent des profils d'expression différents. Le transcrit *PORA* s'exprime majoritairement à 2 jours avec une quantité relative environ 330 fois supérieure à celle du jour 1 (Figure 18-B) puis son niveau retombe brusquement à celui du jour 1. Les messagers *PORB* et *PORC* s'expriment tout au long du développement (Figure 18-C et D). Ces deux transcrits s'accumulent progressivement, avec un pic transitoire à 3 jours. Leurs taux se stabilisent à partir de 7 jours avec des quantités relatives par rapport au jour 1 supérieures de 80 fois pour *PORB* et de 40 fois pour *PORC*.

Le profil d'expression de *PORA* obtenu par RT-PCR quantitative correspond à celui obtenu par Northern-blot (Armstrong *et al.*, 1995) avec un pic d'expression transitoire à 2 jours. Le Northern-blot nous permet de préciser que l'expression basale à 1 jour, et donc l'expression après le pic à deux jours, est quasiment nulle. Pour *PORB*, la situation est légèrement différente entre les résultats de Armstrong par Northern-Blot et nos résultats de RT-PCR quantitative. En effet, le pic d'expression du transcrit *PORB* détecté à 2 jours par Armstrong est retrouvé à 3 jours avec une intensité relative plus faible au cours de nos analyses. Cette différence d'expression pourrait notamment provenir de la qualité et/ou de l'intensité lumineuse employée. En effet Armstrong et coll. ont réalisé l'expérience avec une intensité de $120 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ alors que nos plantes ont poussé sous $70 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Or nous verrons plus tard que l'intensité lumineuse influence l'accumulation des transcrits POR (voir §3.2 du Chapitre I).

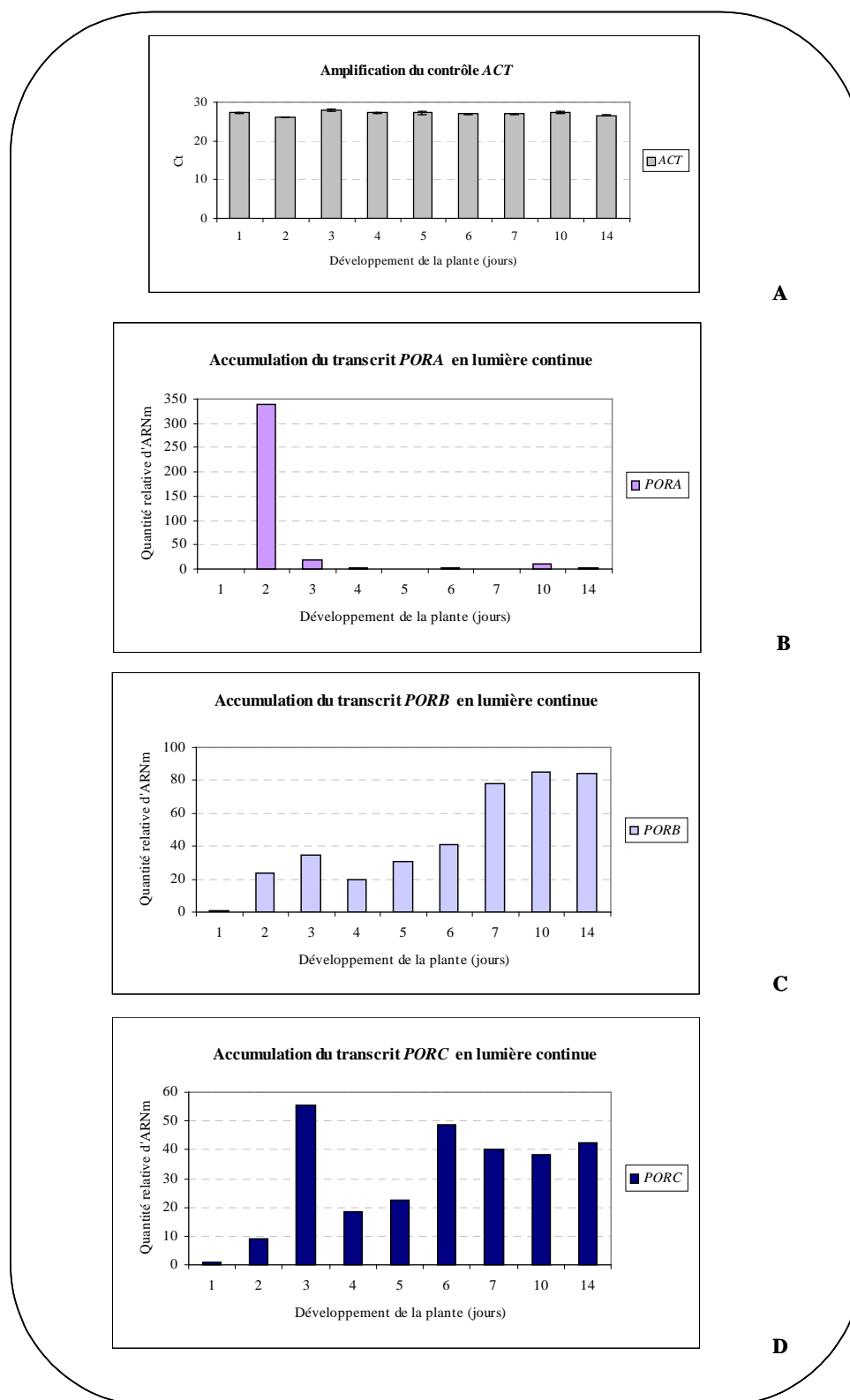


Figure 18 : Profils d'accumulation des transcrits *POR* d'*A.thaliana* au cours de la photomorphogenèse en lumière continue, déterminés par RT-PCR en temps réel.

Le stade « 1 jour » constitue la référence avec une quantité de transcrit égale à 1. Les données indiquées représentent la moyenne de trois amplifications pour chaque échantillon. **A.** Expression du gène contrôle *ACT*, en Ct (Ct : nombre de cycles au seuil de la phase exponentielle). **B.** **C** et **D.** Quantification des transcrits *PORA*, *PORB* et *PORC* respectivement.

Il est délicat de comparer les taux de transcrits de chaque gène *POR* lors de la cinétique à l'obscurité et à la lumière. Néanmoins en faisant l'hypothèse qu'au jour 1 ce taux est comparable à la lumière et à l'obscurité, on constate que l'expression de *PORA* et de *PORB* est nettement réduite à la lumière par rapport à l'obscurité, alors que le taux de transcrit de *PORC* augmente à la lumière. Ces résultats confirment le rôle de la lumière dans la régulation de l'expression des gènes *POR*.

Les protéines totales ont été extraites du même lot de plantules que celles ayant servi à l'analyse d'expression des transcrits et ont été analysées par Western-Blot (Figure 19). L'étude des quatorze premiers jours de développement des plantes d'*Arabidopsis* en lumière continue nous montre que *PORB* est l'isoforme majoritaire quel que soit le stade de développement, avec un maximum d'expression à 3 jours (Figure 19-A). Les protéines *PORA* et *PORC* sont également présentes, excepté au jour 1, mais dans des quantités beaucoup plus faibles que la protéine *PORB*. Leurs maxima d'expression se situent également à 3 jours.

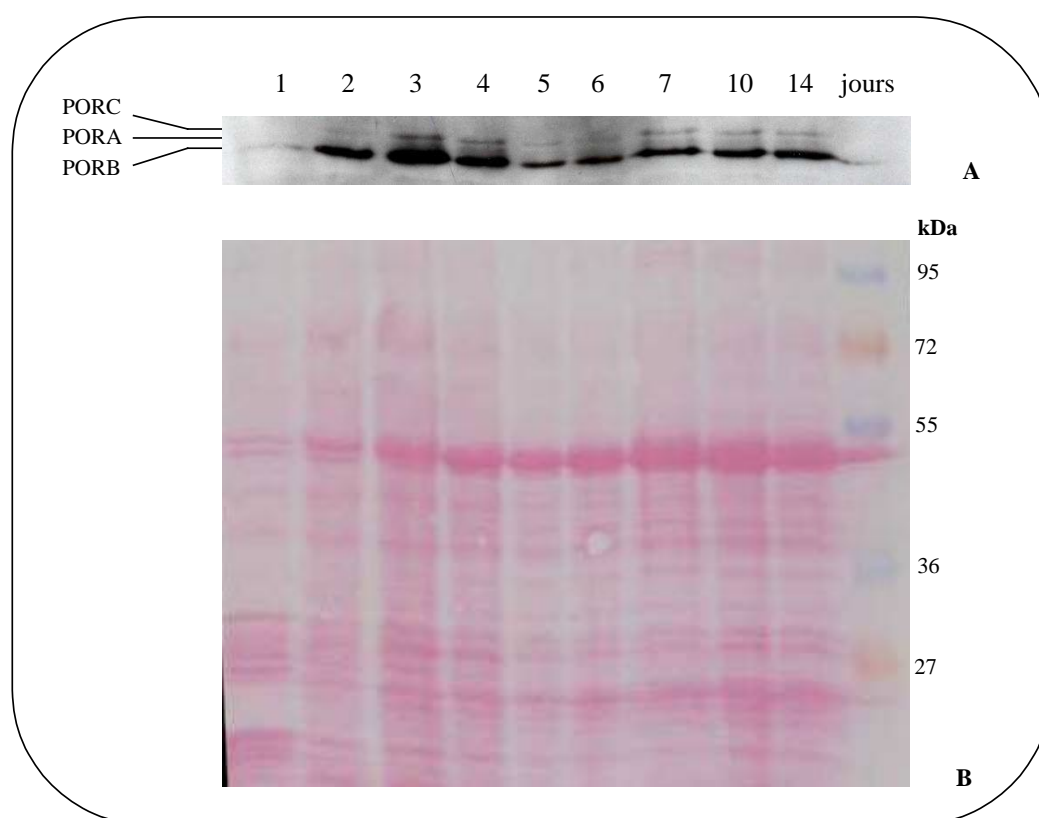


Figure 19 : Accumulation des protéines *POR* au cours de la photomorphogénèse en lumière continue.

20 µg de protéines totales ont été déposées par puits. Les jeunes plantes ont été prélevées tous les jours pendant une semaine, puis à 10 jours et à 14 jours, à partir de lots indépendants. **A.** Immunodétection des isoformes *PORA*, *PORB* et *PORC* avec un anticorps anti-*PORA* d'orge **B.** Profil de protéines obtenu par coloration au Rouge Ponceau de la membrane après transfert.

L'expression transitoire du transcrit *PORA*, seulement le deuxième jour, ne laisse pas présager de la présence de la protéine ultérieurement au cours de la croissance. Il est possible que le faible taux de transcrit soit suffisant pour assurer le *turnover* de la protéine et/ou qu'il existe un mécanisme de régulation permettant la stabilisation de la protéine.

En résumé, lors du développement à la lumière continue, les transcrits et les protéines *POR* sont fortement exprimés autour de 2-3 jours, au moment de la sortie de la radicule puis des cotylédons. Au delà de 4 jours, l'accumulation des protéines *PORA*, *PORB* et *PORC* se stabilise, avec une prépondérance de l'isoforme *PORB*.

b. De la plantule à la plante mature

Une étude du transcriptome nucléaire dans différentes conditions a été effectuée par l'équipe de Gruissem (ETH, Zürich – Suisse). Les données obtenues par analyse de populations d'ARNm d'*Arabidopsis* hybridés sur une puce à ADN regroupant l'ensemble des gènes nucléaires sont disponibles librement (<https://www.genevestigator.ethz.ch>, (Zimmermann *et al.*, 2004; Zimmermann *et al.*, 2005)). Les données dites « Gene Chronologer » (Genevestigator), fournissent à la fois une vue d'ensemble du transcriptome au cours du développement de la plante et une indication sur le stade auquel un gène d'intérêt est préférentiellement exprimé. 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 neuf stades allant de la germination de la graine jusqu'à la plante arrivée à maturité. Les profils d'accumulation des transcrits *POR* au cours du développement de la plante sont représentés sur les Figure 20 et Figure 21.

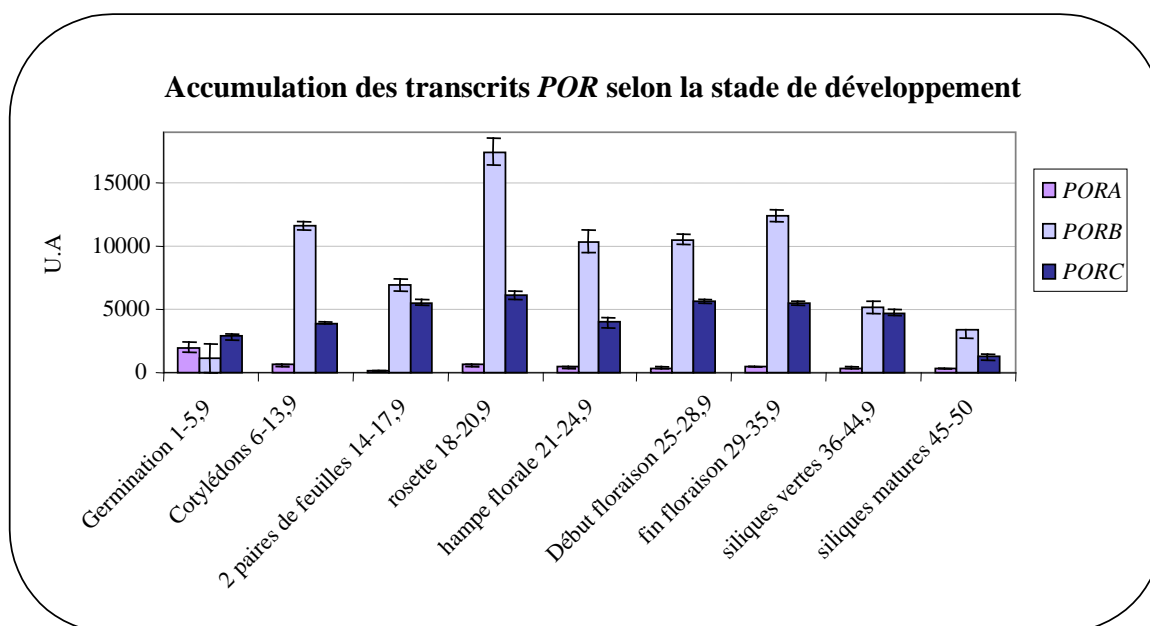


Figure 20 : Profil d'accumulation des transcrits *POR* au cours du développement de la plante d'*A.thaliana*.

Données « Gene Chronologer » de Geneinvestigator. Neuf stades de développement ont été étudiés. Pour chaque stade, la puce est hybridée avec les ARNm correspondants à l'ensemble de la plante. La correspondance en âge de la plante est indiquée en jours (ex : Germination 1-5,9 jours). Les données présentées résultent d'au moins trois répliques réalisées par échantillon.

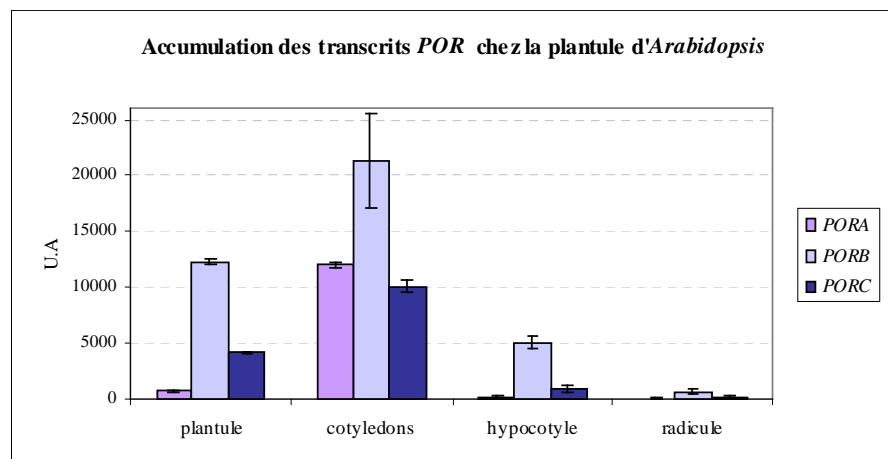
Le premier constat que nous pouvons faire est la prépondérance du transcrit *PORB* par rapport aux messagers *PORA* et *PORC* tout au long du développement (Figure 20), avec un maximum d'expression au stade rosette. L'expression du transcrit *PORA* est principalement liée à la germination, avec une présence certes plus faible mais notable aux stades cotylédons et rosette par rapport à celles des messagers *PORB* et *PORC*. Le transcrit *PORC* présente quant à lui un profil d'expression assez homogène. Présent tout au long du développement de la plante, il s'accumule progressivement pour atteindre son maximum d'expression au stade rosette.

L'ensemble de ces résultats nous indiquent que les transcrits *PORA*, *PORB* et *PORC* sont présents tout au long du développement de la plante d'*Arabidopsis* à la lumière, dans des proportions relatives différentes. Le messager *PORB* est le plus abondant des trois. Toutefois, au moment de la germination les trois transcrits *POR* sont nettement présents.

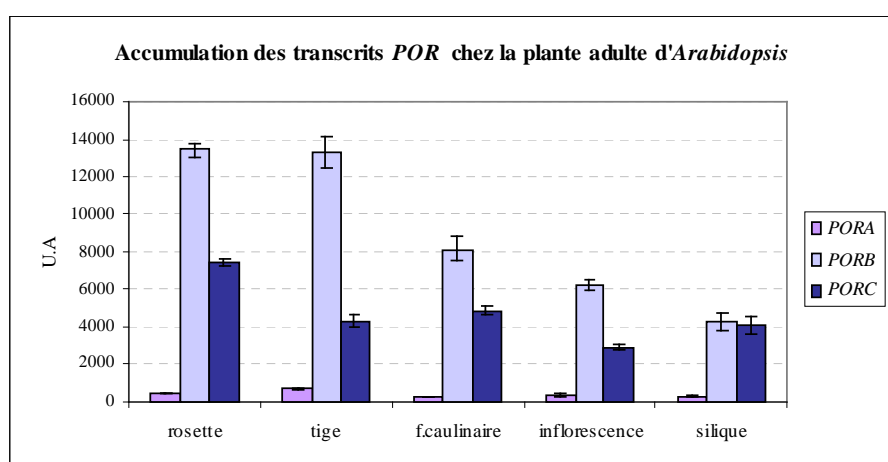
2. Patron d'expression des gènes et protéines POR dans les organes de la plante en développement

L'expression des transcrits a également été étudiée au niveau des organes dans l'étude de transcriptome présentée précédemment. Les données sont regroupées sous le nom de « Gene Atlas » (Genevestigator). Chaque organe étudié dans son ensemble est également décomposé en sous parties analysées indépendamment. Par exemple, les résultats disponibles pour la plantule rassemblent les données de puces hybridées avec les ARN de l'organe entier et les données, indépendantes, de puces hybridées avec des ARN extraits de chacune de ses sous parties : cotylédons, hypocotyle et racine. 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. La Figure 21 présente les données obtenues chez la plantule (Figure 21-A) et chez la plante adulte d'*Arabidopsis* (Figure 21-B et C).

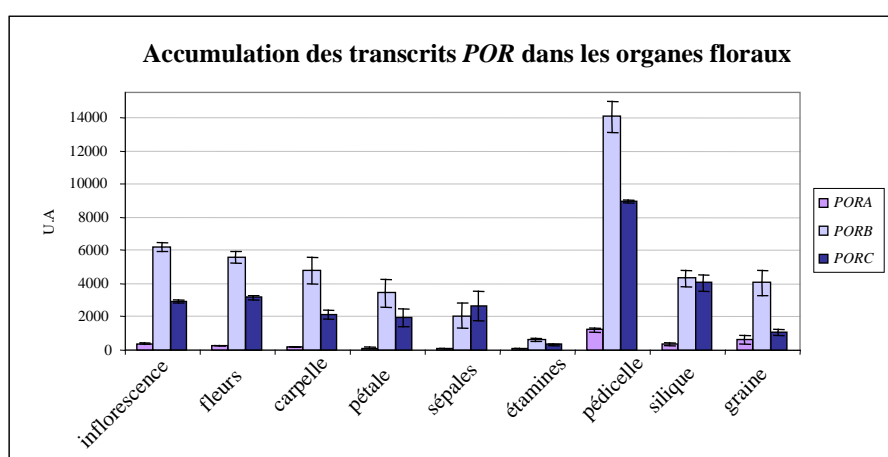
Le transcrit *PORB* est prépondérant dans la plantule entière d'*Arabidopsis* ainsi que dans chaque sous partie (cotylédons, hypocotyle et racine). Les messagers *PORA* et *PORC* s'expriment également fortement dans les cotylédons (Figure 21-A). L'abondance du transcrit *PORB* est également constatée chez la plante adulte, notamment dans la rosette et la tige (Figure 21-B). Le transcrit *PORC* s'accumule aussi dans la rosette alors que le celui de *PORA* est faiblement détectable. D'une façon générale, les quantités de transcrits *PORA* sont sensiblement plus faibles que celles des transcrits *PORB* et *PORC*, mais non nulles, et ce quels que soient les organes. Enfin les transcrits *POR* sont également présents dans les organes floraux (Figure 21-C), avec également une prépondérance du transcrit *PORB*. On remarque une augmentation de l'expression de *PORA* dans les pédicelles, où *PORB* et *PORC* sont aussi fortement exprimés, mais également dans la silique entière et dans les graines.



A



B



C

Figure 21 : Profils d'accumulation des transcrits *POR* au cours du développement de la plante d'*A.thaliana*.

Données « Gene Atlas » de Genevestigator. Les catégories « plantule » et « inflorescence » regroupent l'ensemble des données de chaque sous-partie traitées en parallèle. Les données présentées résultent d'au moins trois répliques réalisées par échantillon.

Afin de comparer ces données d'expression de transcrits avec des données d'accumulation des protéines POR, les protéines totales ont été extraites des différents organes de plantes d'*Arabidopsis* âgées de 8 semaines ayant été cultivées en condition jour long (16h jour/8h obscurité). L'anticorps utilisé ainsi que la résolution du gel n'ont pas permis dans ce cas de différencier clairement les trois isoformes et ce malgré plusieurs expériences répétées.

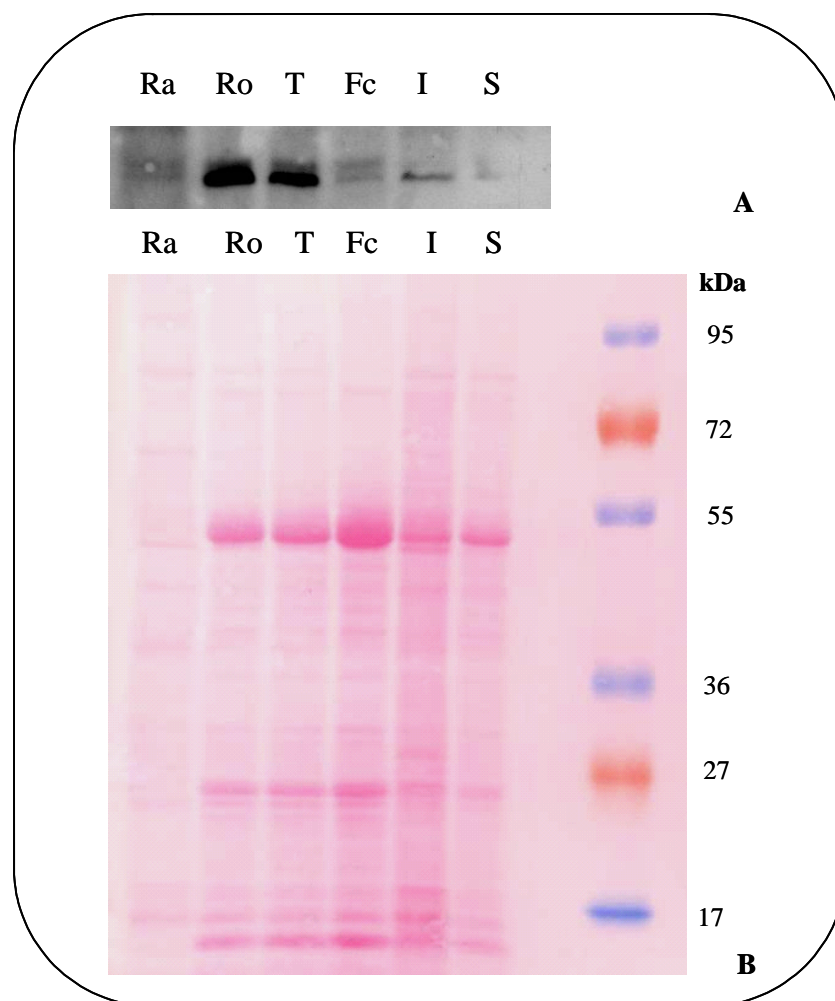


Figure 22 : Accumulation des protéines POR dans les différents organes de la plante adulte d'*Arabidopsis* en jour long.

20 μ g de protéines totales sont déposées par puits. Les prélèvements ont été effectués à 12h, c'est à dire 6h après la fin de la nuit. Ra : racines ; Ro : feuilles de rosette ; T : tige ; Fc : feuilles caulines ; I : inflorescences ; S : siliques. **A.** Immunodétection des isoformes PORA, PORB et PORC avec un anticorps anti-PORA d'orge. **B.** Profil de protéines obtenu par coloration au Rouge Ponceau de la membrane après transfert.

Le Western-blot montre une accumulation préférentielle des protéines POR au niveau des feuilles de rosette et de la tige (Figure 22-A), reflétant la quantité plus importante de transcrits *POR* dans ces organes photosynthétiques.

L'ensemble de ces données nous montrent que les transcrits et les protéines POR sont présents dans tous les organes de la plante. Leur accumulation se fait préférentiellement dans les organes photosynthétiques, à savoir les cotylédons au début du développement, puis les feuilles de rosette ainsi que la tige.

3. Modulation de l'expression des gènes et protéines POR en fonction de l'intensité lumineuse

Il a été suggéré par Su et ses collaborateurs (2001) que la transcription des gènes *POR* était modulée en fonction de l'intensité lumineuse. Afin de confirmer cet effet, des plantules ont été cultivées sur milieu gélosé pendant 3 jours en lumière continue selon des conditions d'intensité lumineuse croissantes, à savoir sous intensité lumineuse faible ($17 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), moyenne ($70 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) ou modérément forte ($315 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$).

Les ARN extraits ont été analysés par RT-PCR quantitative (Figure 23). Les profils d'expression des transcrits *PORB* et *PORC*, globalement similaires, diffèrent de celui du transcrit *PORA*. L'accumulation des messagers *PORB* et *PORC* est quasiment inchangée entre les conditions de lumière faible ou de lumière moyenne (Figure 23-B et C). Cependant, lorsque l'intensité de la lumière augmente, ces deux transcrits sont plus exprimés mais dans des proportions différentes, faible (2 fois plus) pour *PORB* et plus forte (3,5 fois plus) pour *PORC*. De son côté, le transcrit *PORA* est légèrement moins exprimé à la fois en lumière faible (0,5 fois moins) et en lumière forte (0,8 fois moins) par rapport à des conditions d'intensité moyenne (Figure 23-A).

Des expérimentations du même type ont été réalisées lors de l'identification de *PORC* chez *Arabidopsis* (Su *et al.*, 2001) et le profil d'expression du transcrit *PORA* obtenu était différent, avec une augmentation de l'accumulation en condition de lumière faible. La qualité de la lumière, notamment les longueurs d'onde qui la constitue, peut être un facteur important dans la régulation de l'expression de *PORA*. En effet, comme nous l'avons vu au cours de l'introduction, la perception du rouge lointain par le phytochrome A affecte en particulier l'expression de ce gène (Barnes *et al.*, 1996; Runge *et al.*, 1996). Cela pourrait expliquer les différences entre les deux profils obtenus.

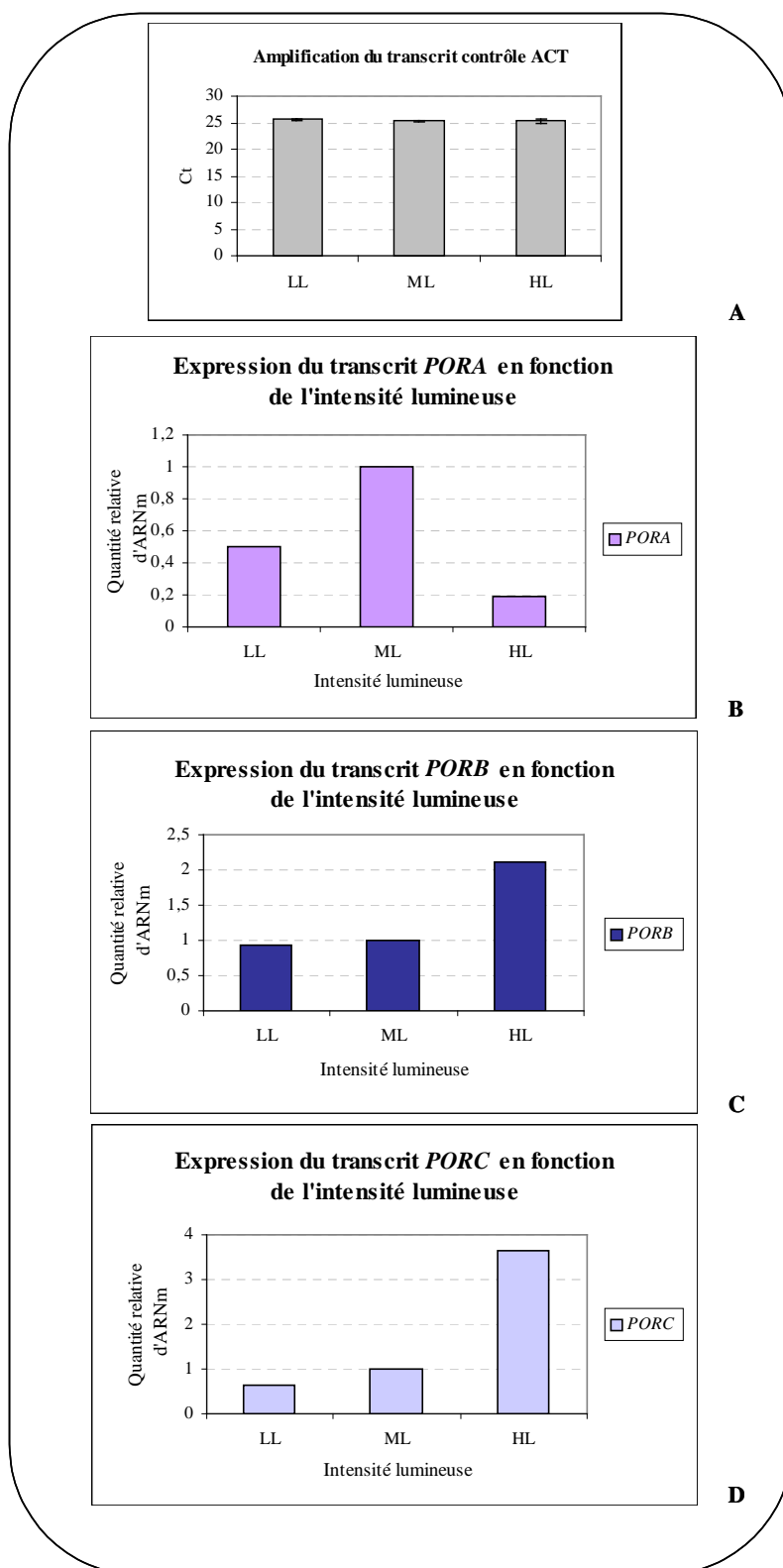


Figure 23 : Accumulation des transcrits *PORA*, *PORB* et *PORC* en fonction de l'intensité lumineuse, suivie par RT-PCR quantitative.

Quantités relatives d'ARNm rapportées à l'actine. Trois conditions sont testées sur 3 jours de culture. LL : *Low Light*, intensité lumineuse faible ($17 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) ML : *Medium Light*, intensité lumineuse moyenne ($70 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) HL : *High Light*, intensité lumineuse modérément forte ($315 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). Les données sont représentatives d'une amplification réalisée en triplicat sur un même ADNc. La condition ML constitue la référence avec une quantité de transcrit égale à 1.

Les protéines totales ont été extraites à partir des trois lots de plantules utilisés pour l'extraction d'ARN et ont été analysées par Western-blot avec un anticorps anti-PORA d'orge. Le résultat de l'immunodétection se trouve Figure 24. Comme pour l'étude du profil d'expression sur différents organes, l'anticorps utilisé ainsi que la résolution du gel n'ont pas permis dans ce cas de différencier clairement les trois isoformes et ce malgré plusieurs expériences répétées. Globalement le profil protéique obtenu est très peu variable en fonction de l'intensité lumineuse. Les modulations de niveaux de transcrits, d'ailleurs relativement faibles, ne semblent donc pas avoir de conséquences majeures sur le niveau des protéines.

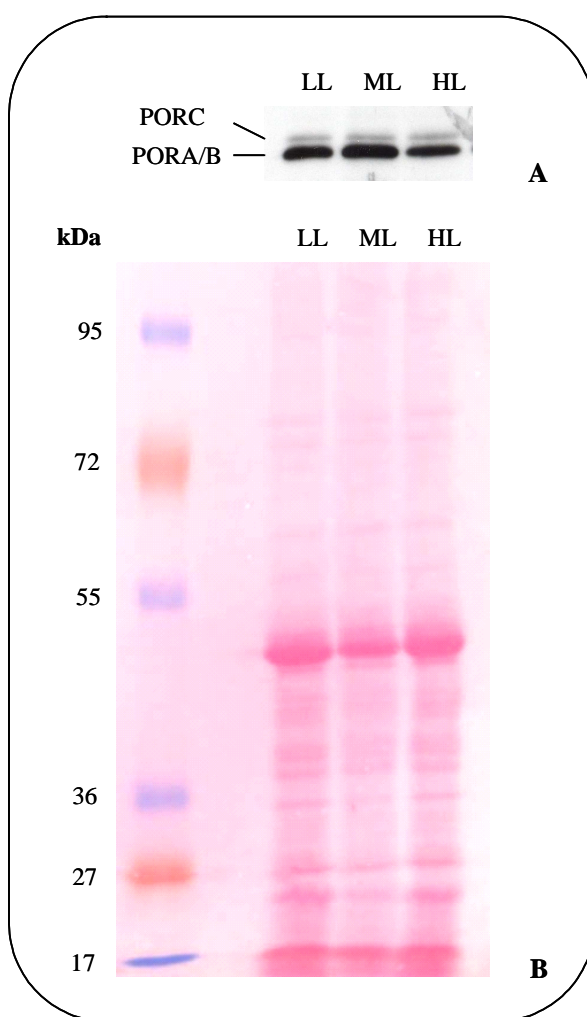


Figure 24 : Accumulation des protéines POR en fonction de l'intensité lumineuse.

Trois conditions sont testées sur 3 jours de culture en éclairage constant. LL : *Low Light*, intensité lumineuse faible ($17 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) ; ML : *Medium Light*, intensité lumineuse moyenne ($70 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) ; HL : *High Light*, intensité lumineuse modérément forte ($315 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). **A.** Immunodétection des isoformes POR avec un anti-corps anti-PORA d'orge. La position supposée des isoformes est mentionnée **B.** Profil de protéines obtenu par coloration au Rouge Ponceau de la membrane après transfert.

L'étude de l'expression des protéines *POR* lors d'un développement à la lumière continue (voir § 1.3 de ce chapitre) montre que les trois isoformes sont présents. Dans le cas d'une mauvaise résolution du gel, la proximité des masses moléculaires des isoformes *POR* ainsi que la prépondérance de la protéine *PORB* peut masquer la présence de la protéine *PORA* (masses moléculaires respectives de 36 et 37 kDa). D'une façon générale, les variations d'expression des transcrits ne semblent pas se refléter quantitativement au niveau des protéines correspondantes. Il est improbable que la détection par l'anticorps soit la cause de cette différence compte-tenu de la présence en excès de l'anticorps, ce qui doit permettre d'avoir une détection relativement quantitative. Cela suggère donc qu'il existe une ou des régulations post-transcriptionnelles particulières contrôlant le niveau des protéines *POR*. Des différences de régulation du *turnover* des protéines *PORA*, *PORB* et *PORC* peuvent notamment être envisagées. Les variations des taux de transcrits détectées ne semblent donc pas être pas significatives biologiquement, du fait de l'absence majoritaire de variations dans l'accumulation des protéines.

La comparaison des profils d'expression obtenus à l'obscurité, en dé-étiolement et à la lumière, confirme la régulation de l'expression des gènes *POR* par la lumière. Cette régulation, négative dans le cas des gènes *PORA* est à l'inverse positive dans le cas du gène *PORC*. Ainsi, lors d'une germination à l'obscurité, seuls les gènes *PORA* et *PORB* s'expriment, avec une accumulation très importante de transcrits et de protéines correspondantes.

L'étude de l'expression des gènes *POR* à la lumière montre qu'ils s'expriment tout au long du développement de la plante *Arabidopsis*, dans des proportions différentes selon les gènes. Ils sont principalement exprimés au cours de la germination, au niveau des cotylédons, et dans la plante adulte au niveau de la rosette et de la tige.

Parmi les trois gènes *POR*, le gène *PORB* est celui qui est majoritairement exprimé quel que soit le stade ou l'organe considéré. L'expression du gène *PORC* est moins importante mais toujours présente à la lumière tandis que celle du gène *PORA* est faible excepté au moment de la germination. Cependant, bien que le transcrit *PORA* soit très faiblement exprimé à la lumière, la protéine correspondante est présente lors du développement de la plante à la lumière. Les données bibliographiques, principalement basées sur l'étude du transcrit par Northern-blot, admettent communément une absence de cette protéine à la lumière. Nos résultats posent donc la question du rôle éventuel de la protéine *PORA* chez la plante adulte.

CHAPITRE II

Caractérisation de mutants *por* d'*Arabidopsis thaliana*

La compréhension de la fonction *in vivo* de PORA passe par l'étude de lignées dont l'expression du gène a été altérée. A ce jour quatre mutants d'insertion sont disponibles pour le gène *PORA* pour lesquels aucune caractérisation phénotypique n'est rapportée. Leurs sites d'insertion sont mentionnés sur la Figure 25.

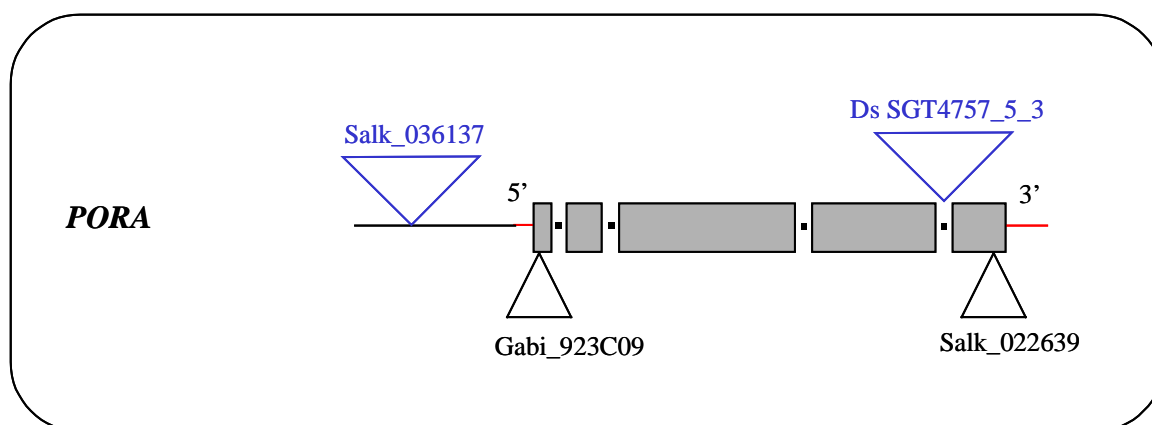


Figure 25 : Représentation du gène *PORA* et des quatre insertions de T-DNA ou de transposon commercialisées concernant ce gène.

Les cinq exons du gène correspondent aux rectangles gris. Les extrémités 5'UTR et 3'UTR (UTR : *Untranslated Region*) du gène sont représentées en rouge. En bleu figurent les deux lignées qui ont fait l'objet de ces travaux.

Nous disposons au laboratoire de deux d'entre elles : la lignée Salk_036137 (nommée ultérieurement *porA*-Salk) et la lignée Ds SGT4757 (nommée *porA*-Ds). Nous avons également créer un double mutant *porA porB* à partir de la lignée *porA*-Ds et d'un mutant *porB* disponible au laboratoire (Reinbothe *et al.*, 2006b). Ce chapitre fait état de la caractérisation de ces mutants.

Un troisième mutant *porA* a également été étudié (WiscDsLox485-488A6, nommé *porA*-WiscLox), initialement présenté sur le site T-DNA Express avec une insertion de T-DNA dans le dernier exon du gène *PORA*, à 9 pb du codon stop. Après vérification, la position de l'insertion s'est avérée inexacte, se situant à 279 pb en aval du codon Stop. Les données obtenues concernant ce mutant ne nous renseignent donc pas sur la fonction de PORA. Elles ont été tout de même placées en annexe 1.

1. Mutant d'insertion *porA-Salk*

1.1 Caractérisation moléculaire du mutant *porA-Salk*

a. Présentation du mutant *porA-Salk* (Salk_036137)

Cette lignée mutante, issue du Salk-Institute (La Jolla, USA), est construite dans un fond génétique *Columbia*. Reçue au laboratoire avant mon arrivée, un premier rétrocroisement avait été réalisé mais aucune analyse particulière n'avait été menée.

Cette lignée *porA-Salk* présente une insertion de T-DNA dans la région promotrice de *PORA* comme le montre la Figure 26. Le site d'insertion a été vérifié par séquençage à partir d'une amorce dans la bordure gauche de l'insertion (LBa1). Initialement prédite à - 287pb, l'insertion se trouve en réalité à - 296 pb du codon initiateur (ATG).

La présence du T-DNA dans la région promotrice a été suivie au cours des générations *via* le génotypage par PCR, en utilisant deux combinaisons d'amorces : AtporA-R3 / *porA*-R pour l'allèle sauvage et AtporAR3 / LBa1 pour l'allèle mutant (Figure 26).

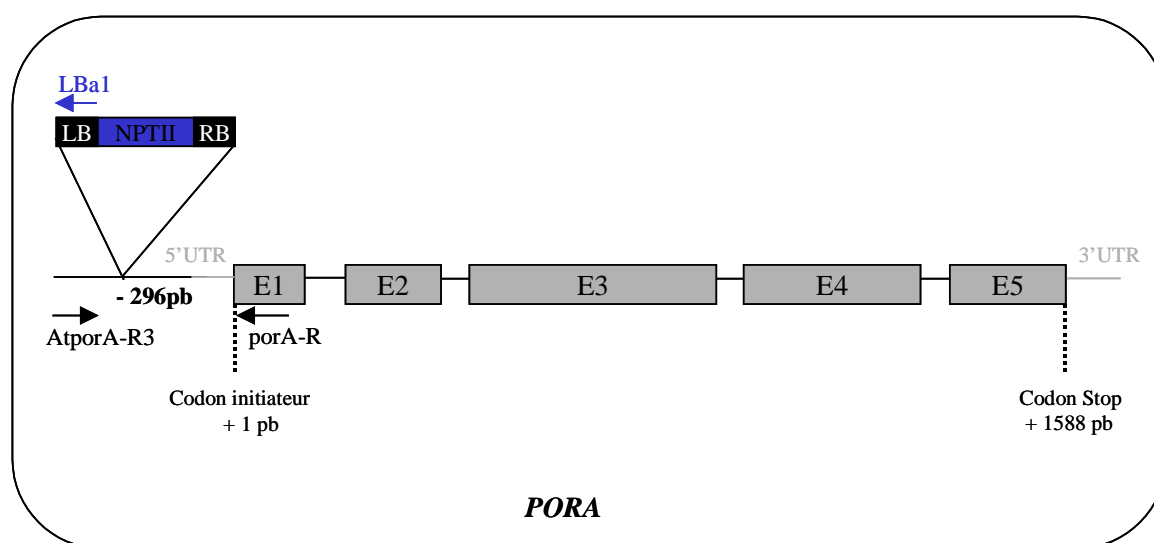


Figure 26 : Représentation du gène *PORA* (At5g54190) et de l'insertion de T-DNA chez le mutant *porA-Salk*.

Les cinq exons du gène sont représentés par les rectangles grisés (E1 à E5). Le T-DNA est délimité par ses bordures gauche [LB : *Left Border*] et droite [RB : *Right Border*] et contient un gène conférant la résistance à la kanamycine [*NPTII*, code pour la Néomycine Phosphoryl Transférase II]. Les couples d'amorces utilisés pour le génotypage, symbolisés sur ce schéma par des flèches, sont AtporA-R3 / *porA*-R (allèle sauvage) et AtporA-R3 / LBa1 (allèle mutant).

b. Isolement de plantes homozygotes *porA-Salk*

Dans le but de permettre l'identification d'individus homozygotes pour l'insertion, une partie de la descendance F2 d'une plante hétérozygote issue du premier rétrocroisement (F2BC1) a été semée sur kanamycine. Il s'est avéré que la plupart des individus étaient sensibles ou partiellement sensibles à la kanamycine. De ce fait, une autre partie de la population F2BC1 a été semée sur terre et génotypée par PCR (Figure 27). Parmi les neuf individus étudiés de la population F2BC1, l'un d'entre eux ne présentait pas d'ADN amplifiable (n°2), six étaient hétérozygotes car ils portaient l'allèle sauvage et l'allèle mutant (n°1-3-4-6-7-8) et deux étaient homozygotes pour l'allèle mutant (n°5 et 9). Ces deux individus ont été conservés afin de produire une descendance homozygote par autofécondation (F3BC1).

L'ensemble des analyses a été réalisé sur la descendance de ces deux familles (F4BC1), nommées ultérieurement simplement *A-Salk(5)* et *A-Salk(9)*.

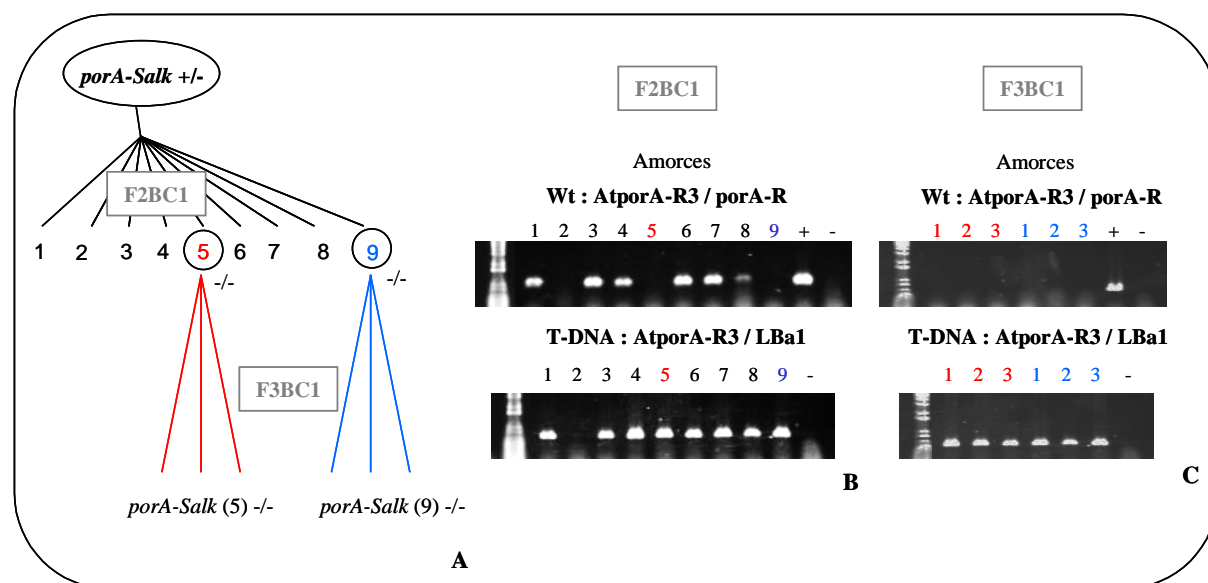


Figure 27 : Identification par PCR d'individus homozygotes *porA-Salk*.

A. Généalogie des plantes étudiées. **B.** Génotypage par PCR de neuf individus de la population F2BC1. Les plantes (5) et (9) sont homozygotes pour l'insertion. **C.** Génotypage par PCR de trois individus de chacune des deux F3BC1 (5 (en rouge) et 9 (en bleu)). [+] Témoin positif de l'allèle sauvage = ADN génomique Wt Col. [-] Témoin négatif = eau.

c. Description phénotypique

Le phénotype des plantes Columbia, *A-Salk(5)* et *A-Salk(9)* a été étudié dans différentes conditions lumineuses (Lumière continue : LC ; Jour long : JL et Jour court : JC) sur un grand nombre d'individus de la F4, ainsi que sur la génération suivante (F5).

L'allure générale des plantes Columbia, *A-Salk(5)* et *A-Salk(9)* est identique (Figure 28). Cependant les plantes de la famille *A-Salk(5)* présentent des rosettes plus larges et des hampes florales plus grandes quelles que soient les conditions d'éclairage. Les rosettes de la famille *A-Salk(9)* présentent également des pétioles légèrement plus longs que les individus Columbia. Aucune autre caractéristique particulière n'est observée. Les familles *A-Salk(5)* et *A-Salk(9)* provenant de la même plante mère, il est à ce stade difficile d'expliquer les différences phénotypiques constatées. La détermination du nombre d'insertion de T-DNA ainsi que des analyses d'expression ont été entreprises dans ce but.

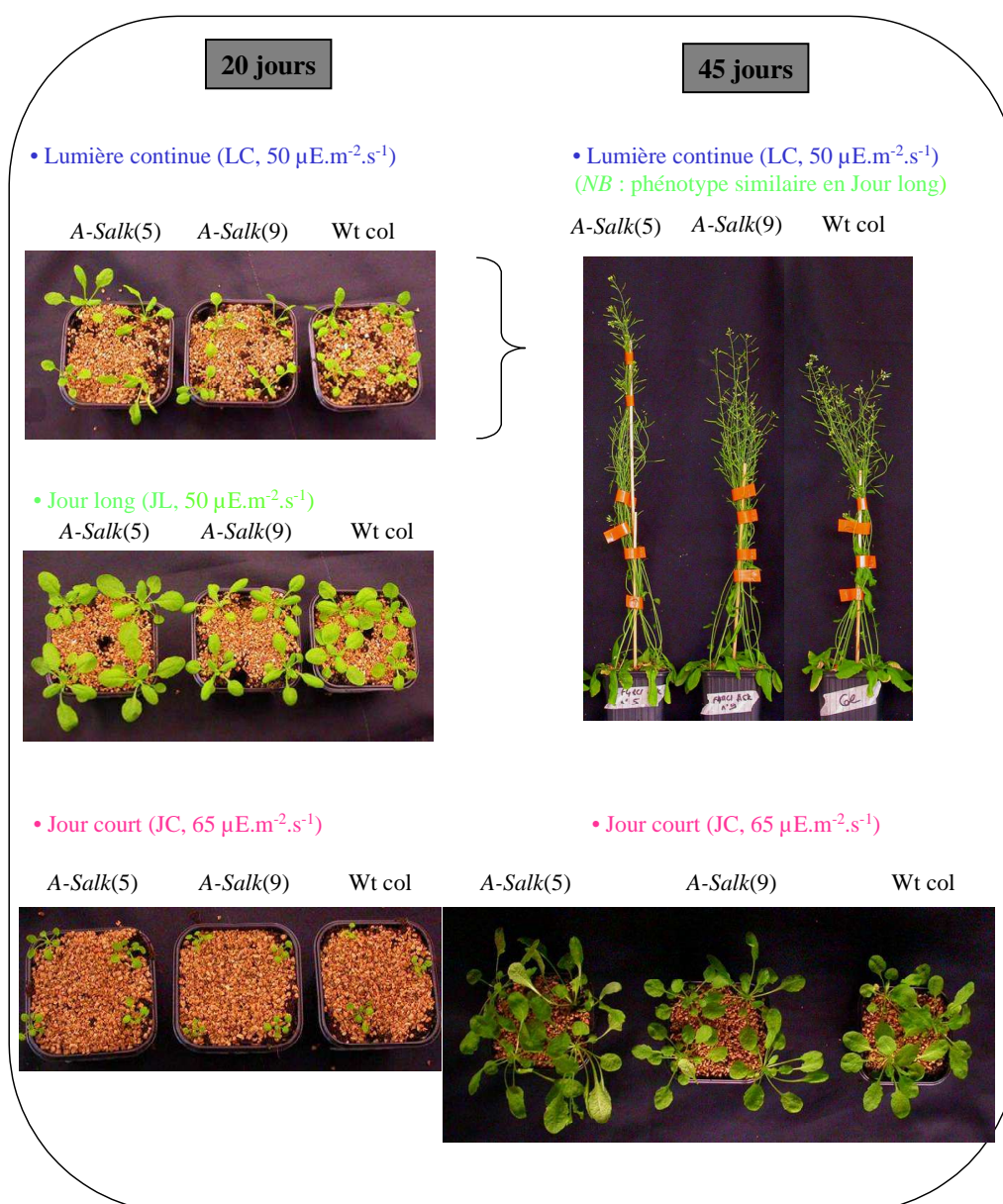


Figure 28 : Développement des plantes *A-Salk(5)*, *A-Salk(9)* et Columbia sous différentes conditions lumineuses 20 jours et 45 jours après semis.

d. Vérification du nombre d'insertions par Southern-blot

Dans le but d'estimer le nombre d'insertions de T-DNA dans la lignée *porA-Salk*, un Southern-blot a été réalisé. L'ADN génomique des familles *A-Salk(5)* et *A-Salk(9)* de la génération F4 du BC1, ainsi que celui du sauvage Columbia, a été digéré par deux enzymes distinctes : *SacI* et *BamHI*. La sonde permettant de détecter la ou les insertions de T-DNA correspond à la séquence codante de *NPTII* (résistance à la kanamycine) (Figure 29-A). Le profil de digestion montre une digestion complète de l'ADN génomique (Figure 29-B).

L'échantillon Columbia montre un profil de Southern-blot vierge, confirmant l'absence d'insertion. Dans le cas de la famille *A-Salk(9)*, un seul fragment de taille attendu est détecté quelle que soit l'enzyme utilisée, indiquant une insertion unique. Cependant, le profil de la famille *A-Salk(5)* est différent. Un seul fragment de taille attendue (4,6 kb) est détecté après la digestion par *BamHI*, alors que la taille du fragment majoritaire détecté après digestion par *SacI* (8 kb) ne correspond pas à celle attendue (4,1 kb) (Figure 29-C). Ce résultat suggère une modification de l'insertion chez la famille *A-Salk(5)* qui peut correspondre à une méthylation ou, de façon moins probable, à un remaniement de l'insertion, conduisant à la disparition du site *SacI* situé dans le T-DNA et ainsi à la détection d'un fragment d'ADN plus grand. Des analyses supplémentaires doivent être effectuées pour vérifier cette hypothèse. Il se peut également que nous ayons à faire à une digestion partielle bien que le profil de digestion semble indiquer une digestion correcte.

La différence de développement observée pour la famille *A-Salk(5)* ne résulte donc pas de la présence d'une insertion supplémentaire et reste à ce stade difficilement explicable.

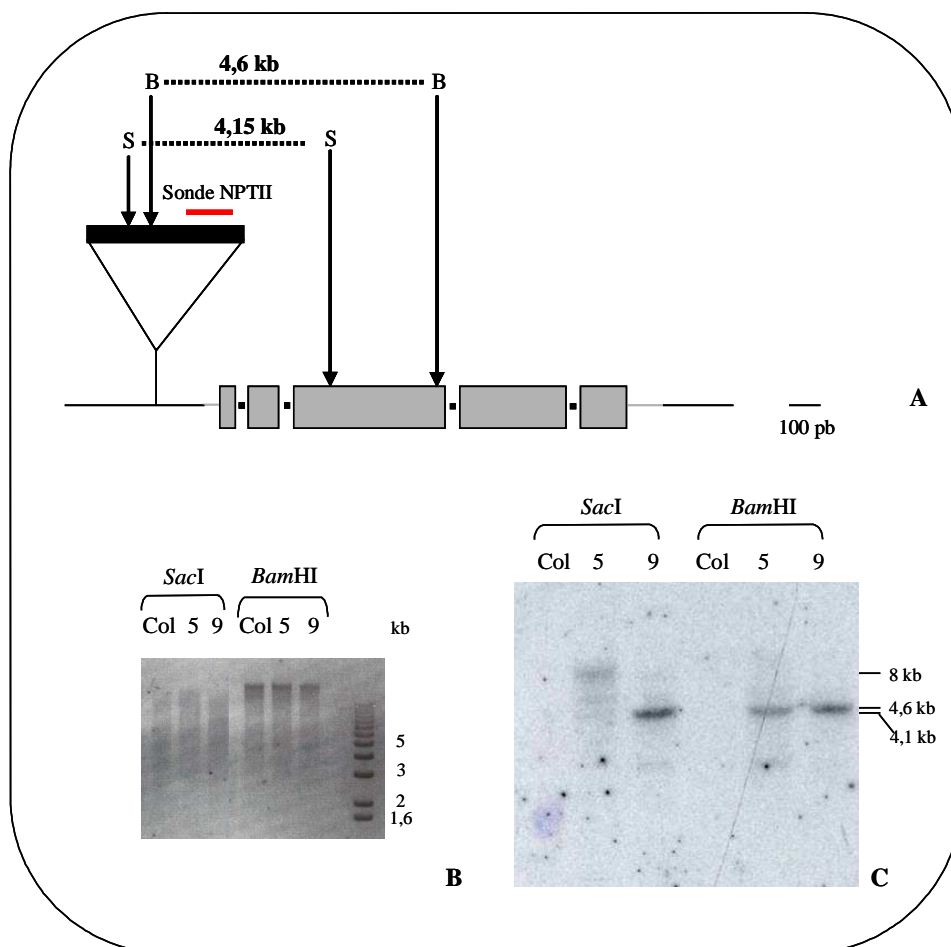


Figure 29 : Détermination par Southern-blot du nombre d'insertions de T-DNA dans la lignée *porA-Salk*.

A. Carte de restriction théorique. Deux enzymes ont été employées : [S] = *SacI* ; [B] = *BamHI*. NPTII : sonde utilisée. La taille attendue (en kb) des fragments d'ADN génomique reconnus par la sonde NPTII est mentionnée. L'insertion de T-DNA n'est pas à l'échelle. B. Profil de digestion visualisé sous UV après coloration du gel au BET. 10 µg d'ADN génomique ont été digérés. C. Autoradiographie du Southern-blot après hybridation avec la sonde NPTII radiomarquée.

1.2 Analyses d'expression

L'expression du gène *PORA* est négativement régulée par la lumière. L'insertion du T-DNA dans la région promotrice du gène *PORA* chez le mutant *porA-Salk*, devrait conduire à une modification de l'expression du gène, en particulier en réponse au signal lumineux. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons suivi l'expression du gène *PORA* au niveau transcriptionnel et traductionnel chez des individus *porA-Salk* se développant à l'obscurité ou à la lumière. L'expression des gènes *PORB* et *PORC* a également été étudiée afin de savoir si une éventuelle modification d'expression du gène *PORA* pouvait affecter celle des deux autres gènes de la famille.

a. Analyse par RT-PCR semi-quantitative et quantitative

Le suivi de l'accumulation des transcrits *POR* par **RT-PCR semi-quantitative** a été réalisé sur des plantules étiolées ou illuminées âgées de 5 jours. Les données obtenues pour les familles *A-Salk(5)* et *A-Salk(9)* sont comparées à celles du sauvage Columbia (Figure 31). L'expression des trois gènes *POR* ainsi que celle de l'actine comme contrôle de charge ont été étudiées sur 20, 25 et 30 cycles, par l'intermédiaire des combinaisons d'amorces mentionnées Figure 30.

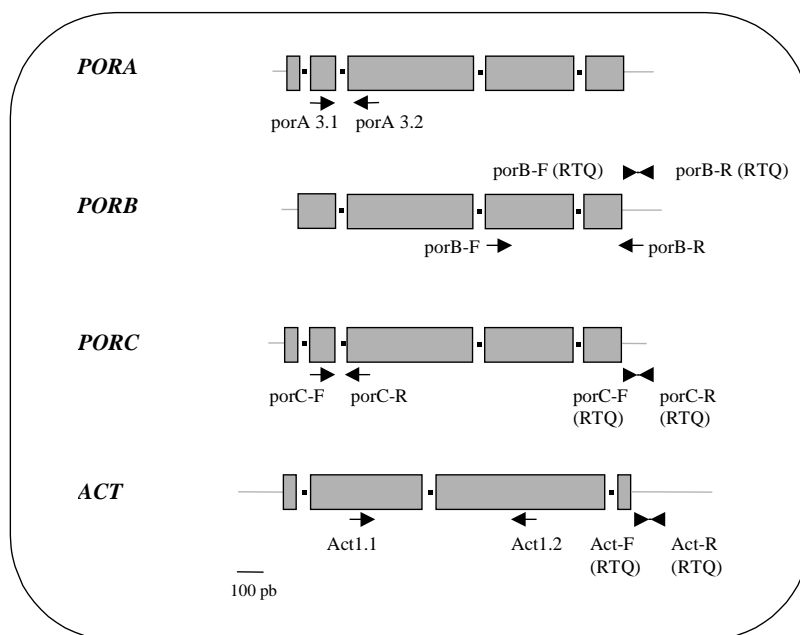


Figure 30 : Positionnement des amorces utilisées pour réaliser la RT-PCR semi-quantitative et la RT-PCR quantitative sur les gènes *POR* et *actine* (*At2g37620*).

Les exons des gènes sont représentés par des rectangles gris, les introns par des points noirs et les régions 5' et 3' UTR par des lignes gris clair. Les amorces utilisées pour la RT-PCR semi-quantitative sont indiquées par des flèches, celles utilisées pour la RT-PCR quantitative par des pointes de flèches. Dans le cas du gène *PORA*, le même couple d'amorce a été utilisé pour les deux types d'expériences.

Plusieurs observations peuvent être faites :

- Le profil d'accumulation du transcrit *PORA* obtenu pour les plantes sauvages Columbia correspond à celui décrit précédemment dans le chapitre I, à savoir une nette différence d'expression entre les conditions « obscurité » (O) (forte présence du transcrit) et « lumière continue » (LC) (présence indétectable). De même, les profils d'expression des gènes *PORB* et *PORC* chez Columbia sont en accord avec les données disponibles dans la littérature.

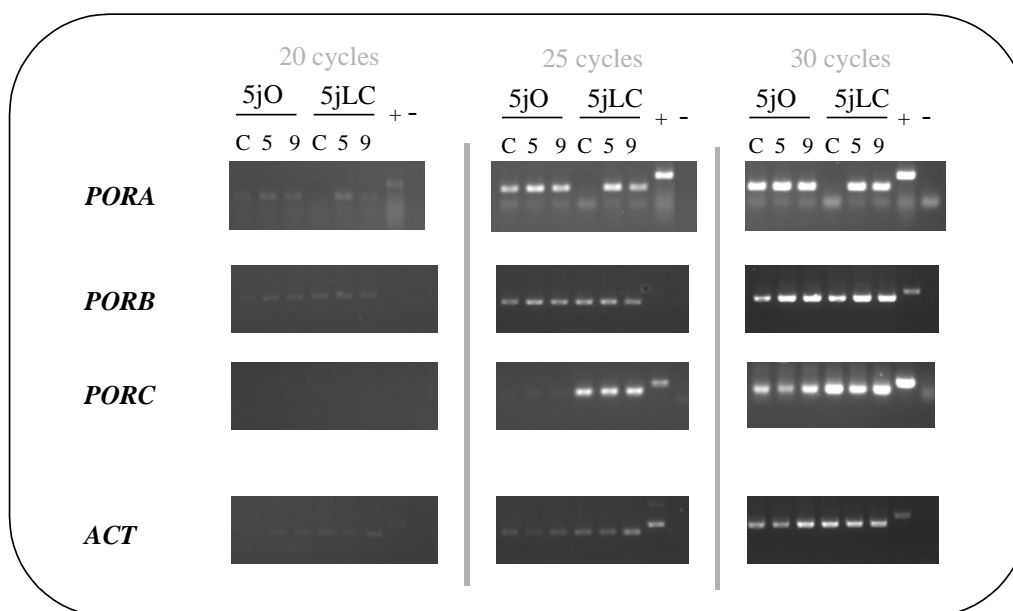


Figure 31 : Analyse d'expression des transcrits *POR* chez le mutant *porA-Salk* par RT-PCR semi-quantitative.

Les ARN ont été extraits sur des plantules sauvages Columbia [C] ou mutantes *A-Salk(5)* [5] et *A-Salk(9)* [9] âgées de 5 jours, étioilées [5jO] ou illuminées en continu [5jLC]. L'expression des transcrits *PORA*, *PORB* et *PORC* ainsi que le contrôle de charge *actine* ont été suivies sur 20, 25 et 30 cycles. [+] Témoin positif de la réaction de PCR : ADN génomique ; [-] Témoin négatif : eau

- Concernant le mutant *porA-Salk*, un transcrit *PORA* est présent aussi bien à l'obscurité qu'à la lumière continue et ce dans les deux familles étudiées. Le mutant *porA-Salk* est donc un mutant non nul qui exprime *PORA* de façon dérégulée à la lumière. Il toutefois possible que le transcrit soit instable et ne reflète pas la présence de la protéine. Nous vérifierons l'accumulation de la protéine par Western-blot (voir b. de ce paragraphe). D'autre part, une différence d'amplification entre les familles *A-Salk(5)* et *A-Salk(9)* est détectée, avec un signal plus fort pour le famille *A-Salk(5)* à la lumière.
- Le mutant *porA-Salk* ne présente également aucune variabilité d'expression pour *PORB* et *PORC*, indiquant que la modification d'expression du gène *PORA* chez le mutant *porA-Salk* n'affecte pas celle des deux autres gènes de la famille par rapport au sauvage.

Afin de quantifier les différences d'expression de *PORA* observées entre les familles *A-Salk(5)*, *A-Salk(9)* et Columbia, une expérience de RT-PCR quantitative a été réalisée avec les couples d'amorces mentionnées (Figure 30). La taille des amplicons ne devant pas dépasser 150 pb et compte-tenu de la forte homologie entre les gènes de la famille *POR*, les amorces ont été choisies dans les régions 3' UTR, augmentant ainsi la spécificité. Seul le couple d'amorces pour *PORA* a été choisit en dehors de la région 3'UTR, de part et d'autre du

deuxième intron. La spécificité de chacune des amorces pour le gène considéré a été vérifiée par comparaison avec les séquences des autres gènes de la famille *POR* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Trois réplifications par échantillon d'ADNc ont été réalisées. Les résultats d'amplification ont été normalisés par rapport à l'amplification du messenger de l'actine de l'échantillon correspondant, permettant d'éliminer les fluctuations liées à des différences quantitatives d'ADNc utilisés pour la PCR. L'accumulation du transcrit *PORA* chez le sauvage a servi de référence pour quantifier celle observée chez le mutant *porA-Salk*. L'accumulation du transcrit est donc exprimée en quantité relative (Figure 32).

Ces résultats confirment ceux obtenus par RT-PCR semi-quantitative. En effet, une accumulation quasi identique de transcrit *PORA* est détectée chez le sauvage et les familles *A-Salk(5)* et *A-Salk(9)* à l'obscurité (2 fois moins de transcrits chez *A-Salk*). En revanche à la lumière, la différence d'accumulation du messenger *PORA* entre les plantes sauvages et mutantes est très importante : les transcrits *PORA* s'accumulent 5700 fois plus dans les plantes mutantes de la famille *A-Salk(5)* et 880 fois plus dans la famille *A-Salk(9)*. Ce résultat, préalablement observé en RT-PCR semi-quantitative, indique une variabilité entre les deux lignées pourtant issues de la même plante mère. La possible modification de l'insertion chez la famille *A-Salk(5)* pourrait en être à l'origine.

Ces résultats indiquent que le mutant *porA-Salk* n'est pas un mutant nul, mais un mutant « gain d'expression » à la lumière. Deux hypothèses peuvent être émises sur l'origine de cette expression constitutive.

- L'origine de transcription peut se trouver au sein du T-DNA lui même. En effet, certaines constructions de T-DNA semblent posséder un promoteur cryptique qui s'exprime. Pour tester cette hypothèse, une RT-PCR a été réalisée avec une amorce dans la bordure droite du T-DNA (RB) couplée à l'amorce *AtporA-R* (Figure 33). Après amplification de 35 cycles, on ne détecte aucun transcrit synthétisé à partir du T-DNA. Ce résultat suggère que la transcription de *PORA* est initiée au même site chez le mutant *porA-Salk* et chez le sauvage. L'expression constitutive de *PORA* chez le mutant *porA-Salk* ne proviendrait donc pas d'une origine de transcription propre au T-DNA. Il faudrait cependant relaiser une 5' race-PCR pour confirmer cette observation

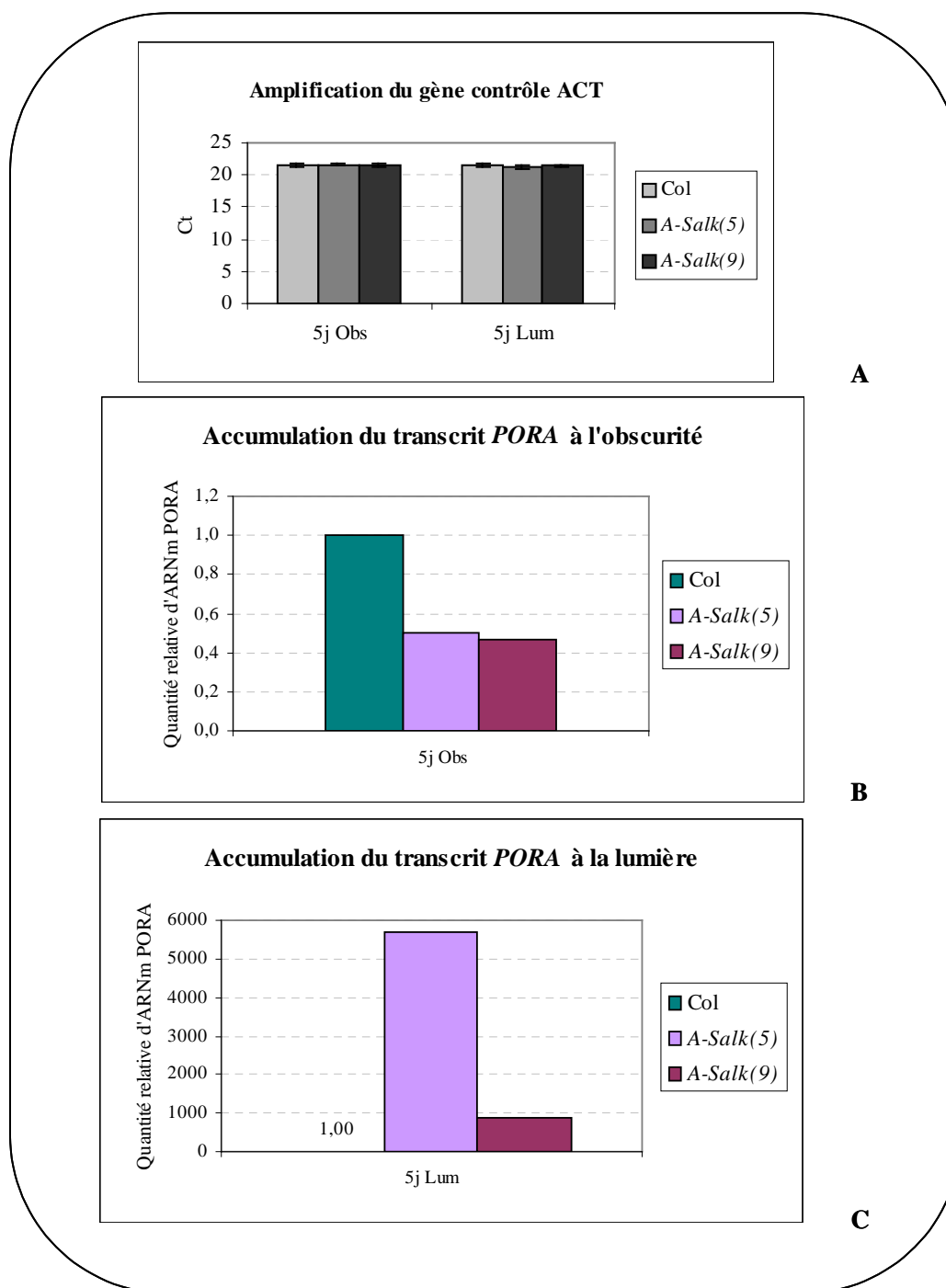


Figure 32 : Analyse de l'expression de *PORA* par RT-PCR quantitative chez le sauvage et les familles *A-Salk(5)* et *A-Salk(9)*.

A. Expression du gène contrôle *ACT*, en Ct. Ct : nombre de cycles au seuil de la phase exponentielle. B. Expression du gène *PORA* chez la plantule étioilée de 5 jours. C. Expression du gène *PORA* chez la plantule de 5 jours à la lumière continue. Dans les deux cas, l'expression chez le sauvage constitue la référence avec une quantité relative d'ARNm égale à 1.

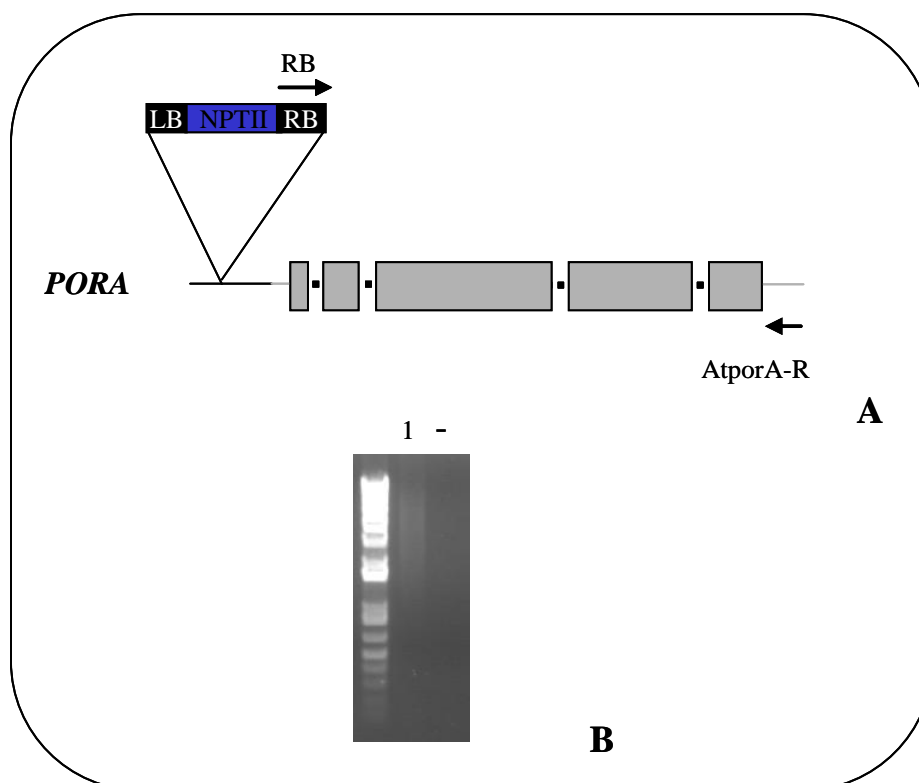


Figure 33 : Vérification de l'absence de transcrit produit à partir du T-DNA lui-même.

A. Les amorces utilisées pour tester cette hypothèse sont symbolisées par des flèches sur la représentation schématique du gène *PORA* [*AtporA-R*] et de l'insertion de T-DNA chez le mutant *porA-Salk* [*RB* : *Right Border*]. **B.** Résultats de l'amplification par PCR sur les ADNc de la famille *A-Salk(5)* avec la combinaison d'amorces *RB* / *AtporA-R* [1]. [-] Témoin négatif : eau.

L'insertion du T-DNA dans la région promotrice peut engendrer une dérégulation de l'expression du gène *PORA* par la lumière.

Des éléments cis-régulateurs de type *GT1CONCENSUS* ou *IBOXCORE* sont classiquement impliqués dans la régulation de la transcription par la lumière. L'étude *in silico* du promoteur du gène *PORA* (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html>) montre la présence de ce type de séquences de part et d'autre du site d'insertion du T-DNA chez le mutant *porA-Salk*. Nous supposons que l'insertion modifie l'accessibilité des éléments cis-régulateurs aux facteurs de transcription, atténuant ou éliminant l'effet régulateur de la lumière. Il en résulte une expression constitutive forte de *PORA* à la lumière chez le mutant *porA-Salk*. La possible modification de l'insertion dans la famille *A-Salk(5)* (ex : méthylation) peut également reconfigurer l'accessibilité des éléments cis-régulateurs, atténuant d'avantage l'effet négatif régulateur de la lumière.

b. Analyse par Western-blot

Les protéines analysées par Western-blot ont été extraites à partir du même échantillon de plantules d'*Arabidopsis* qui a servi à l'extraction d'ARN. La membrane issue du transfert, colorée au Rouge Ponceau, montre qu'une quantité équivalente de protéines entre les échantillons d'une même condition a bien été déposée (Figure 34).

A l'obscurité, deux polypeptides de masses moléculaires attendues pour les protéines PORA et PORB (37 et 36 kDa respectivement) sont détectés par l'anticorps anti-PORA d'orge (Figure 34-A). Aucune différence notable n'est observée entre les extraits de plante sauvage et ceux des deux familles *porA-Salk*. A la lumière, ce sont trois polypeptides de masses moléculaires attendues correspondant aux protéines PORA, PORB et PORC (37, 36 et 38 kDa respectivement) qui sont détectés par l'anticorps anti-PORA d'orge (Figure 34-B). Il est intéressant de noter que la présence de la protéine PORA chez l'individu sauvage Columbia à la lumière est confirmée, et ce malgré une accumulation très faible de transcrits correspondants à la lumière.

Bien que le profil d'accumulation du transcrit *PORA* soit différent entre le sauvage et les deux familles *porA-Salk* dans les cotylédons (5 jours), le profil d'accumulation des protéines ne présente aucune différence, suggérant une régulation post-traductionnelle de l'expression de *PORA*. Une hypothèse impliquant l'import Pchl_{ide}-dépendant de PORA peut en particulier être avancée : alors qu'à l'obscurité, la Pchl_{ide} est fortement présente compte-tenu du blocage de la voie au niveau de sa réduction, à la lumière sa quantité est très faible puisque qu'elle est réduite en continue par l'enzyme POR. Dans le cas d'une forte expression de la protéine PORA, dont l'import est Pchl_{ide}-dépendant dans les cotylédons, la quantité de Pchl_{ide} produite devient un facteur limitant. Or les dernières études du groupe d'Apel sur le sujet (Kim and Apel, 2004) montrent que la protéine PORA est rapidement dégradée si elle n'est pas importée dans le plaste. Ainsi l'hypothèse d'un import Pchl_{ide}-dépendant limitant dans les cotylédons illuminés et l'instabilité de la protéine non importée dans le cytoplasme expliquerait dans notre cas, l'absence d'accumulation excessive de la protéine PORA dans les cotylédons illuminés du mutant *porA-Salk*.

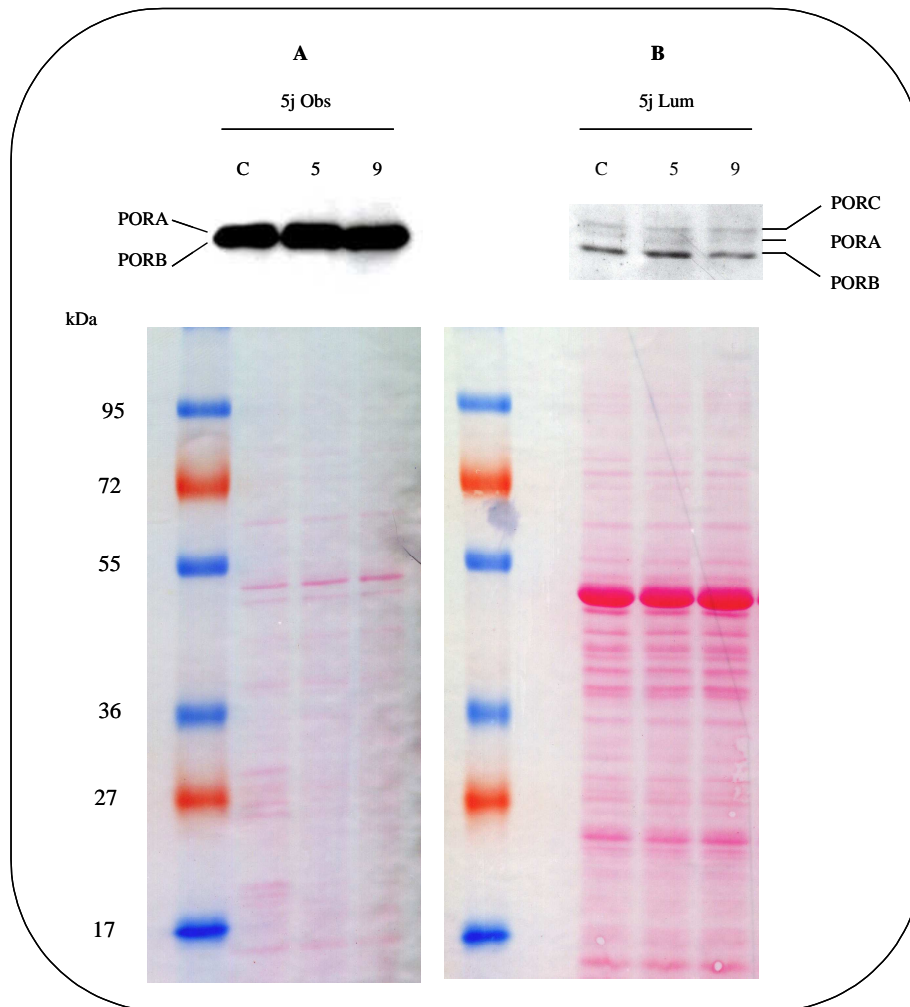


Figure 34 : Immunodétection par Western-blot des protéines PORA, PORB et PORC chez le mutant *porA-Salk*.

Les protéines ont été extraites sur des plantules âgées de 5 jours étioilées [A : 5j Obs] ou illuminées en continu [B : 5j Lum]. [C] Columbia, [5] *A-Salk(5)*, [9] *A-Salk(9)*. Incubation avec un anticorps anti-PORA d'orge. Aux extrémités gauche et droite figurent la coloration des membranes correspondantes au Rouge Ponceau. 5µg de protéines pour la condition « 5j Obs » ou 20µg pour la condition « 5j Lum » ont été chargées sur gel SDS-Page.

Les analyses d'expression, portant sur des plantules âgées de 5 jours, nous montrent que le mutant *porA-Salk* accumule d'avantage de transcrits *PORA* à la lumière dans les cotylédons que le sauvage Columbia. Nous ne sommes pas en mesure d'établir à ce stade un lien entre ce gain d'expression au début du développement et la différence développementale constatée chez la plante adulte, en particulier pour la famille *A-Salk(5)*. Des analyses d'expression doivent pour cela être conduites sur des individus adultes. D'autre part, si cette surexpression est confirmée, une analyse de coségrégation doit être réalisée pour vérifier si le phénotype de forte croissance de la famille *A-Salk(5)* est toujours associé à une surexpression de *PORA*

L'étude du mutant *porA-Salk* nous montre qu'il ne s'agit pas d'un mutant nul mais plutôt d'un mutant « gain d'expression ». L'insertion, située dans la région promotrice du gène *PORA*, engendre la dérégulation de l'expression de ce gène par rapport au signal lumineux. Il en résulte une expression constitutive du transcrite *PORA* à la lumière chez la plantule, ayant peu d'effet sur le niveau de protéine accumulée. Il est délicat de corrélérer ces études d'expression réalisées sur des plantules au stade « cotylédons » avec les différences de développement au stade adulte (voir § 1.1 c de ce chapitre). Des études d'expression complémentaires sur des stades de développement plus tardifs sont donc programmées.

2. Mutant d'insertion *porA-Ds*

2.1 Caractérisation moléculaire du mutant *porA-Ds*

a. Présentation du mutant *porA-Ds*

La lignée *porA-Ds* (Ds SGT4757_5_3) a été produite par le laboratoire de Cold Spring Harbor (New York, USA). Dans un fond génétique *Landsberg erecta*, la lignée présente une insertion d'un transposon Ds dans le 4^{ème} et dernier intron, à 177 pb en amont du codon Stop (Figure 35). Cette insertion résulte d'un événement de transposition à partir d'un locus initial, provoqué par la transposase Ac au cours d'un croisement antérieur (Parinov *et al.*, 1999). Le site d'insertion annoncé a été confirmé par séquençage à l'aide d'une amorce située sur la bordure 5' (Ds-5'2).

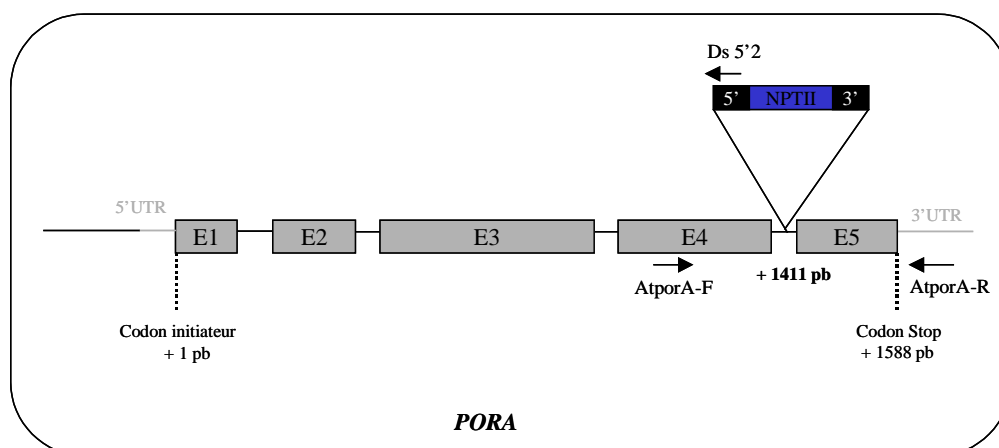


Figure 35 : Représentation du gène *PORA* (At5g54190) et du transposon chez la lignée *porA-Ds*. Les cinq exons du gène sont représentés par les rectangles grisés (E1 à E5). Les régions transcrites mais non traduites (3' UTR et 5' UTR) sont représentées par des lignes pleines grises. Les extrémités du transposon sont définies comme l'extrémité 5' et l'extrémité 3'. L'insertion contient un gène conférant la résistance à la kanamycine [*NPTII*, qui code pour la Néomycine Phosphoryl Transférase II]. Les combinaisons d'amorces utilisées pour le génotypage, symbolisées sur ce schéma par des flèches, sont AtporA-F / AtporA-R (allèle sauvage) et AtporA-F / Ds-5'2 (allèle mutant).

b. Développement des individus de la lignée *porA-Ds*

Une fois les graines de la génération F3 réceptionnées, quelques unes d'entre elles ont été semées sur milieu MS. Deux phénotypes sont apparus : la majorité des plantes avaient un phénotype semblable à celui du sauvage *Landsberg*, semé en parallèle, tandis que quelques unes d'entre elles présentaient un phénotype nain et vert pâle (Figure 36-A). Les plantules ont été transférées en terre puis la présence du transposon a été déterminée par PCR et à l'aide des combinaisons d'amorces suivantes (Figure 35) : *AtporA-F* / *AtporA-R* pour l'allèle sauvage, et *AtporA-F* / *Ds 5'2* pour l'allèle mutant.

Les résultats de génotypage (Figure 36-B) mettent en évidence un lien entre le phénotype nain et vert pâle et la présence de l'insertion à l'état homozygote. En effet, les quelques plantes naines se sont toutes avérées homozygotes, alors que les plantes de stature normale ont été détectées hétérozygotes ou sauvages pour l'insertion. Ce lien restant à confirmer sur un plus grand nombre d'individus, toutes les plantes hétérozygotes ont été conservées et amenées à graine pour produire la génération suivante (F4).

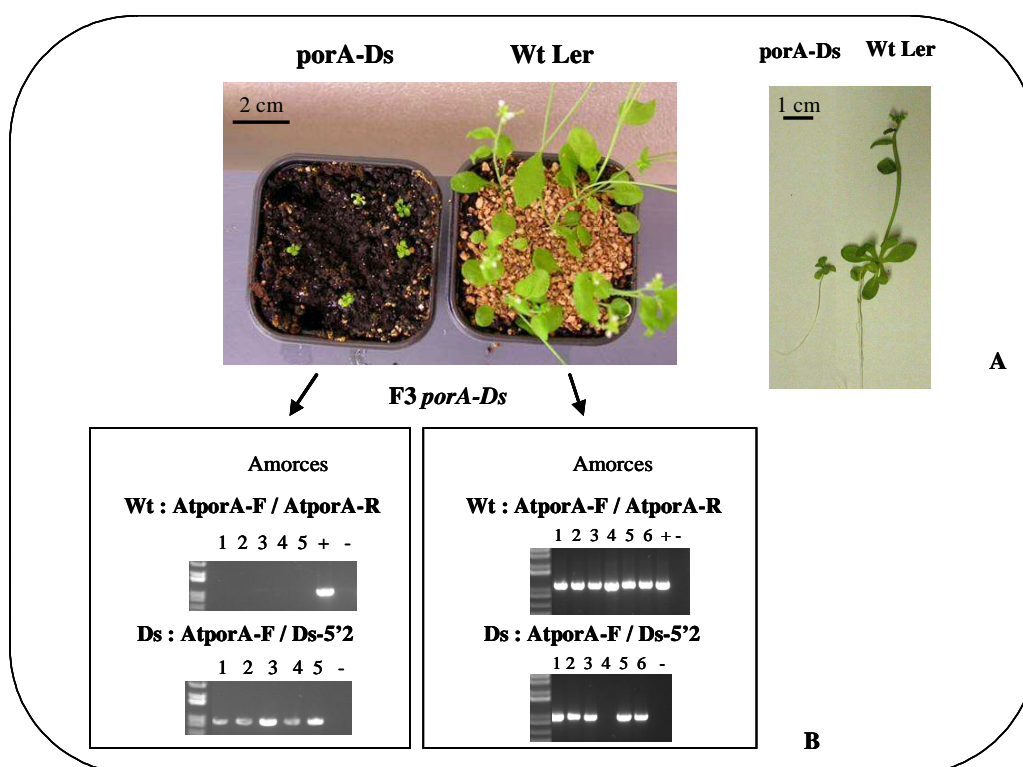


Figure 36 : Caractérisation phénotypique et génotypique des individus de la population F3 *porA-Ds*.

A. Phénotype de la population F3 *porA-Ds*. Comparaison de cinq individus nains à côté de six individus de phénotype « sauvage » (Wt Ler). **B.** Génotypage de la population F3 *porA-Ds*. Panneau de gauche : les individus au phénotype « nain » sont homozygotes pour l'insertion. Panneau de droite : les individus au phénotype « sauvage » sont hétérozygotes ou sauvages pour l'insertion.

Les plantes homozygotes *porA-Ds* présentent un développement fortement réduit tant au niveau végétatif que floral, avec une fertilité pratiquement nulle (en moyenne 2 graines/plante dans des conditions optimales - voir § 2.2 a du Chapitre III) quelle que soit la photopériode. Leur maintien en vie ainsi que la mise à fleur ne sont possibles que sur milieu MS supplémenté d'1% en saccharose, avec un temps de génération 1,5 fois supérieur au sauvage. Un repiquage dans le premier mois de croissance optimise la production de graines. Une *nursery* d'une cinquantaine d'individus homozygotes nains a été maintenue en permanence sur milieu MS afin de constituer un stock de graines homozygotes permettant la caractérisation phénotypique du mutant.

c. Test de résistance à la kanamycine

Afin de déterminer si le phénotype observé est lié à la présence de l'insertion dans le gène *PORA*, des graines de la génération F4 issues d'individus différents ont été semées sur milieu MS en présence de kanamycine. Une ségrégation de type 3 : 1 ($\frac{3}{4}$ de résistants : $\frac{1}{4}$ de sensibles) a été constatée dans toutes les familles, ce qui suggère la présence d'un transgène unique. Ces observations ont également été faites sur les populations F3 issues d'un premier puis d'un second rétrocroisement (BC1 et BC2) (Figure 37-A).

Dans le cas d'une ségrégation indépendante du phénotype nain et vert pâle et de la résistance à la kanamycine (noté Kan^R pour les plantes résistantes et Kan^S pour les plantes sensibles), on attend une répartition de type 3 : 9 : 4 ([Kan^R, nain] : [Kan^R, Wt] : [Kan^S]). Cette ségrégation sera par contre de type 1 : 2 : 1 dans le cas d'une coségrégation. L'analyse statistique des résultats à l'aide d'un test du Khi2 permet de rejeter l'hypothèse d'une ségrégation indépendante (de type 3 : 9 : 4) avec une probabilité d'erreur de $1,23 \times 10^{-13}$. Par contre, l'hypothèse d'une coségrégation (1 : 2 : 1) ne peut pas être rejetée (probabilité de rejet par erreur de 0,9). Cette dernière est donc retenue.

Le phénotype nain est donc associé à la présence à l'état homozygote du marqueur dominant Kan^R.

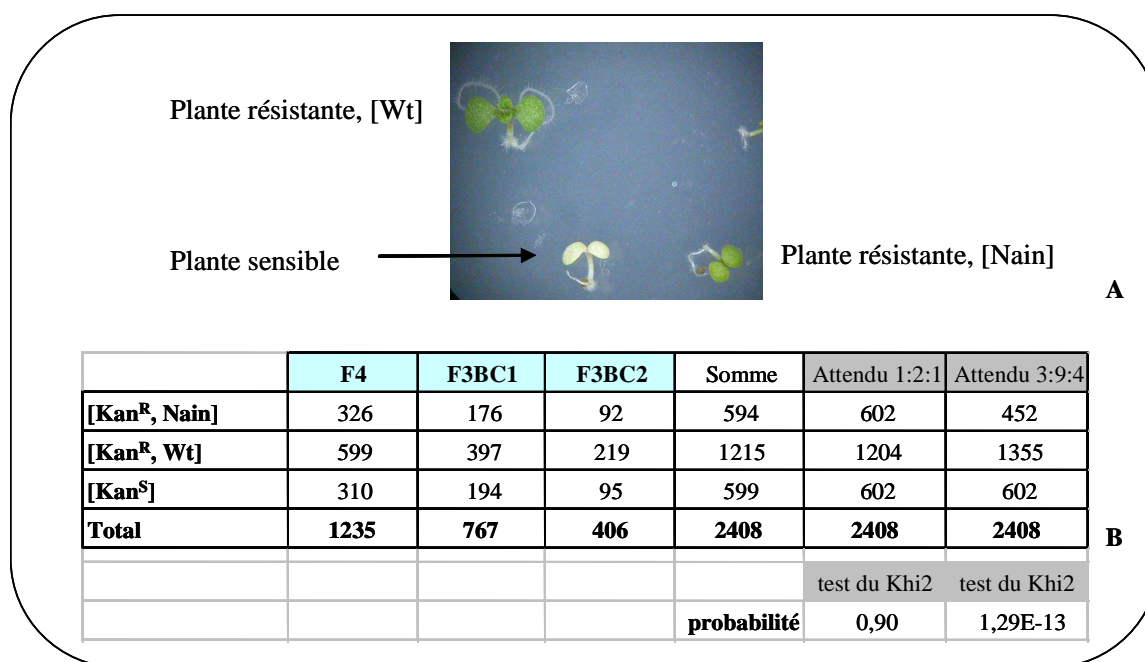


Figure 37 : Test de résistance à la kanamycine sur la lignée *porA-Ds*.

A. Phénotype des plantules ayant germé sur kanamycine. **B.** Effectifs d'individus de chaque catégorie sur trois types de populations (F4, F3BC1 et F3BC2). Plusieurs familles ont été testées pour chacune d'entre elles et cumulées.

Un semis sur terre des populations F4, F3BC1 et F3BC2 a été effectué en parallèle. Ces trois populations présentent une ségrégation de plantes naines et vert pâle, et de plantes de stature et de couleur normales. Les résultats de génotypage (Figure 38) indiquent une ségrégation de type 1 : 2 : 1, à savoir $\frac{1}{4}$ de plantes *porA-Ds* (+/+), $\frac{1}{2}$ de *porA-Ds* (+/-) et $\frac{1}{4}$ de *porA-Ds* (-/-) pour l'insertion. Toutes les plantes naines et vert pâle sont *porA-Ds* (-/-). Par conséquent, nous considérons que le phénotype nain et la présence de l'insertion à l'état homozygote coségrégent.

Les analyses de coségrégations réalisées sur la lignée *porA-Ds* nous permettent de conclure que le phénotype nain est associé à la résistance à la kanamycine ainsi qu'à la présence de l'insertion Ds à l'état homozygote dans le gène *PORA*, même après deux rétrocroisements.

		F4	F3BC1	F3BC2	Somme	Attendu 1:2:1
[Wt]	<i>porA-Ds</i> (+/+)	123	43	33	199	201
	<i>porA-Ds</i> (+/-)	225	97	72	394	402
[nain]	<i>porA-Ds</i> (-/-)	132	51	27	210	201
	Total	480	191	132	803	803
						test Khi2
					probabilité	0,75

Figure 38 : Effectifs d'individus de chaque génotype sur les populations des générations F4, F3BC1 et F3BC2. Test du Khi2 pour une ségrégation 1 : 2 : 1 avec une probabilité associée de 0,75.

Cependant, le phénotype nain observé est relativement étonnant compte-tenu de la fonction connue de *PORA* et de son appartenance à une famille multigénique (voit Chapitre III et Discussion). Il est possible qu'une deuxième insertion génétiquement liée à l'insertion dans *PORA* puisse être responsable du phénotype nain et vert pâle observé. Le nombre important d'individus génotypés nous a permis de tester cette hypothèse. Une distance génétique supérieure ou égale à 1 cM, correspondant à un taux de recombinaison de un pour cent, a servi d'hypothèse de base. Pour 803 individus ayant été génotypés, nous attendons donc 8 recombinants. Cependant aucun recombinant n'a été détecté par PCR. Ce qui indique, dans le cas de la présence d'une deuxième insertion responsable du phénotype nain, que celle-ci est génétiquement liée à l'insertion dans *PORA*, à une distance inférieure à 1 cM.

d. Détermination du nombre d'insertions par Southern-blot

Le nombre d'insertions du transposon dans le génome de la lignée mutante a été déterminé par Southern-blot. Deux enzymes de restriction ont été employées pour digérer l'ADN génomique : *SacI* et *PvuI*. La sonde utilisée pour déterminer le nombre d'insertion correspond à la séquence codante de *NPTII* (résistance à la kanamycine) (Figure 39).

Le profil de Southern-blot montre deux, voire trois fragments marqués quelle que soit l'enzyme utilisée. La taille de l'un de ces fragments correspond à celle attendue pour l'insertion du transposon dans le gène *PORA* (indiqué par une étoile * dans la Figure 39-C). Les autres fragments indiquent la présence d'au moins une autre insertion supplémentaire dans le génome de la lignée *porA-Ds*.

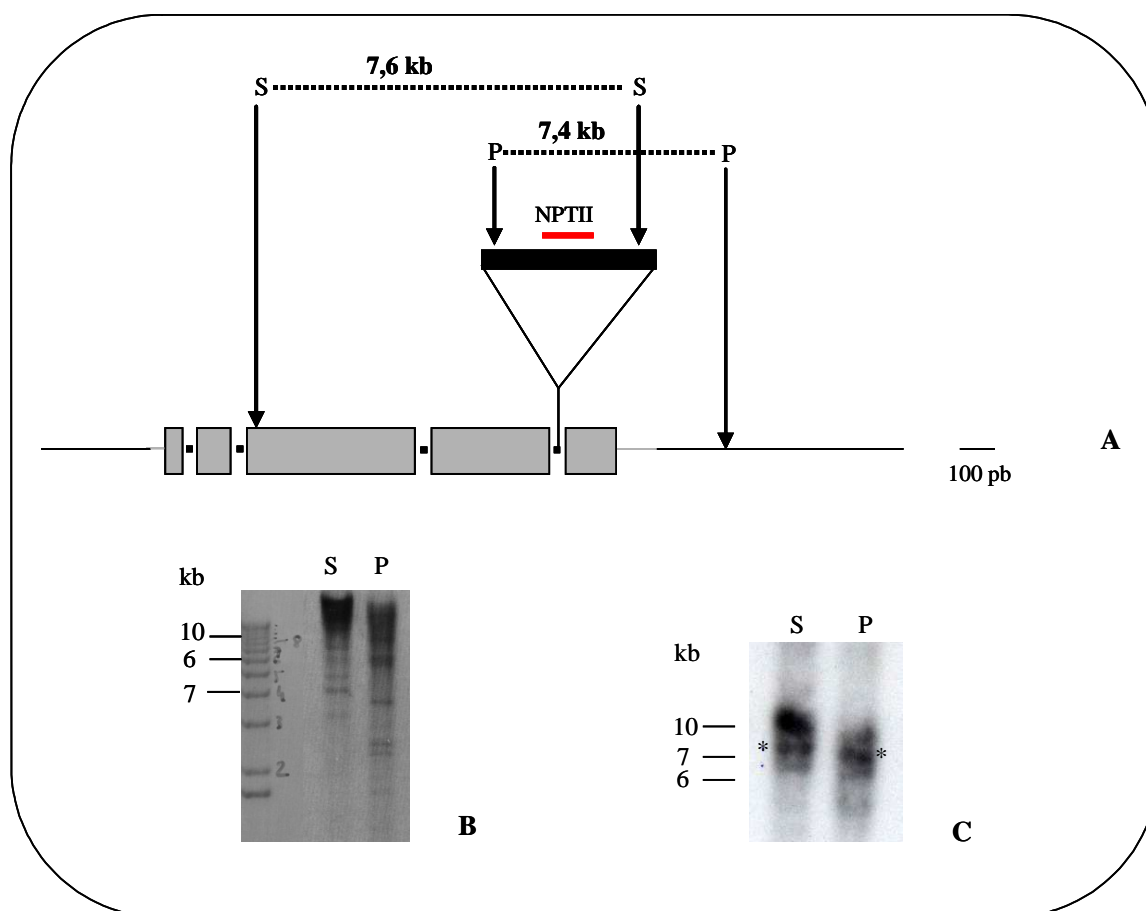


Figure 39 : Détermination du nombre d'insertion de transposon Ds par Southern-blot sur la population F3BC1 de la lignée *porA-Ds*.

A. Carte de restriction théorique. Deux enzymes ont été employées : [S] = *SacI* ; [P] = *PvuI*. NPTII : sonde utilisée. La taille attendue (en kb) des fragments d'ADN génomique reconnus par la sonde NPTII est mentionnée. L'insertion de T-DNA n'est pas à l'échelle. B. Profil de digestion visualisé sous UV après coloration du gel au BET. C. Autoradiographie du Southern-blot après hybridation avec la sonde NPTII radiomarquée (voir Matériel et Méthodes). * : fragment de taille attendue.

2.2 Analyse d'expression de la protéine PORA chez la lignée *porA-Ds*

A défaut de disposer d'assez de matériel végétal pour une extraction d'ARN, les quelques graines issues de la *nursery* nous ont permis de réaliser un Western-blot sur des plantules étiolées de 5 jours, à l'aide d'un anticorps anti-PORA d'orge (Figure 40).

Chez le sauvage (Landsberg [Ler]), deux polypeptides de masses moléculaires attendues pour les protéines PORA et PORB (37 et 36 kDa respectivement) sont détectés par l'anticorps anti-PORA d'orge (Figure 40-B). Chez les individus *porA-Ds*, le polypeptide correspondant à PORA est absent. Seul le polypeptide correspondant à PORB (36 kDa) est détecté, en plus

faible quantité que chez le sauvage. Cette diminution n'est pas due à une inégalité de charge comme le montre la coloration de la membrane au Rouge Ponceau (Figure 40-A). La lignée *porA-Ds* est donc porteuse d'un allèle *PORA* nul.

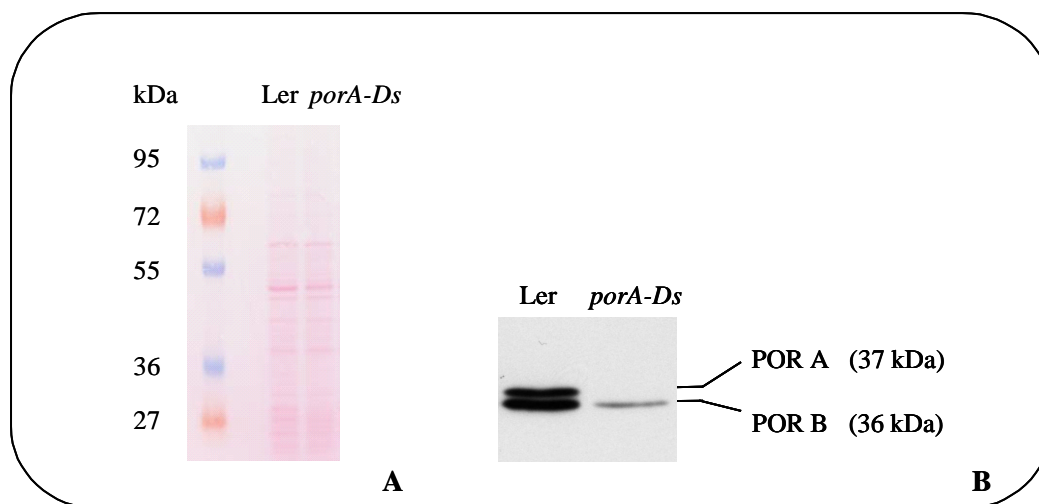


Figure 40 : Immunodétection par Western-blot des protéines POR chez la lignée *porA-Ds*.
A. Coloration au Rouge Ponceau de la membrane après transfert. B. Immunodétection par un anticorps anti-PORA d'orge. 10 μ g de protéines ont été extraites de 5 à 10 plantules étioilées de 5 jours.

La lignée *porA-Ds* est une lignée nulle qui présente un phénotype nain et vert pâle. La lignée comporte au moins une autre insertion supplémentaire. On ignore à ce stade de la caractérisation si ce phénotype est causé par l'insertion du transposon dans le gène *PORA* ou par l'une des insertions supplémentaires. En effet, les résultats de ségrégation ne permettent pas d'exclure que l'une de ces insertions soit génétiquement liée à celle située dans *PORA*, et soit responsable du phénotype nain observé. La complémentation de la lignée par un vecteur exprimant *PORA* sous contrôle d'un promoteur 35S devrait pouvoir nous aider à répondre à cette question (voir § 2.2b du Chapitre III).

3. Obtention d'un double mutant *porA-Ds porB-Salk*

3.1 Description du mutant *porB-Salk* (Salk_043887)

La lignée mutante *porB-Salk*, issue du Salk-Institute (La Jolla, USA), a été construite dans un fond génétique Columbia. Elle présente une insertion de T-DNA dans le deuxième exon à 636 pb du codon initiateur (ATG) comme le montre la Figure 41. Disponible au laboratoire à

mon arrivée, deux rétrocroisements avaient été réalisés et la position de l'insertion et son caractère unique avaient été vérifiés (Reinbothe *et al.*, 2006b).

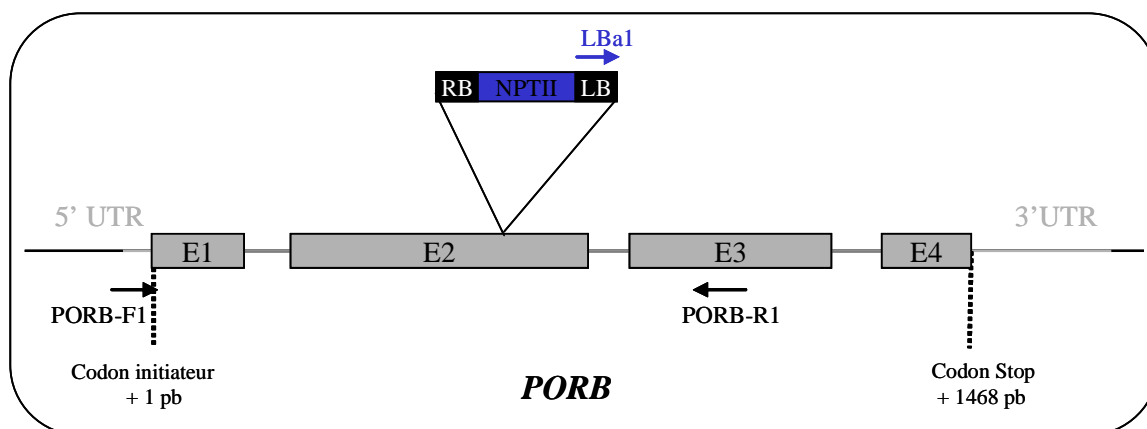


Figure 41 : Représentation du gène *PORB* (At4g27440) et l'insertion du T-DNA chez le mutant *porB-Salk*.

Les quatre exons du gène sont représentés par les rectangles grisés (E1 à E4). Le T-DNA est délimité par ses bordures gauche [LB : *Left Border*] et droite [RB : *Right Border*] et contient un gène conférant la résistance à la kanamycine [*NPTII*, code pour la Néomycine Phosphoryl Transférase II]. Les couples d'amorces utilisés pour le génotypage, symbolisés sur ce schéma par des flèches, sont *porB-F1* / *porB-R1* (allèle sauvage) et *porB-R1* / *LBA1* (allèle mutant).

Les graines qui m'ont été confiées provenaient de la descendance d'un individu homozygote pour l'insertion. La présence du T-DNA à l'état homozygote a été vérifiée par PCR en utilisant deux combinaisons d'amorces : *porB-F1* / *porB-R1* pour l'allèle sauvage, et *porB-R1* / *LBA1* pour l'allèle mutant (Figure 41). L'ADN génomique a été extrait à partir d'un pool d'une dizaine plantules (Figure 42-A). Les résultats du génotypage (Figure 42-B) confirment que la population dont nous disposons est homozygote pour l'insertion. Cette insertion, porteuse du gène *NPTII*, confère une résistance à la kanamycine à l'ensemble de la population (Figure 43). Aucune caractéristique phénotypique particulière n'est relevée lors du développement des plantes sur milieu gélosé ou sur terre, et ce quelles que soient les conditions lumineuses (jour long ou jour continu) (Figure 42-A). Le mutant *porB-Salk* ne présente donc pas de phénotype développemental ni chlorophyllien, tout comme les autres mutants *porB* publiés (Frick *et al.*, 2003; Masuda *et al.*, 2003).

L'insertion de T-DNA se situant dans le deuxième exon du gène *PORB*, nous nous attendions à ce que la protéine *PORB* ne soit pas exprimée. Un Western-blot a donc été réalisé pour vérifier cette hypothèse (Figure 44). Les protéines ont été extraites de plantes cultivées à la lumière.

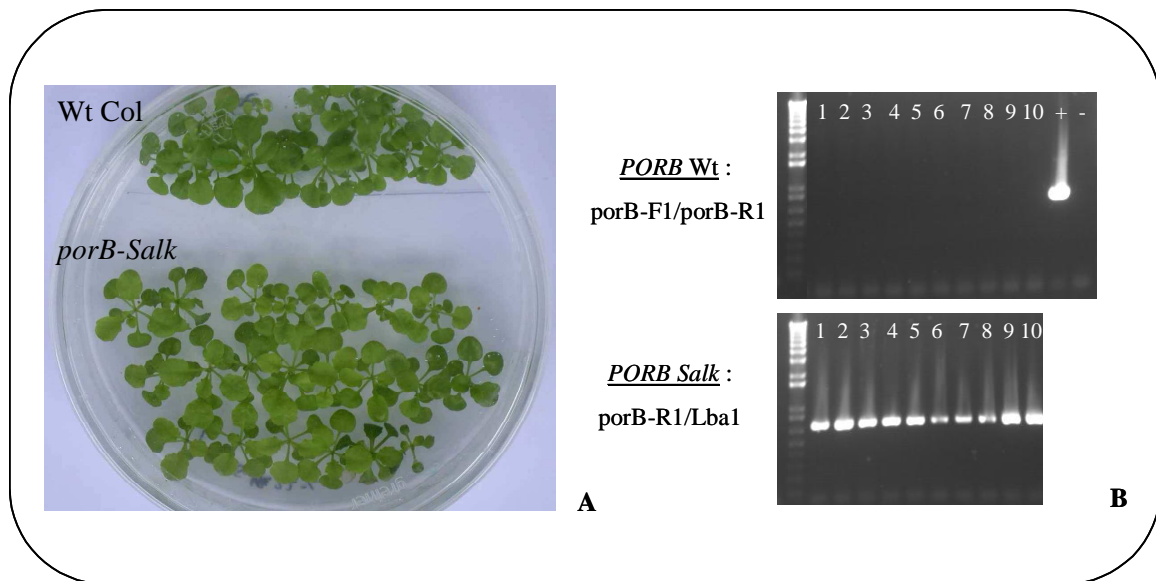


Figure 42 : Caractérisation génotypique et phénotypique de la lignée *porB-Salk*.

A. Phénotype du mutant *porB-Salk*. Développement d'individus sauvages d'écotype Columbia et d'individus homozygotes *porB-Salk* sur milieu gélosé, en condition jour long. **B.** Génotypage par PCR sur dix plantes *porB-Salk*. [+] Témoin positif de l'allèle sauvage = ADN génomique Wt Col. [-] eau : témoin négatif.

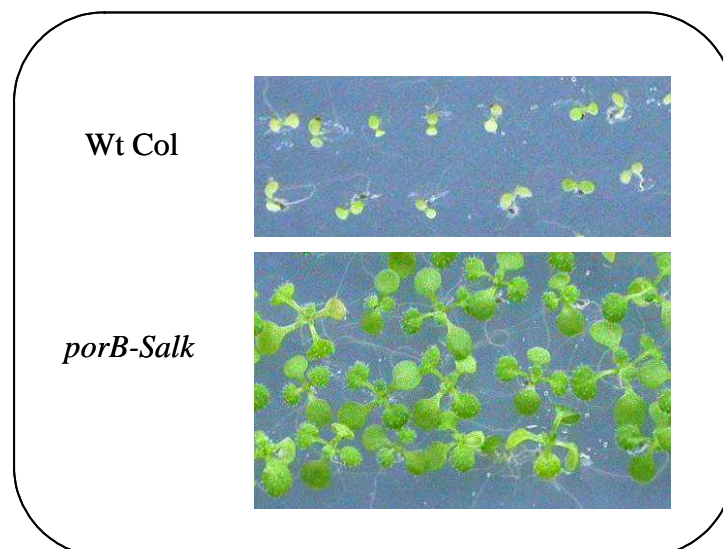


Figure 43 : Test de résistance à la kanamycine (50µg/mL) du mutant *porB-Salk*. Plantules de 2 semaines environ.

Dans les extraits protéiques des plantes sauvages Columbia, trois polypeptides de masses moléculaires attendues pour les protéines PORA, PORB et PORC (37, 36 et 38 kDa respectivement) sont détectés par l'anticorps anti-PORA d'orge (Figure 44-A). Dans les extraits protéiques des plantes mutantes *porB-Salk*, seuls les polypeptides correspondants à PORA et PORC (37 et 38 kDa) sont détectés. Le polypeptide correspondant à PORB en est absent. La lignée *porB-Salk* est donc porteuse d'un allèle nul.

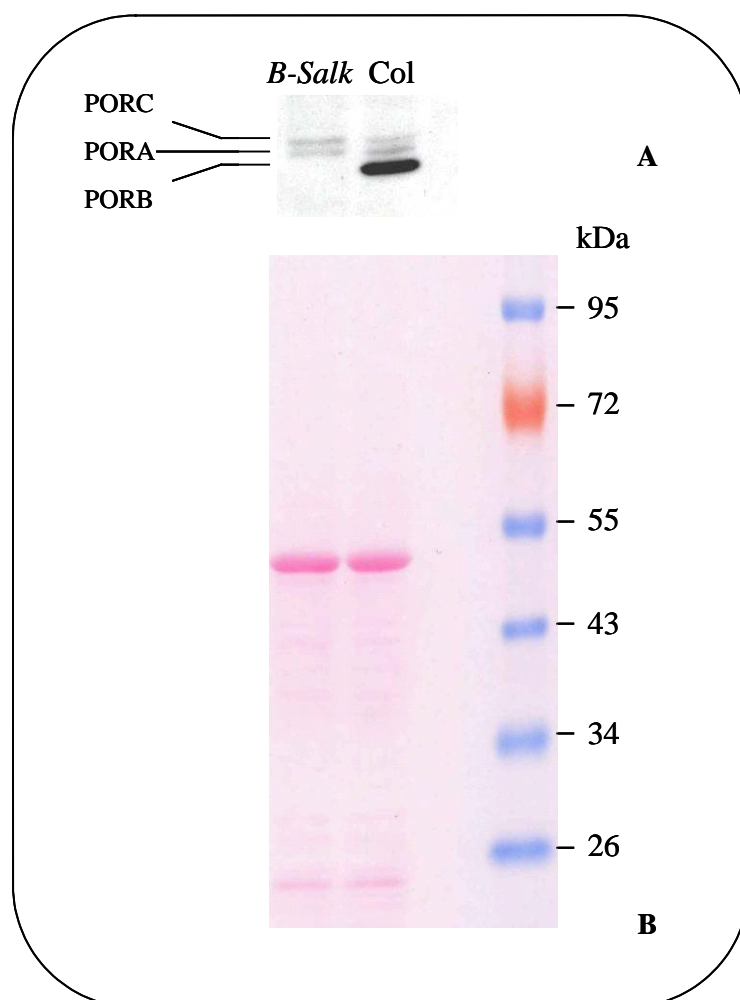


Figure 44 : Immunodétection par Western-blot des polypeptides POR chez le mutant *porB-Salk*.

20 μ g de protéines totales, extraites d'un pool de plantes âgées de 15 jours cultivées à la lumière continue, ont été déposées sur un gel gradient 8%-16%. **A.** Immunodétection des polypeptides POR par un anticorps anti-PORA d'orge. **B.** Coloration au Rouge Ponceau de la membrane après transfert.

La lignée *porB-Salk* correspond donc à un mutant nul qui ne présente aucun phénotype développemental ni chlorophyllien.

3.2 Création d'un double mutant *porA porB*

Comme nous l'avons vu au cours du premier chapitre, les profils d'expression des gènes *PORA*, *PORB* et *PORC* laissent supposer une certaine redondance fonctionnelle entre les isoformes correspondants. En particulier entre *PORA* et *PORB*, lors d'une germination à l'obscurité, et entre *PORB* et *PORC* lors du développement de la plante à la lumière.

Afin de définir les limites de la redondance entre ces différents isoformes, nous avons créé un double mutant *porA porB* à partir des lignées *porA-Ds* et *porB-Salk*.

Le double mutant *porA porB* a été obtenu par le croisement entre une plante *porA-Ds* hétérozygote (*ADs (+/-)*) de la génération F4 issue d'un premier rétrocroisement (F4BC1) et une plante *porB-Salk* homozygote (*BSalk (-/-)*). La descendance de ce croisement (F1) doit être composée pour moitié d'individus (*ADs (+/+)*, *BSalk (+/-)*) et d'individus (*ADs (+/-)*, *BSalk (+/-)*).

Deux semaines après semis sur terre des graines de la F1, les plantes ont été génotypées par PCR à l'aide des combinaisons d'amorces suivantes (Figure 26 et Figure 41) : *AtporA-F / At-porA-R* pour l'allèle *PORA* sauvage, et *AtporA-F / Ds5'2* pour l'allèle *porA* mutant qui porte le transposon *Ds* d'une part et *porB-F / porB-R* pour l'allèle *PORB* sauvage, et *porB-R / LBa1* pour l'allèle mutant *porB* qui porte le T-DNA *Salk* d'autre part.

Comme attendu, des individus (*ADs (+/+)*, *BSalk (+/-)*) et (*ADs (+/-)*, *BSalk (+/-)*) ont été retrouvés dans la proportion 1 : 1 en F1 (données non montrées). Les plantes (*ADs (+/-)*, *BSalk (+/-)*) ont été sélectionnées pour donner la génération F2.

Dans le but de sélectionner des individus (*ADs (-/-)*, *BSalk (-/-)*), une trentaine de graines d'une plante F1 (*ADs (+/-)*, *BSalk (+/-)*) ont été semées en terre. Une proportion de 1/16 de plantes (*ADs (-/-)*, *BSalk (-/-)*) est attendue ainsi que 2/16 d'individus (*ADs (+/-)*, *BSalk (-/-)*). Le génotypage de la trentaine de plantes ne nous a pas permis d'identifier de double homozygote. Deux individus F2 (*ADs (+/-)*, *BSalk (-/-)*) ont été sélectionnés pour donner la génération F3, où une proportion d'1/4 d'individus (*ADs (-/-)*, *BSalk (-/-)*) est attendue.

Deux éventualités sont *a priori* envisageables quant au développement des individus F2 doublement homozygotes pour *PORA* et *PORB*. Soit le double mutant est viable et comme pour la descendance de la lignée *porA-Ds*, on s'attend à ce que les individus portant l'insertion *Ds* à l'état homozygote développent un phénotype nain. Dans ce cas une

ségrégation de type 1 : 2 : 1 est attendue avec 1/4 (*ADs* (+/+), *BSalk* (-/-)) ; 1/2 (*ADs* (+/-), *BSalk* (-/-)) ; 1/4 (*ADs* (-/-), *BSalk* (-/-)). Soit le double mutant n'est pas capable de germer, ou très difficilement au point de conduire à la mort de la plantule. Dans ce cas nous attendions une ségrégation de type 1 : 2 par génotypage avec (1/3 (*ADs* (+/+), *BSalk* (-/-)) pour 2/3 (*ADs* (+/-), *BSalk* (-/-)).

Les descendances F3 des deux plantes F2 *ADs* (+/-) *BSalk* (-/-) ont été semées sur milieu gélosé en condition de jour continu et en jour long. Toutes les graines semées ont germé dans ces deux régimes lumineux et nous avons constaté au bout de dix jours qu'un quart des individus étaient nains et vert pâle (Figure 45-A).

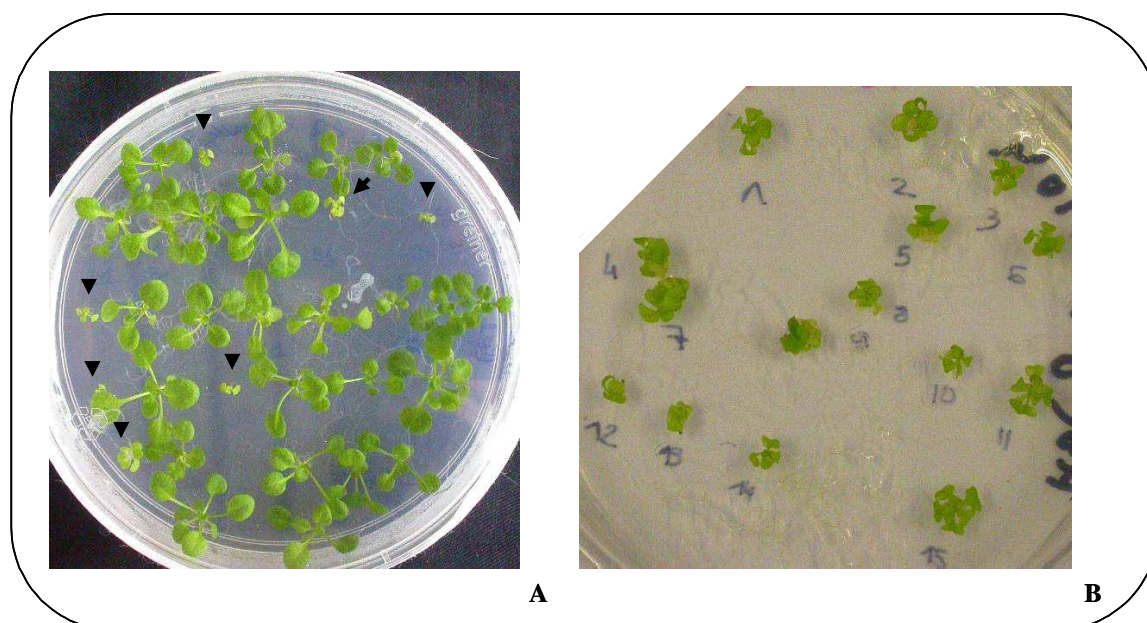


Figure 45 : Ségrégation d'une population F2 issue d'une plante F1 *ADs* (+/-) *BSalk* (-/-).

A. Plantules de 10 jours présentant soit un phénotype normal soit un phénotype nain et vert pâle (indiquées par des pointes de flèches). **B.** Plantules de 1 mois environ (après repiquage) présentant un phénotype nain et vert pâle comparable à celui de la lignée *porA-Ds* (-/-) (voir Figure 36 du Chapitre III § 2.2 a).

Les individus de stature normale ont été rapidement transférés en terre tandis que les individus nains ont été repiqués et regroupés sur un nouveau milieu dans le mois suivant le semis (Figure 45-B). L'ensemble des plantes a été génotypé par PCR en utilisant les combinaisons d'amorces précédemment citées. Une ségrégation de type 1 : 2 : 1 est attendue pour l'allèle *PORA*, l'allèle *PORB* devant être homozygote pour l'insertion chez toutes les plantes. Les résultats de cette analyse par PCR se trouvent Figure 46.

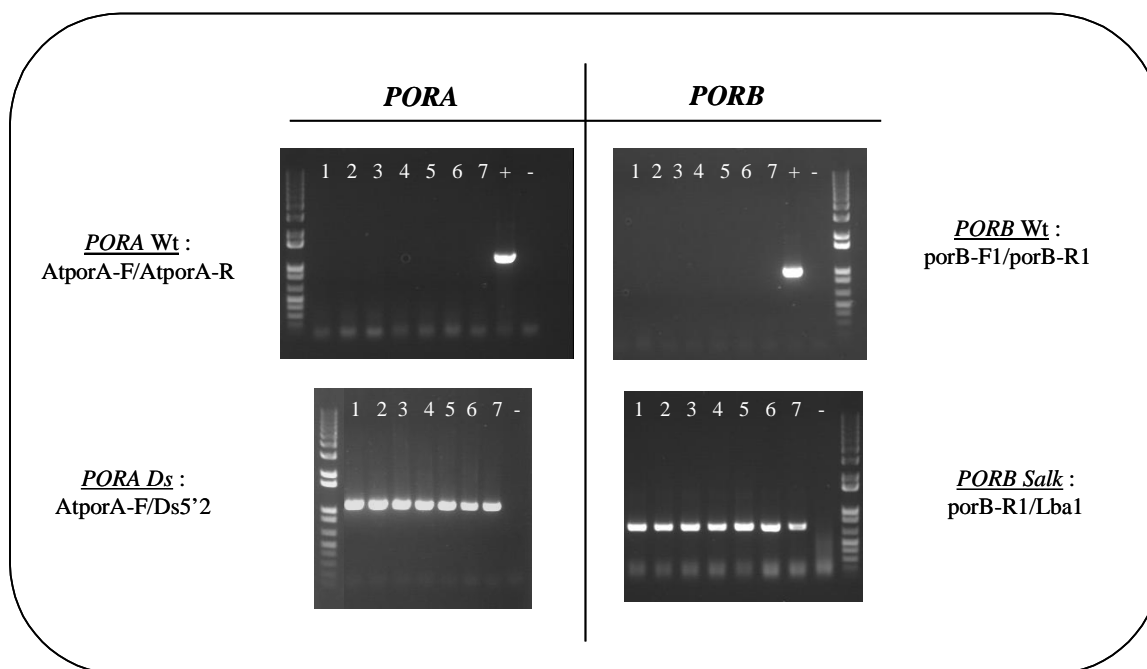


Figure 46 : Détermination du génotype d'individus F2 nains et vert pâle provenant d'une plante mère *ADs* (+/-) *BSalk* (-/-)

Sept plantes naines et vert pâle ont été génotypées pour les gènes *PORA* (panneau de gauche) et *PORB* (panneau de droite) avec les couples d'amorces indiqués pour les copies sauvages (en haut) et mutées (en bas). [+] Témoin positif de l'allèle sauvage = ADN génomique Wt Col. [-] Témoin négatif : eau.

Tous les individus nains se sont avérés être des double homozygotes pour les insertions *porA-Ds* et *porB-Salk* (Figure 46) et la ségrégation de type 1 : 2 : 1 attendue dans ce cas a été observée (données non montrées).

Le double mutant *porA porB* est donc capable de germer et de se développer. Porteur du phénotype nain et de la coloration vert pâle caractéristiques de la lignée *porA-Ds*, le double mutant ne semble pas à première vue en être différent.

Le phénotype nain, issu de l'allèle *porA-Ds*, restreint malheureusement les possibilités d'études compte tenu du faible nombre de graines produites. Dans l'objectif d'en obtenir quelques unes, une nursery d'une cinquantaine de plantes a été mise en place pour le double mutant *porA porB*, tout comme pour la lignée *porA-Ds*.

CHAPITRE II

Caractérisation de mutants *por*
d'*Arabidopsis thaliana*

CHAPITRE III

Etude fonctionnelle de la protéine PORA in planta

L'étude fonctionnelle de la protéine PORA *in planta* s'est principalement basée sur l'analyse des mutants *porA* dont nous disposons, à savoir la lignée nulle *porA-Ds*, qui présente un phénotype nain et une coloration vert-pâle, le mutant surexpressueur *porA-Salk*, et le double mutant *porA porB*. Plusieurs approches ont été utilisées dans des conditions développementales diverses (skotomorphogenèse, dé-étiolement et photomorphogenèse) afin d'étudier différents aspects des fonctions de la protéine PORA *in vivo*.

1. Rôle de la protéine PORA lors de la skotomorphogenèse et du dé-étiolement

Il a été précédemment montré que la formation des corps prolamellaires nécessite la présence de protéines POR et de Pchl_a (Dehesh and Ryberg, 1985). Nous avons cherché à savoir si le rôle de PORA dans l'établissement de ces structures était différent ou redondant avec celui de la protéine PORB étant donné que les deux protéines sont détectées en quantités importantes dans les étiooplastes lors d'une germination à l'obscurité.

Afin de réaliser des coupes et des observations en microscopie électronique, des cotylédons étiolés de plantules âgées de 5 jours de la lignée nulle *porA-Ds*, ainsi que du sauvage, ont été dans un premier temps fixés, puis envoyés à l'IPMC de l'INRA de Villenave-d'Ornon où ils ont été inclus, coupés et observés au microscope électronique (Figure 47). L'observation des coupes ultrafines de cotylédons étiolés de plante sauvage montre des étiooplastes contenant des corps prolamellaires de taille normale ainsi que des membranes de prothylacoïdes organisées parallèlement dans le sens de la longueur (Figure 47-A et C). Les étiooplastes des plantes *porA-Ds* montrent une réduction des corps prolamellaires (Figure 47-D), ainsi qu'une organisation concentrique des membranes de prothylacoïdes chez certains des étiooplastes (Figure 47-E). Le nombre d'étiooplastes par cellule chez la lignée *porA-Ds* semble réduit par rapport au sauvage (Figure 47-B).

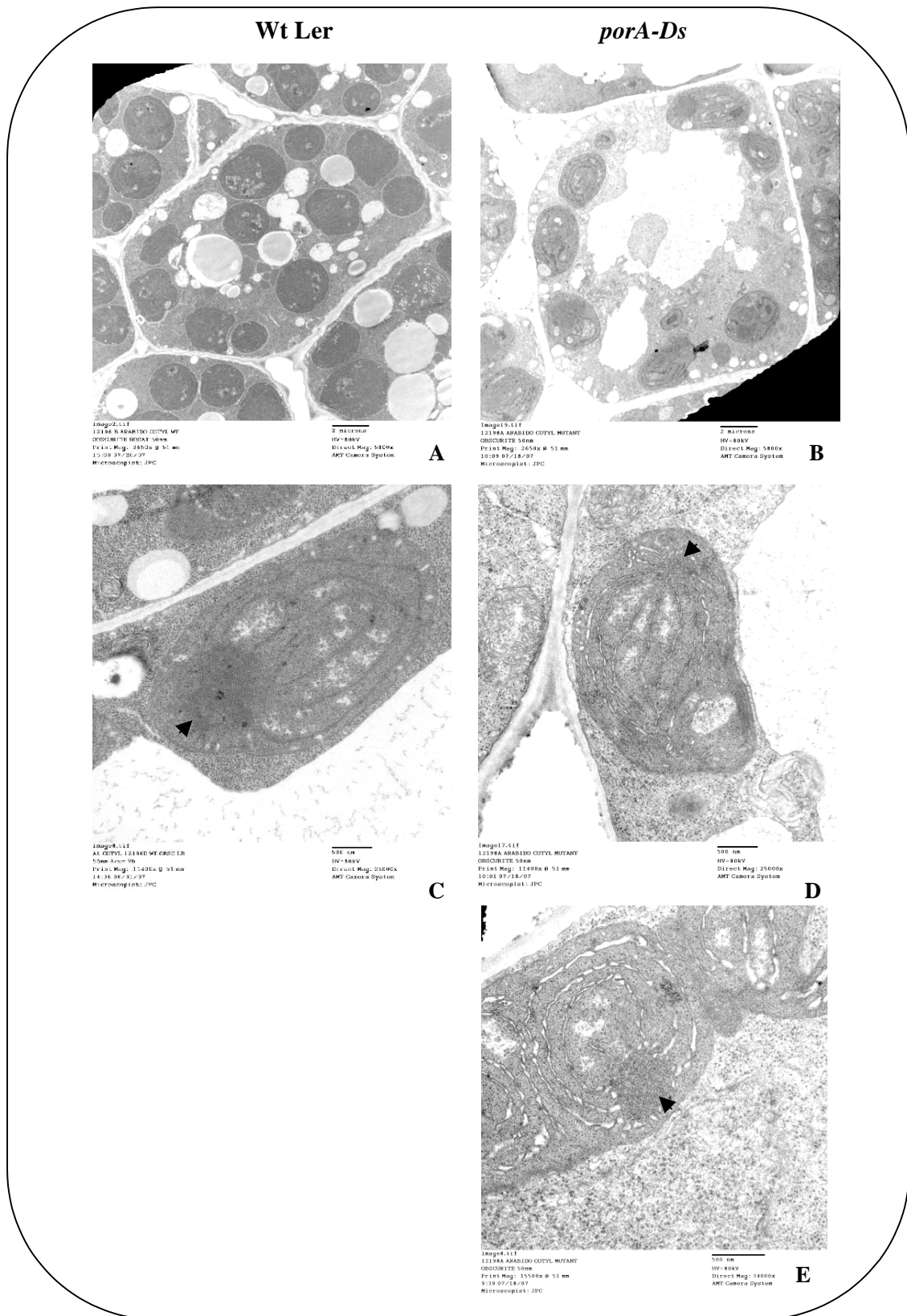


Figure 47 : Ultrastructure d'étioplastes de cotylédons de plantes étioilées de 5 jours du sauvage Landsberg et de la lignée *porA-Ds*.

A et B, vue d'ensemble d'une cellule de cotylédons d'un individu sauvage (A) et d'un individu homozygote de la lignée *porA-Ds* (B) contenant des étioplastes. Barre d'échelle = 2 μ m. C, D et E, ultrastructure des étioplastes de cotylédons de plantule sauvage (C) ou d'un individu *porA-Ds* (D et E). Barre d'échelle = 0,5 μ m. Tête de flèche : corps prolamellaires.

Une réduction des corps prolamellaires ainsi qu'une organisation concentrique des prothylacoïdes ont également été observées chez les mutants *porB* (Frick *et al.*, 2003; Masuda *et al.*, 2003). Ces observations montrent que la présence de l'une des deux isoformes, PORA ou PORB, est suffisante pour la formation de corps prolamellaires. Cependant leur taille se trouve restreinte en cas d'absence de l'une de ces deux protéines.

Deux rôles majeurs sont attribués aux corps prolamellaires. D'une part, un rôle dans la synthèse du pool initial de chlorophylle par l'intermédiaire des complexes ternaires POR-Pchl_a-NADPH qui les constituent, permettant ainsi la mise en place des structures photosynthétiques. D'autre part, un rôle photoprotecteur, en limitant la présence de Pchl_a libre potentiellement photo-oxydable lors de la transition à la lumière. Nous avons voulu savoir si la réduction des corps prolamellaires pouvait affecter l'une ou l'autre de ces fonctions, et par conséquent le développement de la plantule lors de la transition de l'obscurité à la lumière. Pour cela, nous avons réalisé des expériences de dé-étiolement et des tests de photoblanchiment sur les lignées *porA-Ds* et *porB-Salk*.

- **Expérience de dé-étiolement**

Des plantules étioilées de 4 jours des lignées *porA-Ds* et *porB-Salk*, ainsi que des écotypes sauvages correspondants, respectivement Landsberg et Columbia, ont été exposées à une lumière continue d'intensité moyenne ($70 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) pendant 32h. L'évolution du dé-étiolement a été suivie au cours de ces 32h, dont les principales étapes (8h, 16h et 32h d'éclairage) sont présentées en Figure 48.

En sortie d'étiolement, aucune différence développementale n'est constatée entre les écotypes sauvages et mutants. De même, lors de l'exposition à la lumière, le développement des plantules des lignées *porA-Ds* et *porB-Salk* est comparable à celui de l'écotype sauvage correspondant. Il est intéressant de noter que les individus de la lignée *porA-Ds*, qui possèdent un phénotype nain lors d'un développement à la lumière, présentent des cotylédons étioilés de taille équivalente à ceux de l'écotype sauvage Landsberg ainsi qu'un même phénotype étioilé. Le retard de croissance caractéristique de la lignée *porA-Ds* devient détectable lors du dé-étiolement, à partir de 32h d'éclairage.

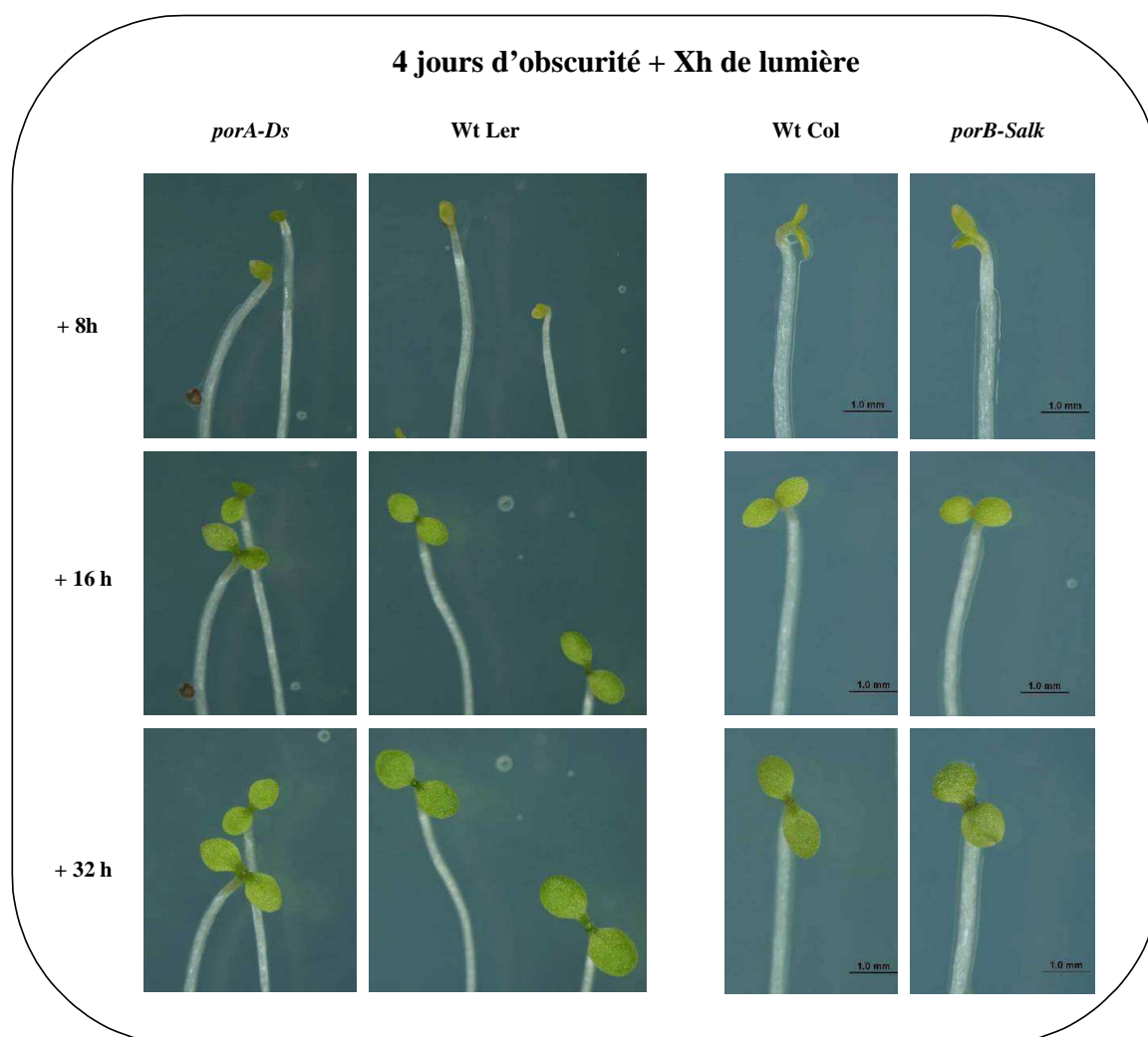


Figure 48 : Dé-étiolement de plantules des lignées *porA-Ds* et *porB-Salk*.

Des plantules étioilées de 4 jours ont été exposées à la lumière continue ($70 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Le dé-étiolement a été suivi sous loupe binoculaire 8h, 16h et 32h après la mise à la lumière. Les écotypes sauvages Landsberg (Wt Ler) et Columbia (Wt Col) correspondant respectivement au fond génétique des lignées *porA-Ds* et *porB-Salk* sont présentés en parallèle.

On constate également un verdissement apparent semblable entre les mutants et l'écotype sauvage correspondant au cours du dé-étiolement. Pour le vérifier, un dosage de chlorophylle a été réalisé au cours du verdissement sur le mutant *porB-Salk*. Des prélèvements ont été effectués après des temps d'exposition à la lumière de 2h, 8h, 16h et 32h.

L'accumulation de chlorophylle lors du dé-étiolement du mutant *porB-Salk* est aussi rapide que celle du sauvage Columbia (Figure 49). La synthèse du pool initial de chlorophylle chez le mutant *porB-Salk* n'est donc pas affectée par la réduction des corps prolamellaires. Cette observation conforte celle qui a été également faite sur une autre lignée d'insertion dans *PORB* (Masuda *et al.*, 2003).

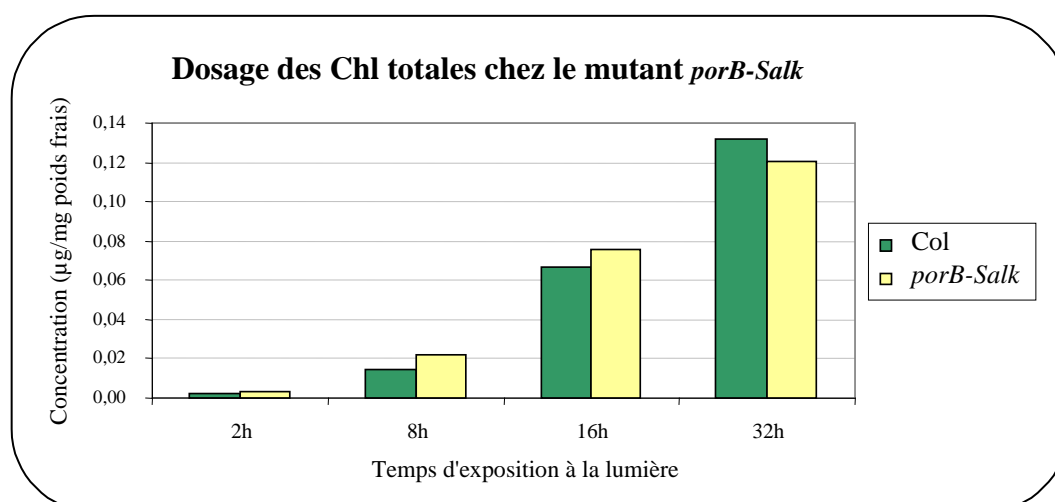


Figure 49 : Dosage de chlorophylle lors du dé-étiolement du mutant *porB-Salk*.

Les pigments ont été extraits à l'acétone 80% à partir d'une dizaine de plantules par prélèvement. Le dosage a été réalisé au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 652 nm. Cette expérience a été réalisée une seule fois.

En ce qui concerne la lignée *porA-Ds*, le peu de graines disponibles ne nous a pas permis de réaliser un dosage de chlorophylle au cours du dé-étiolement. On constate cependant qu'il semble légèrement plus pâle que le sauvage Landsberg mais uniquement après 32h d'exposition à la lumière (moment où le retard de croissance devient apparent), alors que plus tôt sa couleur semble aussi soutenue que celle du sauvage. Le nanisme et la coloration vert-pâle caractéristiques de la lignée *porA-Ds* semblent donc liés à un effet de la lumière postérieur à la conversion du pool de Pchl_a accumulé à l'obscurité.

En résumé, aucune différence entre les individus des lignées mutantes et les individus sauvages lors de la phase de verdissement initial n'est détectée à l'œil nu, ainsi que par dosage de chlorophylle chez le mutant *porB-Salk*, ce qui nous indique que la synthèse du pool initial de chlorophylle chez ces mutants n'est pas affectée. On suppose donc que la déstructuration des corps prolamellaires lors du dé-étiolement suite à l'activité réductrice des protéines POR, ainsi que la mise en place des membranes thylacoïdiennes se déroulent normalement. Reste à savoir si la réduction de taille des corps prolamellaires affecte leur capacités de photoprotection.

- Test de photoblanchiment

La Pchl_{ide} synthétisée à l'obscurité se complexe aux protéines POR et à son cofacteur le NADPH, formant des complexes ternaires constitutifs des corps prolamellaires. Ces derniers participent ainsi à limiter la présence de Pchl_{ide} libre photosensible, en parallèle des systèmes de régulation de la voie de biosynthèse existants (voir § 2.2 de l'Introduction). Lorsque, pour des raisons diverses, la Pchl_{ide} libre photosensible s'accumule, l'exposition brutale à une lumière forte de la plantule étiolée conduit à des dommages photo-oxydatifs allant jusqu'à la mort de la plantule (c'est le cas par exemple chez le mutant *flu* (Meskauskiene *et al.*, 2001)). Ce type d'expérimentation est appelé « test de photoblanchiment ».

Nous avons réalisé ce test chez les lignées *porA-Ds* et *porB-Salk* afin de déterminer si la réduction de taille des corps prolamellaires pouvait conduire à une accumulation de Pchl_{ide} libre et donc à un stress photo-oxydatif ayant un effet visible au niveau de la plantule. Nous avons utilisé comme contrôle positif le mutant *oep16* dont la protéine sauvage correspondante est notamment impliquée dans le système d'import Pchl_{ide}-dépendant de pPORA (voir §4.2b de l'Introduction (Reinbothe *et al.*, 2004c)). L'exposition à la lumière forte de plantules *oep16* étiochées de 5 jours peut conduire à leur photoblanchiment (Pollmann *et al.*, 2007).

Après 48h, les individus sauvages Landsberg et Columbia ont leurs cotylédons ouverts et bien verts, tandis que les plantules du mutant *oep16* ont photoblanchi de manière irréversible (Figure 50-A). En ce qui concerne les lignées *porA-Ds* et *porB-Salk*, toutes deux présentent des cotylédons ouverts et verts. Le retard de croissance des cotylédons préalablement observé chez la lignée *porA-Ds* est à nouveau constaté mais il est ici plus marqué du fait que nous soyons à 48h d'exposition à la lumière. D'autre part, la présence d'une zone de nécrose à l'extrémité d'un des deux cotylédons chez la moitié des plantules de la lignée *porA-Ds* (tête de flèche Figure 50-A) nous indique que les cotylédons ont traversé un stress photo-oxydatif transitoire et partiellement réversible. Ce stress n'affecte pas le développement ultérieur de la plantule (Figure 50-B).

Cependant, nous devons rappeler que la lignée *porA-Ds* est affectée dans l'ensemble de son développement, le stress observé peut donc être un effet secondaire des modifications développementales inhérentes à cette lignée. Dans tous les cas, le phénotype des individus homozygotes de la lignée *porA-Ds* ne correspond pas à celui du mutant *oep16*. Cette protéine, impliquée dans l'import de pPORA *via* le PTC, doit posséder d'autres fonctions qui expliqueraient le stress photo-oxydatif létal observé.

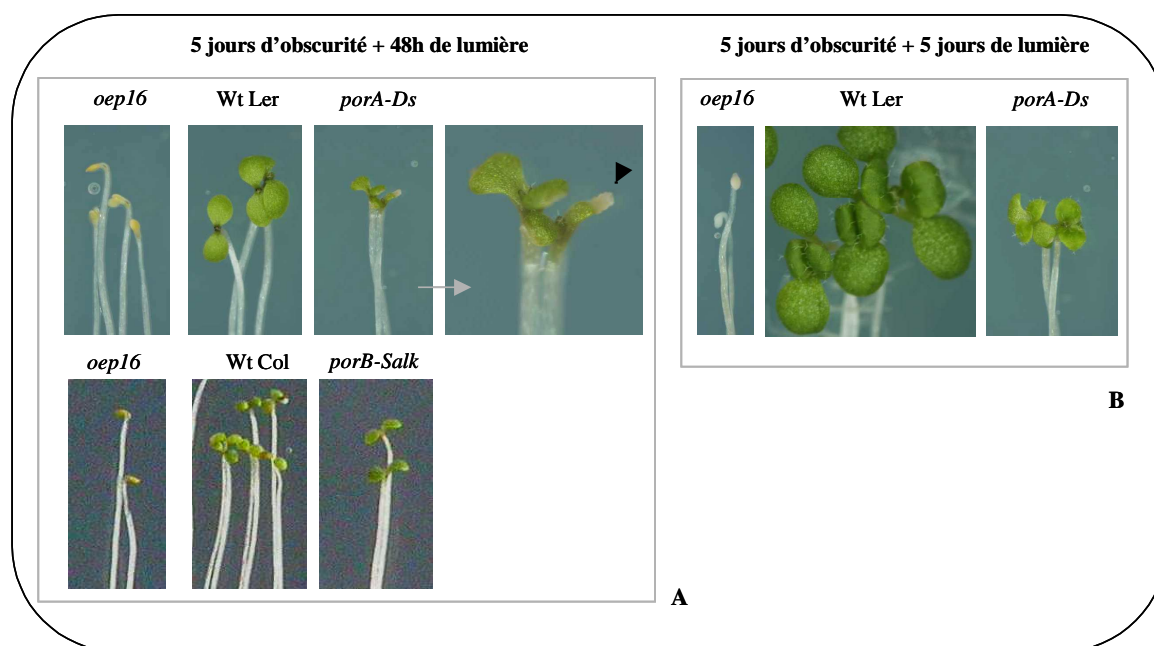


Figure 50 : Test de photoblanchiment portant sur les lignées *porA-Ds* et *porB-Salk*.

Contrôle négatif : écotypes sauvages (Wt Ler et Wt Col). Contrôle positif : mutant *oep16*. **A.** Photographies prises après 48h d'éclairement continu ($120 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). **B.** Photographies d'individus homozygotes de la lignée *porA-Ds* prises après 5 jours d'éclairement continu ($120 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). Ce test a été réalisé deux fois. La tête de flèche noire indique la zone de nécrose observée chez le mutant *porA-Ds*.

L'ensemble de ces observations nous montrent que chez les simples mutants *porA-Ds* et *porB-salk* la réduction des corps prolamellaire n'a pas d'effet majeur sur leur rôle photoprotecteur : les protéines PORA et PORB jouent donc un rôle redondant à la fois dans la formation des corps prolamellaires et dans la protection contre le stress lumineux. Mais ces observations nous apportent également une autre information. Chez les lignées *porA-Ds* et *porB-Salk*, la quantité de protéines POR totale se trouve diminuée. On s'attendrait donc soit à un excès de Pchl_a libre, soit à une diminution de la quantité totale de Pchl_a dans l'étioplaste suite à une régulation spécifique. L'analyse spectroscopique de Pchl_a de la lignée *porA-Ds* est programmée pour vérifier cette hypothèse. Dans le cas d'un excès de Pchl_a libre, un stress photo-oxydatif devrait être observé. Une telle situation ne semble pas se produire chez le mutant *porB-Salk* puisque les plantules étioilées se développent normalement suite à l'illumination. Les individus homozygotes de la lignées *porA-Ds* ne possèdent non seulement pas de protéine PORA mais également moins de protéine PORB, présentent quant à eux un léger stress photo-oxydatif. Il se pourrait donc que la quantité de Pchl_a libre soit régulée en fonction de la quantité totale de protéines POR, mais qu'en-

dessous d'un seuil minimal de protéine POR présente, cette régulation ne soit plus possible ce qui aboutit à la présence de Pchl_a libre.

On peut alors se demander ce qu'il se passe dans le cas d'une absence totale de protéines POR. Pour essayer de répondre à la question nous avons utilisé le double mutant *porA porB*. Les graines double homozygote *porA* (-/-) *porB* (-/-) ségrègent dans la descendance F3 d'une plante mère F2 *porA* (+/-) *porB* (-/-), à raison d'un quart de la population. Soixante-dix graines F3 ont été semées sur milieu gélosé en présence de l'écotype sauvage Columbia et du mutant *oep16*, et soumises à un test de photoblanchiment. Quarante-huit heures après le début de l'exposition à la lumière, les contrôles positif (*oep16*) et négatif (Wt Col) nous montrent que le test de photoblanchiment a fonctionné (Figure 51-A). Parmi la population *porB* (-/-) qui ségrège pour l'allèle *porA*, on observe des plantules qui ont photoblanchi irréversiblement. On en dénombre 17, ce qui représente 24% de la population totale étudiée (Figure 51-B). Ce résultat nous laisse penser que ce quart de plantules qui photoblanchissent pourraient être des doubles homozygotes *porA porB*. Pour s'en assurer, les individus qui ont verdi et par la suite se sont développés ont été prélevés pour être génotypés par PCR. Une ségrégation de type 1 : 2 pour l'allèle *porA-Ds* a été constatée, avec un tiers d'individus sauvages pour l'insertion Ds, les deux autres tiers étant hétérozygotes pour l'insertion (Figure 51-C). Ces résultats indiquent donc qu'un phénotype de photoblanchiment à caractère récessif s'exprime chez le double mutant *porA* (-/-) *porB* (-/-).

Bien que l'absence des protéines PORA ou PORB indifféremment testée conduise à la réduction des corps prolamellaires, les deux simples mutants ne photoblanchissent pas et se développent normalement suite à une exposition rapide à la lumière après étiolement. Cependant, lorsque les deux isoformes sont absentes, nous observons le photoblanchiment des plantules étiolées. Nous nous attendons de façon très probable, même si cela doit être vérifié, à l'absence de corps prolamellaires chez le double mutant. Cette vérification confirmerait le rôle photoprotecteur fondamental des protéines POR au sein des corps prolamellaires tout en montrant un rôle redondant des deux isoformes, PORA et PORB.

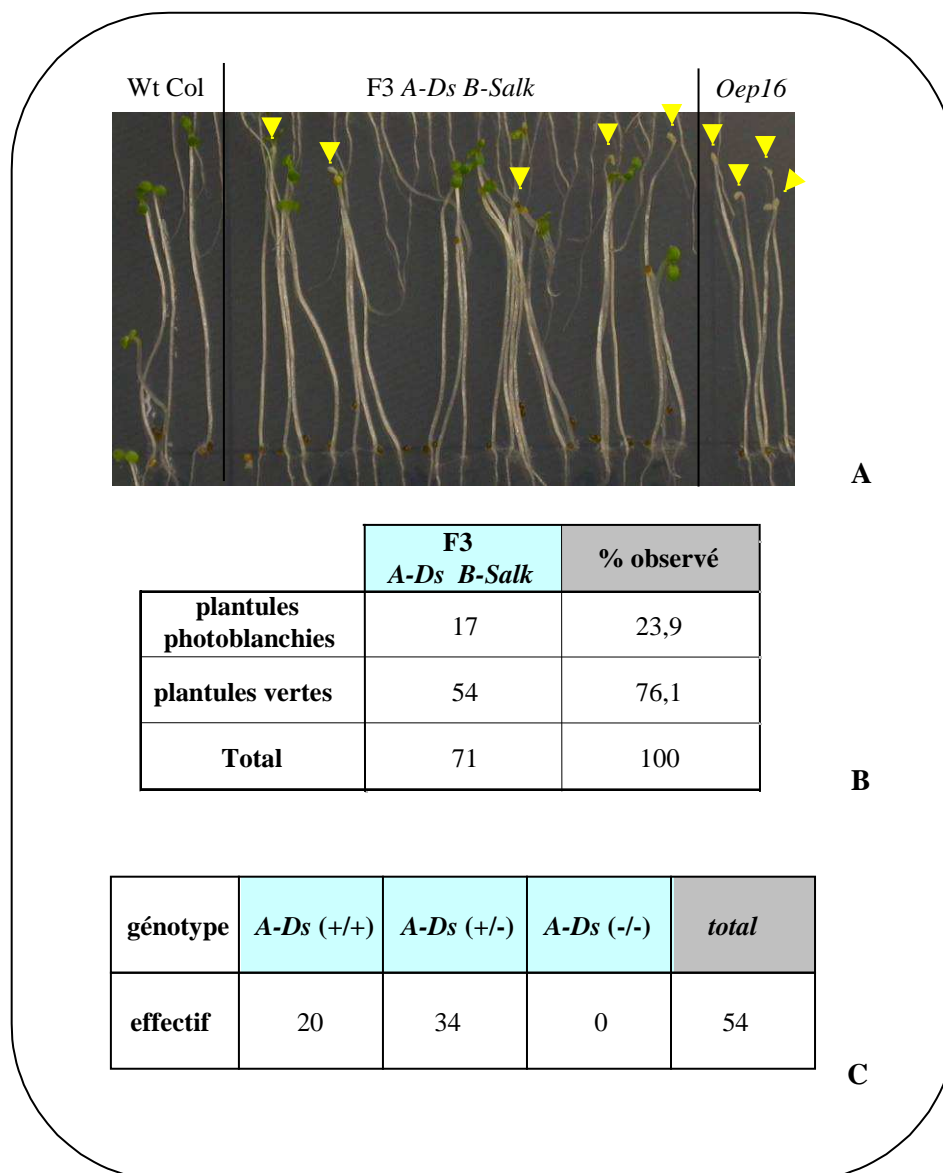


Figure 51 : Test de photoblanchiment sur une population F3 *porB* (-/-) ségrégant pour la mutation *porA-Ds*.

A. Photographies prises après 5 jours d'obscurité + 48h d'éclairage continu ($120 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). Tête de flèche jaunes : individus ayant photoblanchi. Contrôle négatif : écotype sauvage (Wt Col). Contrôle positif : mutant *oep16*. **B.** Effectif des individus ayant photoblanchi ou non sur la population F3 *porA porB* totale. **C.** Effectifs pour chaque catégorie de génotype parmi les individus F3 qui ont verdi lors du test de photoblanchiment.

2. Rôle de la protéine PORA dans le développement de la plante d'*Arabidopsis* à la lumière

2.1 Implication de la protéine PORA lors de la germination

La différenciation des proplastés en chloroplastes nécessite la perception d'un signal lumineux (Chory, 1991). Cette différenciation s'accompagne du développement des membranes thylacoïdiennes au sein desquelles des complexes protéiques sont assemblés et assurent le flux d'électrons photosynthétiques et la synthèse d'ATP (Wollman *et al.*, 1999; Rochaix, 2001). La mise en place de ces structures photosynthétiques ne peut se faire en l'absence de chlorophylle, qui stabilise les complexes (Mullet *et al.*, 1990). Lors de la germination, la synthèse de chlorophylle est donc étroitement couplée à la différenciation des chloroplastes, notamment *via* l'activité lumière-dépendante des protéines PORA et PORB. Nous avons voulu savoir si l'une ou l'autre des isoformes POR pouvait jouer un rôle particulier lors de cette étape. Pour cela, nous avons suivi la germination d'individus des lignées *porA-Ds* et *porB-Salk* en condition de jour long (Figure 52). L'ensemble de cette étude a été réalisée à partir de semis sur milieu gélosé supplémenté en saccharose (1%), la lignée *porA-Ds* développant un phénotype chlorotique puis létal au bout de trois semaines en absence de sucre.

Nous constatons de façon générale que le développement de l'écotype Landsberg est plus lent que celui de l'écotype Columbia, tout au moins au début. En effet, alors que Columbia présente déjà des cotylédons verts et ouverts à 3,5 jours, ceux de l'écotype Landsberg sont encore fermés et non chlorophylliens. Le retard observé est cependant rattrapé entre 3,5 et 4,5 jours. Aucune différence n'est visible entre les deux écotypes au stade 5,5 jours.

Le développement du mutant *porB-Salk* ne présente pas de différence avec celui de l'écotype sauvage Columbia. Lorsque nous comparons le développement des individus de la lignée *porA-Ds* avec celui du sauvage Landsberg, nous observons un léger retard de développement dès le début de la germination, puisqu'à 2,5 jours alors que le sauvage a les cotylédons hors des téguments de la graine, ceux de la plantule de *porA-Ds* ne le sont pas encore. Une fois que ces derniers sont sortis, on constate cette fois-ci un retard de croissance, caractéristique de cette lignée. L'autre observation importante est la forte présence d'anthocyanes à la base des cotylédons lors de leur sortie des téguments (3,5 jours) mais aussi

dans l'ensemble des cotylédons de la plantule à 4,5 et 5,5 jours. Cependant, les cotylédons de la plantule ne semble plus en contenir à 7 jours (Figure 53). La présence d'anthocyanes suggère que la lignée *porA-Ds* subit un stress lumineux.

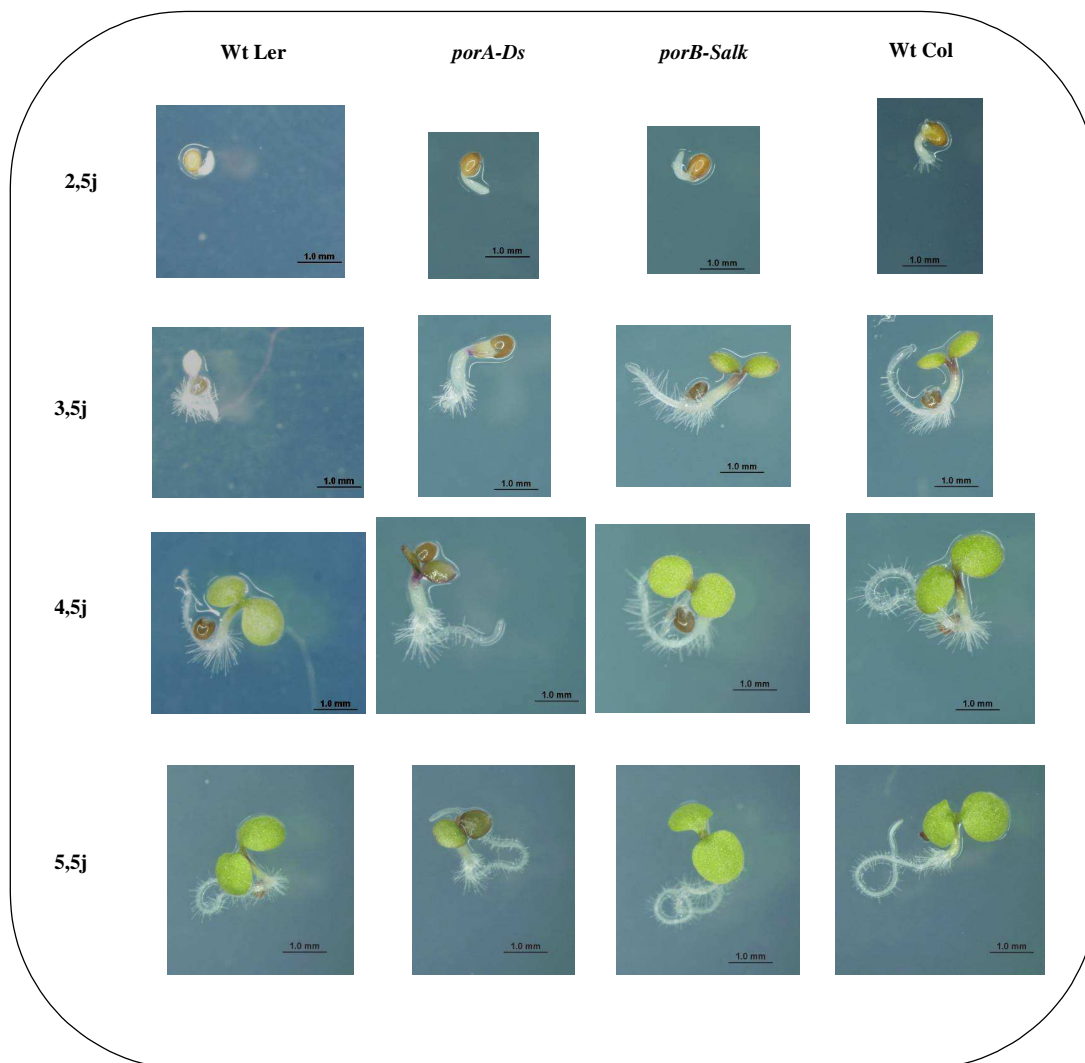


Figure 52 : Cinétique de germination des lignées *porA-Ds* et *porB-Salk*.

Germination en condition de jour long (16h/8h). Cliché pris chaque jour 8 h après le début de l'éclairage. Les écotypes sauvages correspondants respectivement aux lignées *porA-Ds* et *porB-Salk* à savoir Landsberg (Wt Ler) et Columbia (Wt Col) sont présentés en parallèle.

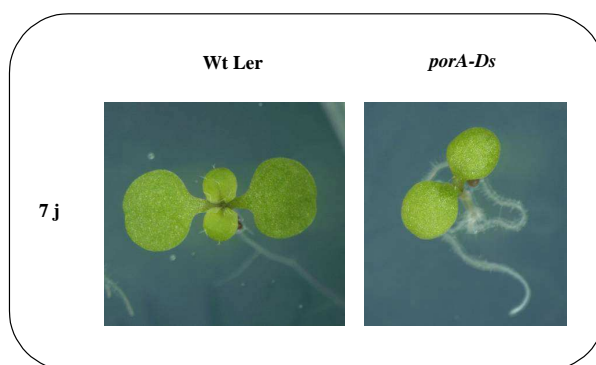


Figure 53 : Développement d'individus homozygotes de la lignée *porA-Ds* à 7 jours, en condition de jour long (16h/8h).

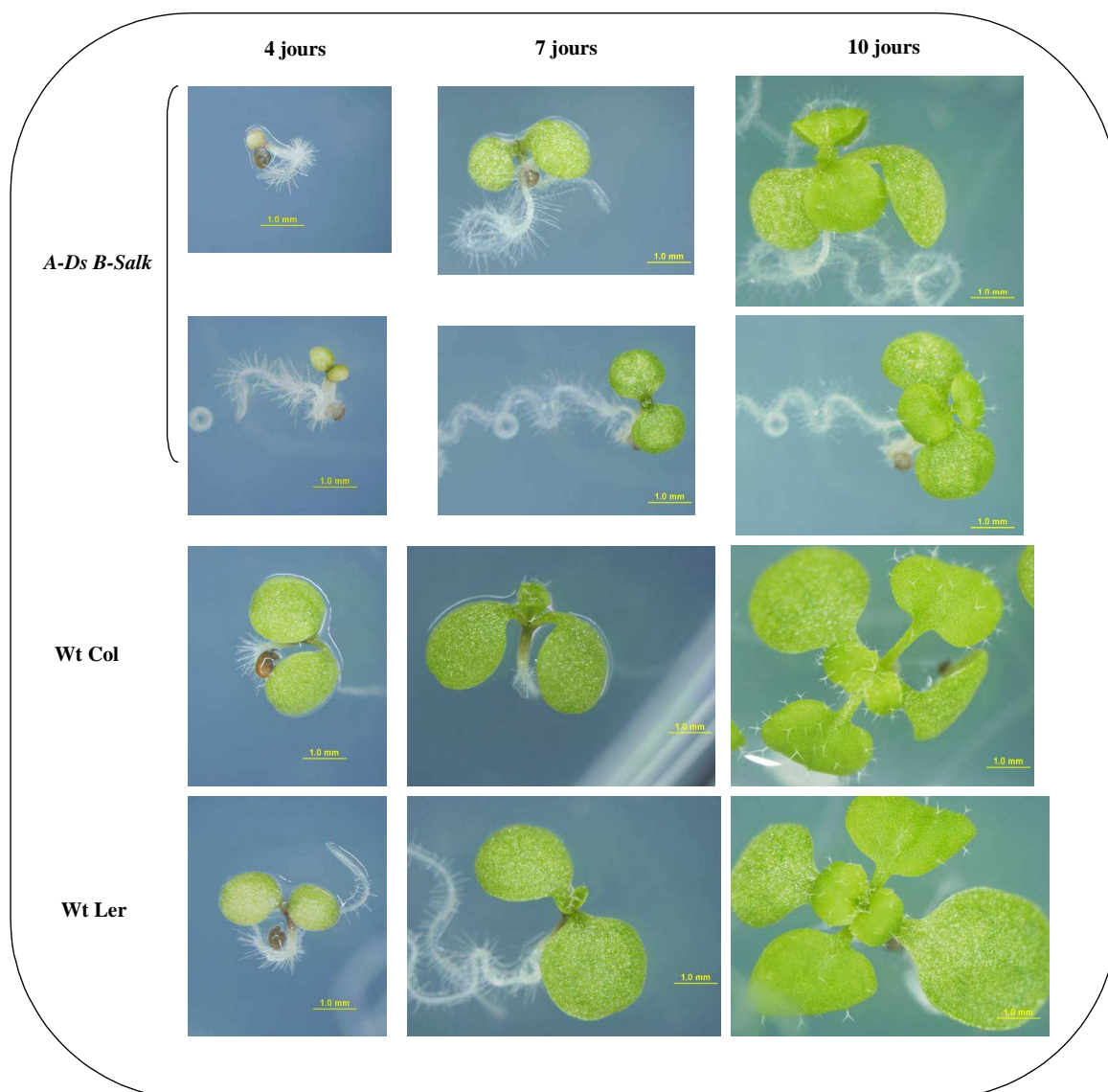


Figure 54 : Cinétique de germination du double mutant *porA porB*.

Germination en condition de jour long (16h/8h). Cliché pris chaque jour 8 h après le début de l'éclairage. Les écotypes sauvages correspondants au fond génétique des lignées mères à savoir Landsberg (Wt Ler) et Columbia (Wt Col) sont présentés en parallèle.

Comme nous l'avons vu lors de sa caractérisation (voir § 3 du Chapitre II), le double mutant *porA porB* est capable de germer et de croître, avec cependant un développement équivalent à celui du mutant *porA-Ds*. Au début de la germination, le double mutant présente également une accumulation d'anthocyanes, qui semble toutefois un peu plus faible que chez la lignée *porA-Ds* (4 jours). Le développement ultérieur du double mutant suit celui de la lignée *porA-Ds* (Figure 54).

L'accumulation d'anthocyanes est interprétée comme le signe d'un stress lumineux qui ne semble pas aggravé chez le double mutant par rapport à la lignée *porA-Ds*. L'absence d'aggravation du phénotype développemental du double mutant par rapport à la lignée *porA-Ds* seule nous permet par ailleurs de dire que l'absence conjointe des protéines PORA et PORB ne semble pas affecter plus la mise en place à long terme des structures photosynthétiques lors de la germination que l'absence de la protéine PORA seule. La protéine PORC, dont l'expression est induite à la lumière et au début du développement, peut donc suffire à la synthèse de chlorophylle nécessaire à la mise en place des structures photosynthétiques. Il serait intéressant de quantifier l'expression de PORC pour déterminer si un phénomène compensatoire est mis en place.

2.2 Implication de la protéine PORA dans le développement post-germinatif

a. Développement de la lignée *porA-Ds*

Les individus de la lignée *porA-Ds* développent un phénotype nain accompagné d'une coloration vert pâle (Figure 55-A et B). Ces deux caractéristiques ont été étudiées en détail sur une trentaine de plantes homozygotes *porA-Ds* comparativement à l'écotype sauvage Landsberg en condition jour long (16h jour / 8h nuit).

La réduction de taille, mesurée en fin de floraison une fois la hampe florale à son maximum, est de 88 % (Figure 55-C). L'effet de la mutation est moins important sur l'appareil racinaire (Figure 55-D). Cette réduction de taille persiste en présence d'hormones végétales de croissance. Des concentrations de 0,1 μM , 0,5 μM et 1 μM de brassinostéroïdes, ou 1 μM de gibbérellines ont été utilisées (données non montrées) pour essayer de favoriser la croissance, mais également de compléter l'effet éventuel de l'une de deux insertions de T-DNA supplémentaires liées à celle dans *PORA* (voir § 1.1d du Chapitre II). Les changements développementaux observés ont été comparables à ceux observés pour les

individus sauvages. Le phénotype nain n'est donc pas réversible par l'emploi d'hormones impliquées dans l'élongation cellulaire, en tout cas dans les concentrations testées ici.

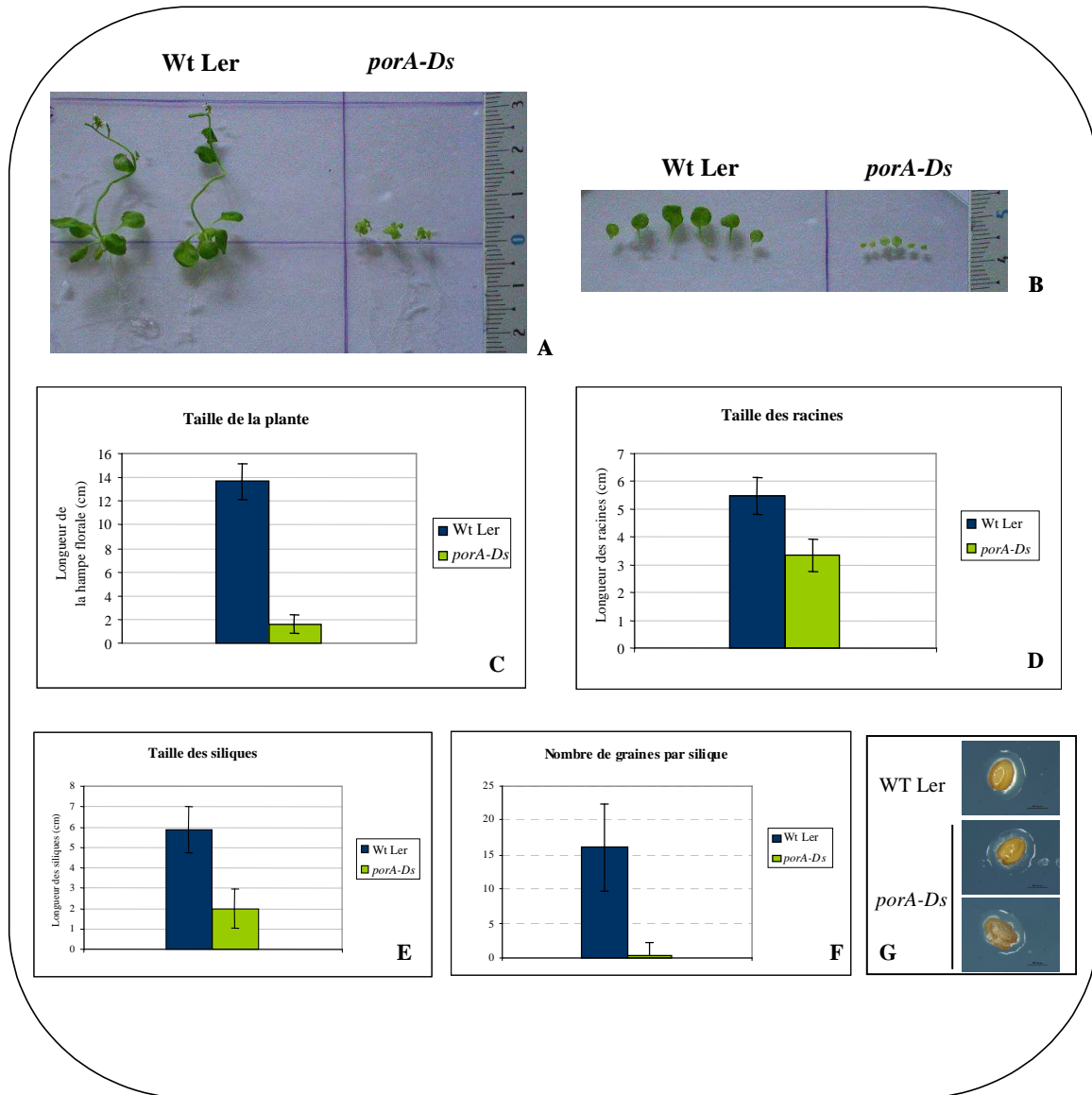


Figure 55: Caractérisation phénotypique de la lignée *porA-Ds*.

Cette caractérisation est effectuée en comparaison avec l'écotype sauvage Landsberg (Wt Ler) ayant poussé dans les mêmes conditions. **A.** Phénotype des individus de la lignée *porA-Ds* cultivées *in vitro* âgées de 30 jours. **B.** Dissection d'une rosette correspondante. **C.** Taille moyenne de la plante (longueur de la hampe florale principale). **D.** Taille de l'appareil racinaire. (C et D : moyennes sur environ 30 plantes mesurées en fin de floraison soit environ 2,5 mois pour le sauvage Ler et 3,5 mois pour *porA-Ds*) **E.** Taille des siliques vertes à maturité. **F.** Nombre moyen de graines par silique. (E et F : moyennes faites sur 120 siliques de Ler et 186 siliques de *porA-Ds*). **G.** Graines matures observées à la loupe binoculaire. Panneau du haut, graine mature de sauvage Ler. Panneau du milieu, graine mature de *porA-Ds* identique à celle du sauvage. Panneau du bas, graine mature de *porA-Ds* au tégument rugueux et irrégulier.

Le nanisme de la lignée *porA-Ds* concerne le développement végétatif mais aussi la taille de la hampe florale. Il est associé à une fertilité très réduite. En effet la plupart des fleurs formées avortent et ne produisent pas de silique. Lorsqu'une silique réussit à se former, la majorité des ovules ne donnent pas de graines matures. La taille d'une silique étant en relation directe avec le taux de développement des graines. Les siliques de la lignée *porA-Ds* font en moyenne 28 % de la taille de celles du sauvage (Figure 55-F). Au final on dénombre en moyenne seulement 0,4 graine mature par silique formée (Figure 55-E). Avec en moyenne 5 siliques formées par plante, cela correspond à une moyenne de 2 graines produites par plante dans des conditions de culture optimales. De manière remarquable, les rares graines matures sont de taille normale et sont identiques à celles du sauvage (Figure 55-G, panneaux du haut et du milieu), cependant environ la moitié d'entre elles présentent un tégument à l'aspect rugueux et irrégulier (Figure 55-G, panneau du bas). On observe pour finir, une proportion équivalente de graines qui ne germent pas, ce qui réduit d'autant plus la descendance.

La deuxième caractéristique phénotypique de la lignée *porA-Ds* est sa coloration vert-pâle (Figure 56-A et B). Un dosage des pigments principaux (Chl *a* / Chl *b* / Caroténoïdes totaux) a été réalisé par spectrophotométrie sur une dizaine d'individus nains et sauvages (Figure 56-A). Nous constatons que les individus de la lignée *porA-Ds* contiennent en moyenne seulement 35 % de la teneur en pigments chlorophylliens et en caroténoïdes du sauvage Landsberg cultivé dans les mêmes conditions. Le rapport Chl *a* / Chl *b* n'est pas modifié (Figure 56-B).

Les phénotypes observés lors du développement post-germinatif sont pour le moins inattendus pour une mutation dans le gène *PORA*, et ce pour plusieurs raisons. Tout d'abord, la faible quantité de transcrite et de protéine PORA comparativement à PORB et PORC qui sont majoritaires, ne laissent pas présager d'un effet si fort lors de l'absence de la protéine. D'autre part, lorsque l'une de ces protéines majoritaires, PORB ou PORC, n'est pas exprimée (Frick *et al.*, 2003; Masuda *et al.*, 2003), aucun phénotype n'est observé, pas même au niveau de la concentration en pigments chlorophylliens malgré le rôle direct de ces protéines dans la voie de biosynthèse de la chlorophylle.

Comme nous l'évoquions dans le chapitre II, la présence d'au moins une autre insertion supplémentaire dans la lignée *porA-Ds* dont l'une d'entre elles se situerait à moins d'1 cM de celle se trouvant dans le gène *PORA*, pourrait être responsable du phénotype observé. Pour tenter de trouver une réponse face à cette éventualité, nous avons cherché à compléter la lignée *porA-Ds*.

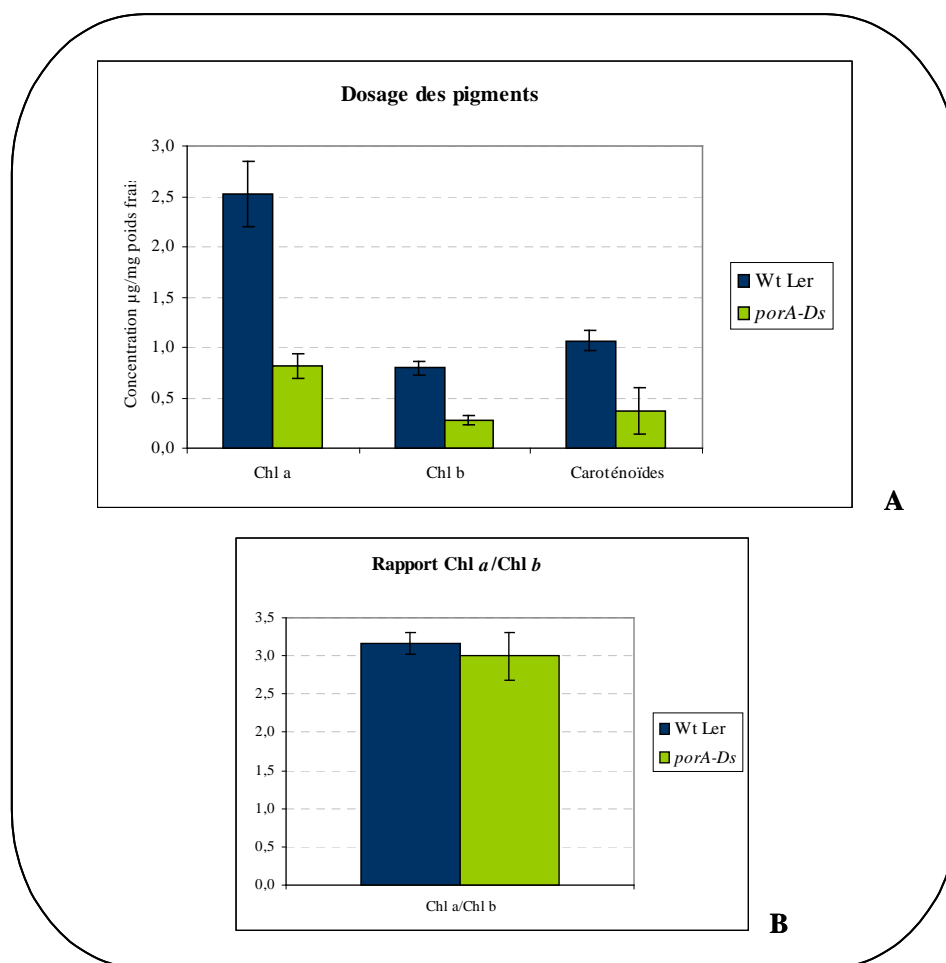


Figure 56 : Dosage de pigments de la lignée *porA-Ds* par spectrophotométrie. Analyses effectuées sur dix individus adultes de chaque génotype.

b. Essai de complémentation de la lignée *porA-Ds*

La lignée *porA-Ds* a été complétementée avec la séquence codante complète du gène *pPORA* sous contrôle du promoteur de l'ARN 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur, *via A.tumefaciens* (voir § 1.2 du Matériel et Méthodes). Les plantes homozygotes pour l'insertion Ds dans *PORA* étant naines et trop peu fertiles, la transformation a été réalisée sur des plantes hétérozygotes *porA-Ds* (+/-) de la génération F2 du deuxième rétrocroisement. Ces plantes, dites T0, ont été préalablement sélectionnées sur kanamycine et en fonction de leur taille (choix des plantes résistantes de taille normale) puis transférées en terre à raison de 35 plantes par pots, dans 11 pots différents. La transformation par *A.tumefaciens* a été réalisée par *floral-dip*. Chaque pot a été considéré ultérieurement comme un lot de transformants indépendant.

Une partie de la descendance de ces plantes, appelée population T1, a été semée sur milieu gélosé sélectif contenant du glufosinate d'ammonium (Basta), à raison d'une centaine de

graines par lot. Les individus Basta résistants ont été repiqués avant d'être génotypés dans le but de sélectionner des individus *porA-Ds (+/-)* porteurs du 35S (notés ultérieurement *porA-Ds (+/-) 35S*), et d'en obtenir la descendance. Au total 8 individus différents, représentant des événements de transformation indépendants, ont été retenus pour produire la génération T2 dans laquelle ségrègent l'insertion Ds dans *PORA* et le transgène *35SpPORA*. En parallèle, des individus dits « contrôles » *porA-Ds (+/-)* sans 35S ont été sélectionnés.

Environ 80 graines des huit populations de graines T2 *porA-Ds (+/-) 35S* ont été semées sur kanamycine. Une ségrégation de type 1 : 3 a été observée, reflétant la ségrégation de l'allèle *porA-Ds* (données non montrées). D'autre part, les huit populations de graines T2 *porA-Ds (+/-) 35S* ainsi que la population contrôle ont été semées sur milieu gélosé sélectif contenant du glufosinate d'ammonium (Basta) à raison de 80 graines par population. Des graines issues d'une plante sauvage d'écotype Landsberg ainsi que celles d'un mutant résistant au glufosinate (*kak5*, (El Refy *et al.*, 2003)) ont été semées en parallèle.

Les contrôles utilisés ont tous répondu comme attendu (Figure 57-A) : la lignée résistante *kak-5* avec 100% d'individus résistants tandis que les lignées Wt Ler et *porA-Ds (+/-)* sans 35S, ont montré 100% d'individus sensibles. Une ségrégation pour la résistance au glufosinate est attendue (1/4 de sensibles pour 3/4 de résistants) et est retrouvée pour toutes les familles T2 dans une gamme allant de 71 % à 84% d'individus résistants. D'une manière remarquable, on retrouve une minorité de plantes naines (10 % à 28 %) parmi les plantes Basta résistantes de toutes les familles T2, d'apparence semblable à celles de la population contrôle *porA-Ds (+/-)* sans 35S (Figure 57-B). Cette observation contredit l'hypothèse d'une restauration du phénotype de stature normale du mutant *porA-Ds* par le transgène *35SpPORA*. De plus, elle s'accorde avec l'absence de complémentarité qui prévoit la présence de $3/16^{\text{ème}}$ de plantes à la fois naines et Basta résistante dans les familles T2.

Le génotypage de l'ensemble des individus résistants de chaque population (environ 60 par population) nous indique qu'aucun individu résistant à la stature normale ne porte l'insertion Ds à l'état homozygote dans *PORA*. Seuls les individus au phénotype nain sont *porA-Ds (-/-) 35S*. D'autre part, la coloration vert pâle caractéristique de la lignée *porA-Ds* est également retrouvée chez les individus *porA-Ds (-/-) 35S* (Figure 57-B). Un dosage par spectrophotométrie des pigments principaux effectué sur l'ensemble des individus nains, en parallèle d'un dosage sur des individus nains *porA-Ds (-/-)* sans 35S nous confirme que la réduction du taux de pigments par rapport au sauvage Landsberg est maintenue dans ces populations (Figure 57-C).

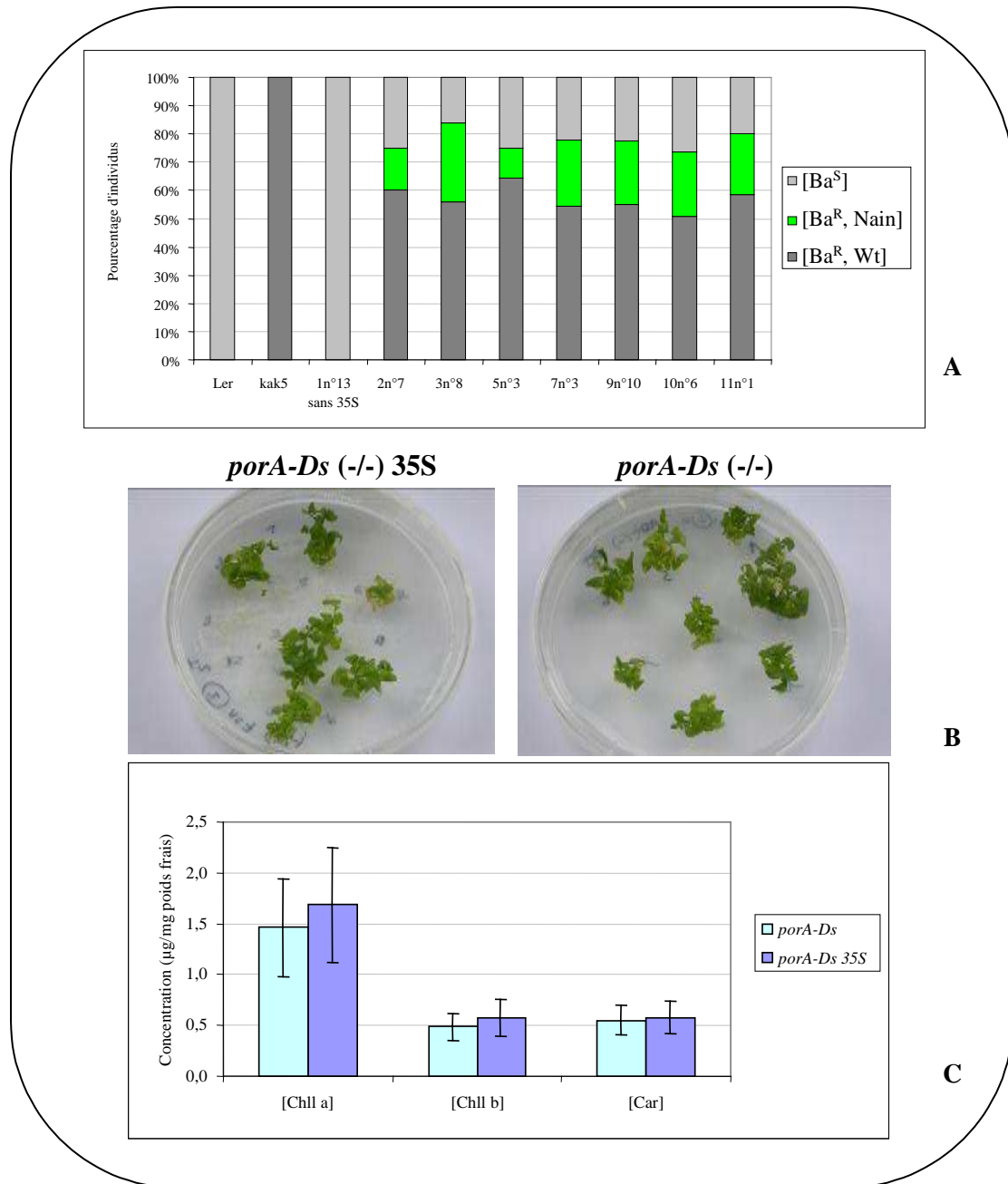


Figure 57 : Caractérisation de la lignée *porA-Ds* transformée par 35SpPORA.

A. Ségrégation des phénotypes de la T2 par l'intermédiaire de la résistance au glufosinate d'ammonium. Effectifs d'individus sensibles [Ba^S], d'individus résistants de phénotype sauvage [Ba^R, Wt] et d'individus résistants au phénotype nain [Ba^R, Nain]. **B.** Phénotype d'individus *porA-Ds* (-/-) porteurs du transgène 35SpPORA (panneau de gauche) ou non (panneau de droite). Plantes âgées de 2 mois ayant poussé en milieu non sélectif et sélectionnées par génotypage. **C.** Dosage des pigments principaux par spectrophotométrie chez les individus *porA-Ds* (-/-) 35S par rapport aux individus *porA-Ds* (-/-) sans 35S.

La lignée *porA-Ds* ne semble donc pas être complétée pour l'un ou l'autre de ces phénotypes si pour autant le promoteur 35S est actif et surexprime la protéine pPORA. Nous avons donc voulu vérifier si le promoteur 35S était effectivement actif en étudiant l'expression de la protéine PORA dans les différentes populations T2 (Figure 58). Les protéines PORA et PORB étant plus abondantes à l'obscurité, les protéines totales ont été extraites à partir de plantules étiolées de 5 jours. D'autre part, ne disposant pas encore de graines T3 issues d'individus *porA-Ds* (-/-) 35S, une cinquantaine de graines de chaque population T2 a été semée indépendamment sur milieu gélosé. Trois quart des plantules doivent contenir l'insertion 35S*pPORA*. Nous devrions donc être en présence d'une augmentation globale de la quantité de protéine PORA exprimée sur l'ensemble de la population analysée par rapport à un pool de plantes sauvages Ler ou de plantes F2BC2 *porA-Ds* qui ségrègent pour l'allèle *porA-Ds*.

Les extraits de plantes étiolées du sauvage et de la F2 *porA-Ds* contiennent les deux polypeptides PORA et PORB en quantités importantes, avec toujours une prédominance de protéines PORB. Les populations T2 testées accumulent des quantités de protéines POR équivalentes, voire inférieures, à celles trouvées chez l'écotype sauvage Ler et la population F2BC2 *porA-Ds*. Plusieurs hypothèses existent pour expliquer cela. Le promoteur 35S de la construction employée n'est pas actif, comme cela est souvent le cas pour des raisons qui sont mal connues. Il pourrait également exister un mécanisme de régulation post-traductionnel qui contrôle la quantité des protéines POR (ou de PORA seule) présente *in planta*. La dernière possibilité, déjà développée au début de ce chapitre, impliquerait un import Pchl_{ide}-dépendant limitant. Pour la contourner il faudrait tester la présence de protéine PORA à la lumière dans des feuilles adultes qui ne présentent pas cet import Pchl_{ide} dépendant (Kim and Apel, 2004). La diminution de protéines POR chez certaines des populations T2 pourrait provenir d'un effet de *silencing* post-transcriptionnel (Hammond *et al.*, 2001).

Nous ne sommes donc pas en mesure de savoir si les lignées *porA-Ds* 35S surexpriment la protéine PORA ou pas. Il nous est donc impossible de déterminer à ce stade si le phénotype nain et/ou la déficience en chlorophylle observés chez la lignée *porA-Ds* peuvent être complétés par un gène *PORA* sauvage et donc si ces phénotypes sont causés par la présence de l'insertion *Ds* dans le gène *PORA* ou bien par celle de l'une des insertions supplémentaires dans un autre gène.

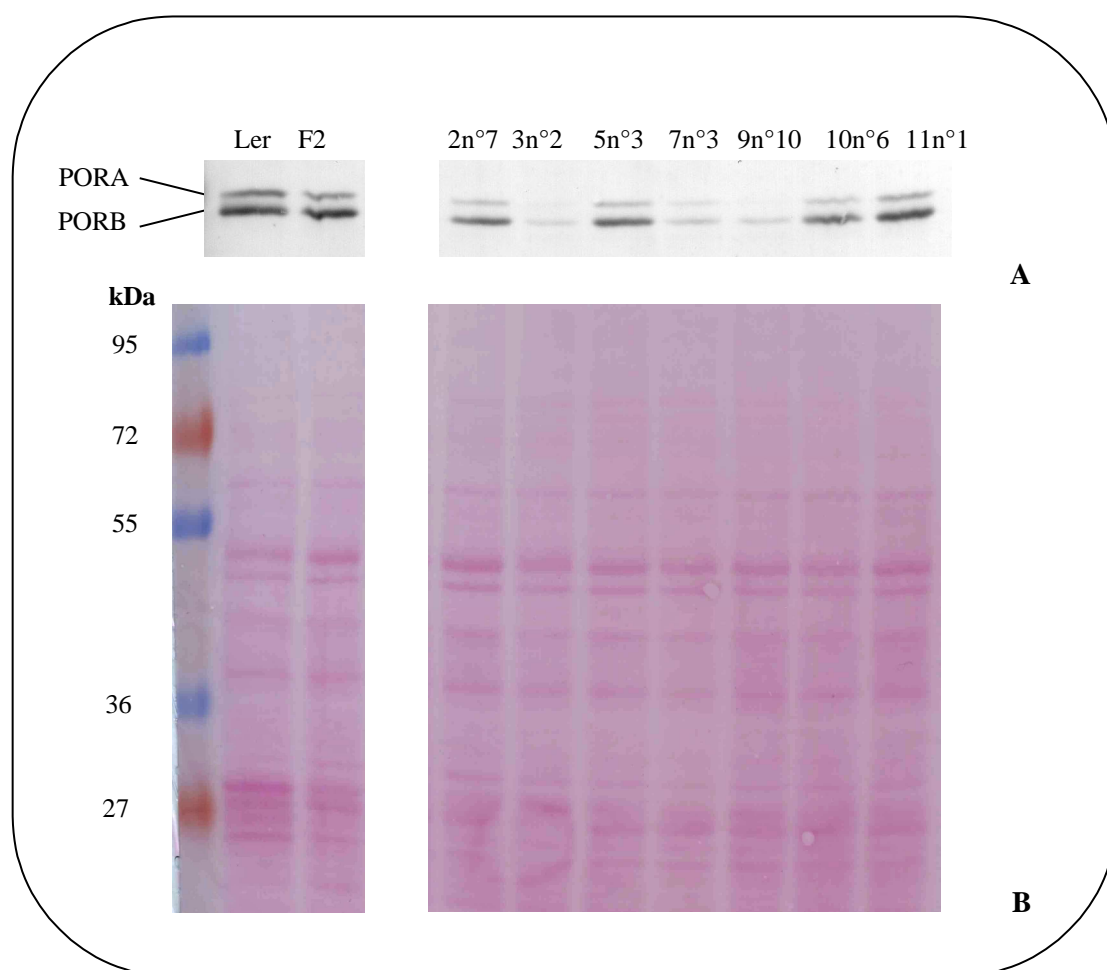


Figure 58 : Immunodétection des protéines PORA et PORB sur la T2 des lignées *porA-Ds* 35S.
A. Immunodétection par un anticorps anti-PORA d'orge. 10 µg de protéines ont été déposées par échantillon. **B.** Coloration de la membrane au Rouge Ponceau après transfert. Ler : sauvage Landsberg. F2 : population F2BC2 de la lignée *porA-Ds* qui ségrège pour l'allèle *porA-Ds*. 2 n°7, 3 n°2, etc. : identification des populations T2 étudiées, chacune étant issue d'un lot de transformants indépendant.

c. Etudes complémentaires portant sur la lignée *porA-Ds*

Malgré notre impossibilité à déterminer si le phénotype nain et/ou la déficience en chlorophylle de la lignée *porA-Ds* sont causés par la présence de l'insertion *Ds* dans le gène *PORA*, nous avons tout de même réalisé des études complémentaires dans le but de pouvoir potentiellement expliquer l'un et/ou l'autre des phénotypes observés chez cette lignée.

- Dosage des pigments par HPLC

Contrairement à un dosage par spectrophotométrie qui quantifie la teneur globale en pigments principaux (Chl *a* / Chl *b* / caroténoïdes), un dosage par HPLC permet de distinguer et de quantifier les différentes formes de pigments présents dans l'extrait, en particulier les différents caroténoïdes (lutéine, différents xanthophylles et β -carotène).

En réalisant un dosage par HPLC sur les individus *porA-Ds*, nous avons voulu déterminer si une forme particulière de l'un des pigments présentait une variabilité qui n'aurait pas été détectée par spectrophotométrie. Le dosage a été effectué sur les parties aériennes de plantes adultes homozygotes *porA-Ds* et sur des feuilles de plantes d'écotype sauvage Landsberg cultivées en condition jour long sous une intensité lumineuse de $70 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Le profil d'HPLC de l'extrait sauvage montre la présence des deux types de chlorophylle (Chl *a* et Chl *b*), de xanthophylles (néoxanthine, violaxanthine), de lutéine et de deux de ses isomères, ainsi que de β -carotène (Figure 59). La lignée *porA-Ds* présente un profil identique avec cependant une réduction globale très importante du contenu en pigments, confirmant celle constatée par spectrophotométrie, la taille des pics d'élution étant proportionnelle à la quantité de pigments.

Lorsque l'on regarde plus précisément les profils par un agrandissement, on constate l'apparition d'un pic dans l'extrait *porA-Ds* qui correspond à l'élution de la zéaxanthine. La quantité correspondante est de 1,7% des caroténoïdes totaux présents chez les individus de la lignée *porA-Ds* (Figure 60). D'autre part de l'antéaxanthine a été détectée à raison de 3,1 % par rapport à la quantité totale de caroténoïdes présents chez cette lignée (Figure 60). Ces deux formes de xanthophylle sont absentes de l'extrait sauvage.

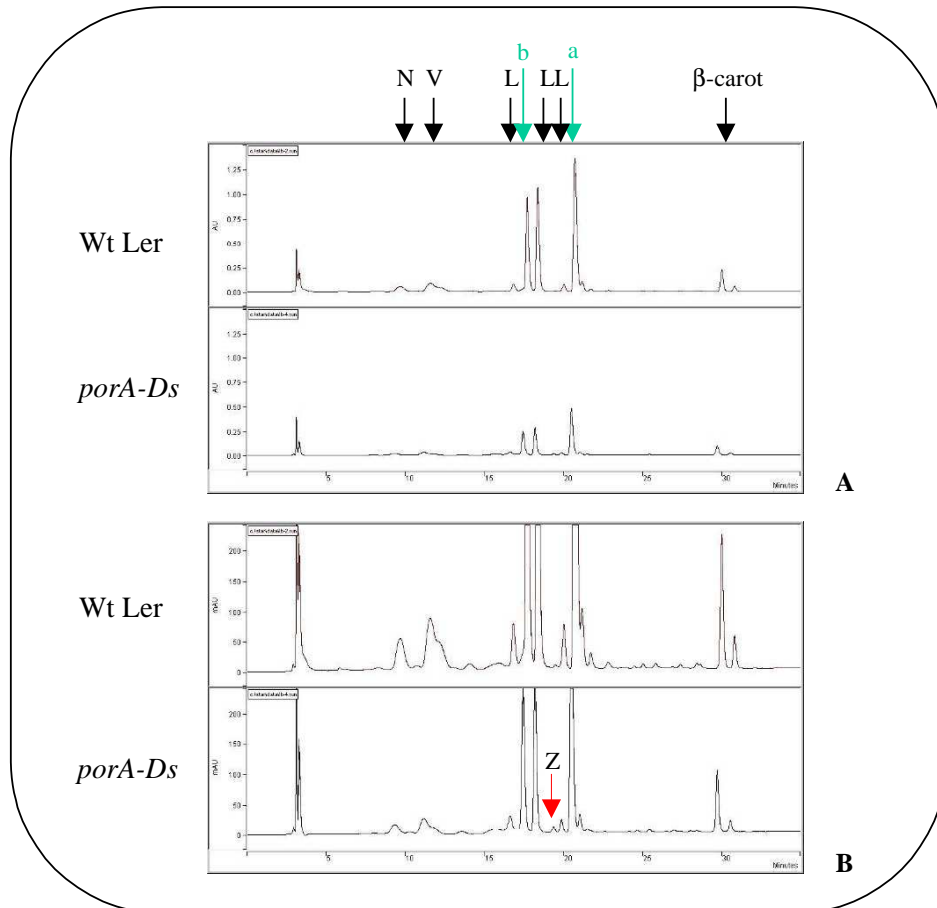


Figure 59 : Analyse par HPLC du contenu en pigments de la lignée *porA-Ds*.

Tête de flèche noire : caroténoïdes. N : Néoxanthine. V : Violaxanthine. L : Lutéine. A : Antéroxanthine. Z : Zéaxanthine. β -carot : β -carotène. Tête de flèche verte : Chlorophylles *a* (*a*) et *b* (*b*). **A.** Profils des pigments obtenus pour le sauvage Ler (Wt Ler) et la lignée *porA-Ds*. Maximum de l'échelle à 1,5 UA. **B.** Idem, avec étirement de l'axe des ordonnées : maximum de l'échelle à 250 mUA.

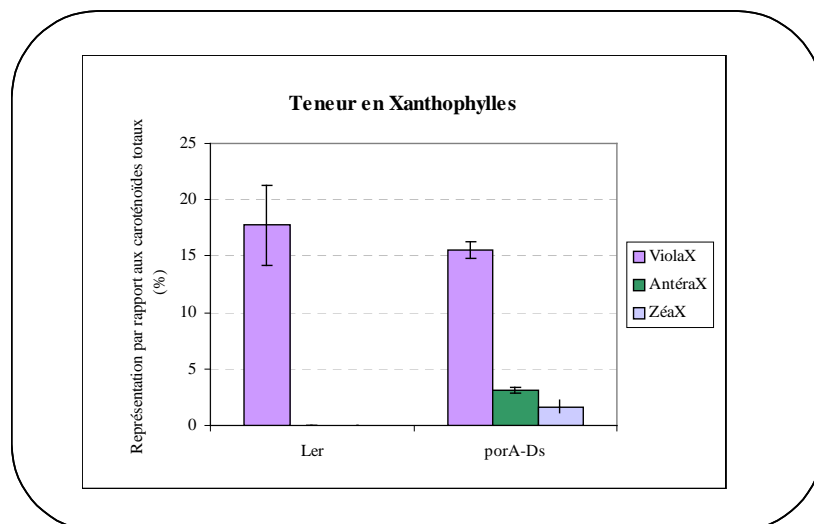


Figure 60 : Dosage par HPLC des xanthophylles de la lignée *porA-Ds*.

Teneur en xanthophylles par rapport à la quantité totale de caroténoïdes de la lignée *porA-Ds* (en %). ViolaX : Violaxanthine. AntéraX : Antéroxanthine. ZéaX : Zéaxanthine. Dosage réalisé sur 5 échantillons différents par génotype. Ler : sauvage Landsberg.

Selon leur structure biochimique, les différentes formes de caroténoïdes ont une fonction prépondérante de collecteur de lumière ou de photoprotection par dissipation de l'excès d'énergie sous forme de chaleur. La forme majoritaire des xanthophylles est la violaxanthine qui possède principalement une fonction collectrice de lumière. Elle peut-être convertie en antéaxanthine puis en zéaxanthine, forme photoprotectrice, par l'intermédiaire de la violaxanthine dé-époxydase dont l'activité optimale se situe à bas pH (Demmig-Adams *et al.*, 1996). En condition de lumière normale, le gradient de protons établi par la chaîne linéaire des électrons est dissipé par l'ATP synthase qui l'utilise pour produire de l'ATP. Lors d'une exposition à la lumière forte, le gradient de protons est plus difficilement dissipé, entraînant une baisse de pH dans le lumen des thylacoïdes et par conséquent la formation de zéaxanthine qui assure alors sa fonction photoprotectrice (Havaux and Niyogi, 1999; Johnson *et al.*, 2007). Dans le cas de la lignée *porA-Ds*, la présence de zéaxanthine nous indique que le gradient de protons n'est pas correctement dissipé et ce malgré une lumière relativement faible de $70 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Ainsi les individus *porA-Ds* présentent un stress lumineux en condition de lumière faible.

Plusieurs hypothèses non exclusives peuvent être émises pour expliquer la non dissipation du gradient de protons, notamment les suivantes :

- l'activité de l'ATP synthase pourrait être soit altérée, soit limitée par la concentration en ADP disponible ;
- le fonctionnement du photosystème II (PSII), qui participe à l'établissement du gradient par la chaîne linéaire d'électrons, pourrait être perturbé. Dans ce cas, le gradient de protons est principalement maintenu par le flux cyclique d'électrons *via* le PSI ;
- le flux cyclique d'électrons pourrait également être renforcé par la présence d'une certaine quantité de sucres non utilisés par le mutant vu qu'il n'arrive pas à se développer normalement. Ces sucres seraient à l'origine d'une production accrue de NAD(P)H, *via* la glycolyse ou le cycle des pentoses phosphates, alimentant ainsi le flux cyclique d'électrons dans la chaîne photosynthétique par la NAD(P)H-déshydrogénase.

Pour étayer l'une ou l'autre de ces hypothèses nous avons mesuré l'efficacité photosynthétique du PSII.

- Détermination de l'efficacité photosynthétique.

Cette dernière a été quantifiée par l'intermédiaire d'un appareillage appelé Mini-Pam qui permet de mesurer la fluorescence émise par les pigments chlorophylliens en réponse à des flashes de lumière saturante. La lumière non utilisée est ré-émise sous forme de fluorescence et sa quantité rend compte de la quantité d'énergie normalement transformée par une activité photochimique. Dans le cas des individus de la lignée *porA-Ds*, une diminution d'efficacité du PSII d'environ 20 % a été détectée.

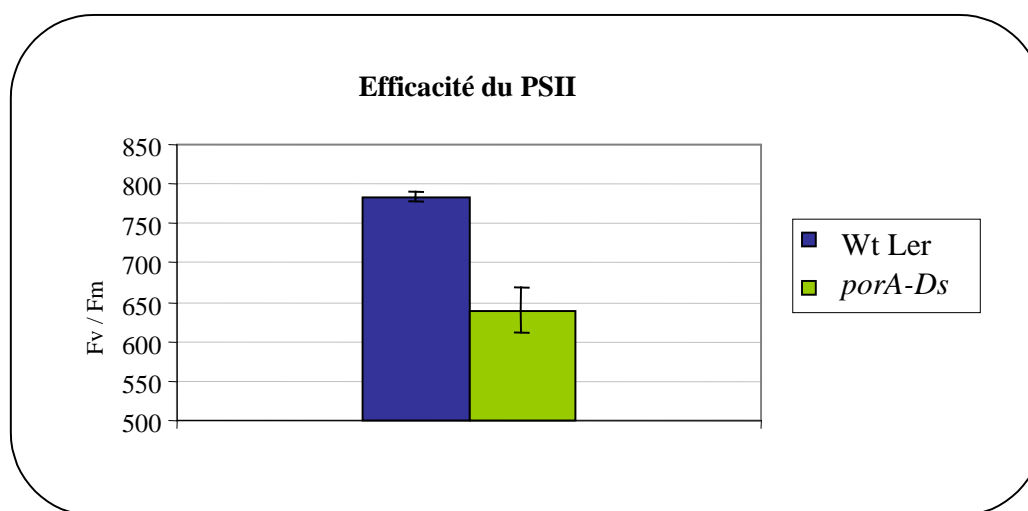


Figure 61 : Mesure de l'efficacité photosynthétique du PSII de la lignée *porA-Ds*.

L'efficacité photosynthétique est exprimée par le rapport Fv/Fm (voir §7 du Matériel et Méthodes).

La diminution d'efficacité photosynthétique du PSII pourrait partiellement être compensée par une augmentation de la teneur en saccharose du milieu. Nous avons testé cette possibilité en augmentant la concentration en saccharose de 10 g/L à 15 g/L, sans observer une amélioration de la croissance, voire même une inhibition tout comme chez le sauvage (données non montrées). A l'inverse, en absence de saccharose, les individus de la lignée *porA-Ds* meurent dans les trois semaines en ayant développé seulement une paire de feuille chlorotique (sur terre ou sur milieu gélosé) indiquant que l'activité photosynthétique existante des individus de la lignée *porA-Ds* est insuffisante pour permettre le développement et le maintien en vie la plante à long terme.

La diminution d'efficacité du PSII favorise l'hypothèse selon laquelle le gradient de protons serait sur-entretenu par le flux cyclique d'électrons. Pour confirmer et affiner cette

hypothèse, des expérimentations portant sur la réduction du pool des plastoquinones ainsi que sur le fonctionnement de la NAD(P)H deshydrogenase pourraient-êre entreprises. D'autre part l'activité de l'ATP synthase devrait également être mesurée pour s'assurer que son fonctionnement n'est pas altéré.

Deux hypothèses principales peuvent être avancées concernant la diminution d'efficacité du PSII chez le mutant *porA-Ds*.

La première repose sur une mauvaise dissipation de l'excès d'énergie qui serait responsable de la photo-inhibition du PSII. Quand l'énergie absorbée par les antennes collectrices de lumière excède la capacité maximale de l'utilisation de celle-ci par la photosynthèse, un mécanisme de dissipation non radiative de l'énergie en excès appelé *quenching* non photochimique (*non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence* – NPQ) est mis en place, dans lequel intervient notamment la zéaxanthine. Le surplus d'énergie sous forme d'électrons est également dissipé *via* de multiples voies métaboliques comme le cycle de Calvin, la réaction de Mehler ou encore la photorespiration. Si l'une ou l'autre de ces voies de dissipation venaient à être affectée, le surplus d'électrons conduit à la sur-réduction des éléments de la chaîne, et notamment des quinones du PSII. Dans ce cas un changement conformationnel important du PSII a lieu conduisant à sa déstructuration. On parle dans ce cas de photoinhibition du PSII. Ce processus pourrait expliquer la diminution de l'efficacité photosynthétique détectée pour la lignée *porA-Ds*. Cette hypothèse pourra être testée de manière complémentaire chez les individus de la lignée *porA-Ds* en quantifiant le NPQ et en vérifiant l'accumulation des protéines du PSII par Western-blot.

La seconde hypothèse qui pourrait expliquer une diminution de l'efficacité du PSII est la difficulté existante des individus de la lignée *porA-Ds* à réoxyder les éléments de la chaîne d'électrons. Chez une plante sauvage, cette étape de réoxydation est estimée complète en une demi-heure à l'obscurité, condition dans laquelle les mesures d'efficacité du PSII ont été réalisées. Dans le cas d'une altération quelconque d'un ou plusieurs éléments la chaîne de transport des électrons, ou de leur sur-réduction, la réoxydation nécessiterait plus de temps. Il faudrait donc effectuer la même mesure d'efficacité mais avec un temps supérieur à l'obscurité (par exemple 1h) de façon à vérifier si la baisse d'efficacité mesurée dans notre expérience est réelle ou bien si elle reflète simplement un défaut de réoxydation des constituants de la chaîne photosynthétique. D'autre part, dans l'hypothèse d'une influence de

la teneur en sucre dans le milieu, les mêmes mesures doivent être réalisées sur des plantes ayant été cultivées sur une gamme de saccharose, une augmentation du sucre disponible pouvant influencer sur l'alimentation du flux cyclique d'électrons dans la chaîne photosynthétique.

La diminution mesurée de l'efficacité du PSII et l'apparition de zéaxanthine, marqueur de stress lumineux, nous indiquent que le fonctionnement de la chaîne photosynthétique est altéré chez les individus de la lignée *porA-Ds*. Cependant deux questions fondamentales demeurent : cette altération du fonctionnement de la chaîne photosynthétique peut-elle être responsable du phénotype nain d'une part ? D'autre part, cette altération est-elle due à la mutation du gène *PORA* ou doit-elle être attribuée à l'une des deux autres insertions présentes dans le génome, voire à une combinaison de ces mutations ?

DISCUSSION

DISCUSSION

La réduction de la Pchl_{id}e en Chl_{id}e est une étape clé de la voie de biosynthèse de la chlorophylle. Chez les angiospermes, cette réaction est strictement dépendante de la lumière, faisant intervenir la NADPH : Pchl_{id}e-oxydoréductase (POR) (Griffiths, 1978) (Apel *et al.*, 1980). Cette enzyme, présente chez tous les organismes oxygéniques photosynthétiques, des cyanobactéries aux plantes supérieures, catalyse la seule réaction enzymatique de la biosynthèse de la chlorophylle qui nécessite de la lumière. Elle est donc directement impliquée dans le verdissement chez les angiospermes qui, contrairement à la plupart des organismes photosynthétiques, ne possèdent pas d'autre mécanisme pour réduire la Pchl_{id}e à l'obscurité.

La protéine POR forme un complexe ternaire avec son substrat, la Pchl_{id}e, et son cofacteur, le NADPH. Ce complexe est très stable à l'obscurité. En revanche, un photon absorbé par la Pchl_{id}e complexée déclenche immédiatement la réduction enzymatique en Chl_{id}e conduisant à la déstabilisation de la protéine. La Chl_{id}e est ensuite estérifiée et modifiée donnant de la Chl *a* et *b* qui stabilisent les complexes protéiques photosynthétiques. La réduction de la Pchl_{id}e en Chl_{id}e par la POR se fait donc conjointement à la formation des membranes photosynthétiques. La Pchl_{id}e engagée dans les complexes ternaires est dite photoactive, par opposition à la Pchl_{id}e libre qui ne peut pas être réduite directement et qui peut se désexciter en générant de l'oxygène singulet. L'accumulation de cette forme libre de Pchl_{id}e, photosensible, est limitée à l'obscurité par la protéine FLU chez les plantes supérieures (Lee *et al.*, 2003); Meskauskiene, 2001 #60} et chez *Chlamydomonas reinhardtii* (Falciatore *et al.*, 2005).

Les protéines POR des angiospermes étant codées par des gènes nucléaires, leurs précurseurs cytosoliques sont importés dans le plaste (Apel, 1981), où elles sont maturées et forment des complexes ternaires. Ces complexes stables à l'obscurité, forment en association avec des lipides de larges structures paracrystallines nommées « corps prolamellaires » (Dehesh and Ryberg, 1985). On retrouve également de la protéine POR dans les membranes des prothylacoïdes (Dahlin *et al.*, 1995; Barthélemy *et al.*, 2000). L'ensemble de ces structures font de la protéine POR la protéine majoritaire des étioplastés (Ryberg and Dehesh, 1986). Les protéines POR sont moins abondantes dans les chloroplastes photosynthétiques, où elles sont associées à l'enveloppe ainsi qu'aux membranes des thylacoïdes (Forreiter *et al.*, 1990; Joyard *et al.*, 1990; Barthélemy *et al.*, 2000).

Le gène *POR* est présent en plusieurs copies dans de nombreuses espèces de dicotylédones comme *A. thaliana* et *Nicotiana tabacum* (Armstrong *et al.*, 1995; Oosawa *et al.*, 2000; Masuda *et al.*, 2002), de monocotylédones comme l'orge ou le riz (Holtorf *et al.*, 1995), ou encore de gymnospermes comme le pin (Spano *et al.*, 1992b; Skinner and Timko, 1998). Sous bénéfice d'inventaire des génomes complets, le gène *POR* semble en revanche présent en un seul exemplaire chez la carotte ou le concombre. L'analyse phylogénétique suggère que les duplications ont été récentes et multiples dans l'histoire évolutive de la famille *POR* chez les végétaux supérieurs. Le haut degré de conservation des séquences protéiques *POR* matures contraste avec la variété de leurs profils d'expression dans les divers organes de la plante. La spécialisation des isoformes *PORA* d'*Arabidopsis* et d'orge vers une expression maximale lors de la germination et à l'obscurité mais limitée à la lumière, pourrait résulter d'une évolution convergente de ces gènes non orthologues. Chez *Arabidopsis*, trois gènes apparentés codant pour l'enzyme *POR* ont été identifiés (*PORA*, *PORB* et *PORC*). Les données bibliographiques traitant davantage de l'expression des transcrits que des protéines correspondantes, nous avons décidé d'étudier de façon plus systématique l'expression de ces gènes au cours du développement.

Nos résultats montrent que l'expression des gènes *POR* est soumise à un contrôle développemental qui est très fortement modulé par la lumière. Le gène *PORB* s'exprime ainsi dans tous les organes verts ou susceptibles de le devenir, faisant de la protéine *PORB* l'isoforme majoritaire. L'expression du gène *PORA* est toujours détectée en début de germination et se maintient pendant plusieurs jours à l'obscurité alors qu'elle s'éteint rapidement si la lumière survient. A l'inverse, l'expression de *PORC* est toujours plus tardive que celle de *PORA* et *PORB* dans les cotylédons, où elle est régulée positivement par la lumière. Ces résultats confirment les observations publiées (Armstrong *et al.*, 1995; Su *et al.*, 2001), et renforcent le modèle selon lequel *Arabidopsis* exprime les transcrits et les protéines *PORB* et *PORA* dans les cotylédons étiolés, et *PORB* et *PORC* dans les tissus photosynthétiques.

Nos résultats amènent toutefois à nuancer quelque peu cette vue. En effet, une expression faible mais non nulle du transcrit *PORA* est détectée à la lumière. De plus, la protéine *PORA* mature est détectable plusieurs semaines durant le développement d'*Arabidopsis* à la lumière, ce qui suggère qu'elle persiste dans les plastes, sans faire l'objet d'un *turnover* rapide. Les données bibliographiques, basées sur l'étude du transcrit, admettent communément une

absence de la protéine PORA à la lumière. Nos études d'expression sur des écotypes sauvages posent donc la question du rôle potentiel de la protéine PORA chez la plante adulte.

Les rôles attribués à la protéine PORA *in planta* ont été déduits à partir d'approches indirectes. Dans une situation où la skotomorphogénèse est bloquée par une mutation dans le gène *COPI*, la transcription de *PORA* s'arrête dans les cotylédons, les corps prolamellaires disparaissent et la plantule mutante est extrêmement photosensible. Cependant cet effet ne peut être attribuée à la seule absence de la protéine PORA, car la transcription de *PORB* diminue très fortement elle aussi, sans s'annuler complètement (Lebedev *et al.*, 1995). Il en va de même lorsque l'action du phytochrome A est stimulée dans des plantules sauvages par l'éclairement au rouge lointain (Barnes *et al.*, 1996). On sait par ailleurs que les doubles mutants *porB porC* ayant germé à la lumière montrent un blocage complet de l'activité photosynthétique. Ceci indique que la protéine PORA, dont l'expression initiale faible n'est pas accrue par l'absence de *PORB* et *PORC*, n'est pas suffisante pour alimenter la biosynthèse de la chlorophylle dans les feuilles post-embryonnaires (Frick *et al.*, 2003). Ainsi, afin d'obtenir une réponse plus claire sur le rôle de la protéine PORA à l'obscurité, et éventuellement à la lumière, nous avons choisi de caractériser des mutants d'insertion dans le gène *PORA*, ainsi qu'un double mutant *porA porB*.

Une première lignée présentant une insertion dans le promoteur du gène *PORA* (*porA-Salk*) s'est avérée ne pas être un allèle perte-de-fonction, mais au contraire un mutant 'gain d'expression'. L'insertion située dans la région promotrice du gène *PORA* est associée à une transcription qui demeure très forte dans les cotylédons illuminés. Cependant, aucune sur-accumulation de la protéine PORA n'est détectée. Cette différence entre transcrite et protéine mature peut s'expliquer par le fait que l'import du précurseur PORA est Pchl_{ide}-dépendant dans les cotylédons (Kim and Apel, 2004). La quantité de Pchl_{ide} à la lumière est donc limitante, et le précurseur PORA en excès pourrait être détruit dans le cytoplasme. Une explication similaire a été proposée pour expliquer la non-détection d'une protéine de fusion PORA-GFP dans les cotylédons illuminés (Kim and Apel, 2004). Des études complémentaires pourront déterminer si la surexpression du gène amène la présence de la protéine PORA dans les plastes de la plante adulte, dans lequel l'import du précurseur de PORA paraît régulé différemment (Kim and Apel, 2004), et permettront peut-être de faire un lien avec le phénotype de forte croissance détecté. A ce stade cependant, cette lignée ne nous apporte pas d'information quant au rôle de PORA *in planta*. Il est également clair que la lignée *WisLox* ne fournira pas d'élément quand à ce rôle puisque nous avons montré que,

contrairement aux données fournies initialement, l'insertion se trouve en dehors de la région transcrite.

Une troisième lignée d'insertion a été étudiée, *porA-Ds*. L'allèle *porA* de cette lignée est un allèle nul. Aucune protéine PORA n'est détectée dans les plantules homozygotes de cette lignée. Cette lignée présente un phénotype inattendu, avec une réduction de taille spectaculaire et une coloration vert pâle des plantes adultes. Un tel phénotype est déjà surprenant en regard du profil d'expression ténu du gène *PORA* dans les rosettes adultes des écotypes sauvages. Il l'est d'autant plus quand on sait que les simples mutants *porB* ou *porC*, qui éliminent l'une ou l'autre des protéines POR majeures des rosettes, ne présentent ni retard de croissance ni même une diminution de la concentration en pigments chlorophylliens (Frick *et al.*, 2003; Masuda *et al.*, 2003). L'interruption du gène *PORA* par l'élément Ds est-il la cause du phénotype observé? Il est permis d'en douter. Une liaison génétique forte, de moins de 1cM, est observée entre l'insertion *porA-Ds* et le phénotype nain. Par ailleurs un remaniement génétique complexe dans cette lignée ne peut être exclu, puisque celle-ci contient au moins une autre insertion supplémentaire à celle prévue par la transposition d'un élément Ds simple et unique vers le locus *PORA*. L'une ou l'autre de ces insertions pourrait être responsable du phénotype observé.

Pour essayer d'écarter cette éventualité, nous avons cherché à compléter la lignée *porA-Ds* avec la séquence codante complète du gène *PORA* sous contrôle du promoteur 35S. L'introduction de ce transgène n'a pas supprimé l'apparition de plantes naines dans la descendance de plantes *porA-Ds* hétérozygotes, ce qui indique une absence de complémentation. Les individus nains *porA-Ds* (-/-) porteurs de l'insertion 35Sp*PORA* ont été identifiés par génotypage, et le dosage de leurs pigments a révélé le maintien de la déficience pigmentaire originale. Aucun des deux traits observés chez les individus homozygotes de la lignée *porA-Ds* n'est donc restauré par le transgène 35Sp*PORA*. Nous avons voulu savoir si les transformants 35Sp*PORA* surexprimaient effectivement la protéine PORA, mais le Western-blot réalisé n'a pas été concluant. Cependant, une quantité excédentaire de protéine mature PORA dans les étioplastes peut être limitée par la quantité de Pchl_{id} disponible pour son import. Paradoxalement, ce Western blot a toutefois identifié plusieurs transformants 35Sp*PORA* pour lesquels les protéines PORA et PORB sont en quantité remarquablement inférieures que chez l'équivalent sauvage. Il est vraisemblable que cette extinction relative soit la conséquence d'une suppression épigénétique, et il serait intéressant de voir si cette suppression conduit à un phénotype nain après élimination de l'allèle *porA-Ds*.

Pour l'instant, et pour revenir à la question initiale, il reste toutefois impossible de conclure sur le lien causal entre l'inactivation du locus *PORA* et l'apparition du phénotype nain et de la déficience en chlorophylle observés dans la lignée *porA-Ds*.

Malgré cela nous avons tout de même réalisé des études complémentaires dans le but de pouvoir potentiellement expliquer l'un et/ou l'autre des phénotypes observés chez cette lignée. Un dosage par HPLC nous montre la présence de zéaxanthine chez les individus *porA-Ds*, indicateur d'un stress lumineux. D'autre part, nous avons pu déterminer que l'efficacité du PSII est diminuée de 20 % chez ces mêmes individus. Ces deux éléments nous indiquent que le fonctionnement de la chaîne photosynthétique est altérée chez la lignée *porA-Ds*, au point que les plantes ne sont viables que sur milieu supplémenté en sucre.

D'une manière générale, l'ensemble des caractéristiques de la lignée *porA-Ds* (réduction de taille, déficience en pigments, accumulation de zéaxanthine et diminution de l'efficacité du PSII) sont difficiles à mettre en lien avec le rôle de PORA. En effet, cette lignée possède les isoformes PORB et PORC pour assurer la réduction de Pchl_a et ainsi la synthèse de chlorophylle. Lorsque ces deux isoformes sont absents (double mutant *porb porc* (Frick *et al.*, 2003)), la plante développe rapidement un phénotype *xhanta* et finit pas mourir. Ceci suggère que la protéine PORA n'aurait soit vraisemblablement pas de rôle catalytique chez la plante à la lumière, soit une activité quantitativement insuffisante. D'autre part, les isoformes POR possèdent certes la même activité enzymatique, mais l'existence d'une voie d'import Pchl_a-dépendante spécifique à la protéine PORA lui confère une particularité par rapport aux protéines PORB et PORC. Cependant, ce type d'import n'existe qu'au niveau des premiers stades de développement (cotylédon), l'import de PORA étant constitutif dans les feuilles (Kim and Apel, 2004). Cette particularité n'est donc pas suffisante à elle seule pour expliquer le phénotype des plantes de la lignée *porA-Ds*.

Le lien entre le phénotype nain et/ou la coloration vert pâle observés, et l'absence de la protéine PORA est donc difficile à établir. L'hypothèse selon laquelle l'insertion supplémentaire présente dans la lignée *porA-Ds* soit responsable de ce phénotype est largement envisageable. Il est également possible que la combinaison des multiples insertions dans le génome de cette lignée puisse avoir des effets sur le développement de la plante bien supérieurs à ceux de chaque mutation prise indépendamment. Il est donc malheureusement difficile d'interpréter le rôle potentiel de PORA dans la plante adulte.

Cependant l'étude de cette lignée, ainsi que celle du mutant *porB-Salk* et du double mutant *porA porB* lors de la skotomorphogenèse, du dé-étiolement et de la germination à la lumière, nous a permis de discuter de l'implication de la protéine PORA dans ces processus avec la question récurrente de la limite de la redondance fonctionnelle entre les différents isoformes POR.

▪ **Formation des corps prolamellaires : PORA et PORB, deux protéines pour un même rôle ?**

L'étude de l'expression des gènes *POR* au cours de la skotomorphogenèse (voir § 1.1 du Chapitre I) nous montre que les protéines PORA et PORB sont toutes les deux fortement exprimées, avec cependant une prépondérance de protéine PORB. Cette accumulation de protéines POR tout au long de la skotomorphogenèse ne reflète pas celle des transcrits dont le maximum d'expression se limite au troisième jour. Ceci suggère une stabilisation des protéines POR qui, dans les faits, correspond à la formation des corps prolamellaires dans les étioplastes des plantules étiolées.

L'observation des coupes ultrafines de cotylédons étiolés de plantes *porA-Ds* montrent une réduction des corps prolamellaires (voir §1 du Chapitre III), le même constat étant fait chez les mutants *porB* (Frick *et al.*, 2003; Masuda *et al.*, 2003). Ces observations nous indiquent que la présence de l'une des deux isoformes, PORA ou PORB, est suffisante pour la formation de corps prolamellaires. Une réduction de taille en relation avec la quantité globale de protéines POR est observée. La fonction des protéines PORA et PORB est donc redondante dans l'établissement des corps prolamellaires.

L'absence des protéines PORA ou PORB qui conduit à la réduction de la taille des corps prolamellaires, n'induit pas de stress photo-oxydatif létal lorsque les plantules étiolées sont transférées sous lumière forte. De plus ni la synthèse du pool initial de chlorophylle ni le développement des plantules lors du dé-étiolement ne s'en trouvent affectés, ce qui n'est pas le cas lorsque les deux isoformes sont absentes. L'existence d'un stress photo-oxydatif létal chez le double mutant *porA porB* confirme le rôle redondant de ces deux isoformes dans l'établissement des corps prolamellaires.

L'absence de l'une de ces deux protéines n'étant pas compensée par l'expression de l'autre, la quantité de Pchl_a libre devrait s'en trouver augmentée, multipliant les risques de stress photo-oxydatif en sortie d'étiolement. Bien que les individus *porA-Ds* et *porB-Salk*

soient capables de se développer à long terme en sortie d'étiollement sous lumière forte, il est intéressant de noter que la lignée *porA-Ds* qui ne possède non seulement pas de protéine PORA mais également moins de protéine PORB, présente quant à elle un léger stress photo-oxydatif. Il se pourrait donc que la quantité de Pchl_{id} libre soit régulée en fonction de la quantité totale de protéines POR, mais qu'en dessous d'un seuil minimal de protéine POR présente, cette régulation ne soit plus possible ce qui aboutit à la présence de Pchl_{id} libre.

Cette observation va dans le sens de travaux publiés impliquant des lignées surexpresses ou antisens de *PORA* ou de *PORB* (Franck *et al.*, 2000). En effet, la modification de la quantité de protéine PORA ou PORB indifféremment est corrélée avec une modification de l'accumulation de Pchl_{id} totale, et en particulier de Pchl_{id} photoreductible F655 (forme majoritaire se trouvant dans les complexes ternaires). Un modèle de régulation basé sur une interaction entre la protéine FLU (qui agit sur la GluTR de la voie de biosynthèse des tétrapyrroles) et les protéines POR a été proposé (Kim and Apel, 2004). Dans le but de tester ce modèle, des expériences de double hybride sont actuellement en cours au laboratoire.

▪ **La protéine PORA a-t-elle un rôle photoprotecteur que n'a pas PORB?**

Bien que les protéines PORA et PORB jouent un rôle redondant dans la formation des corps prolamellaires, deux observations nous suggèrent que PORA pourrait jouer un rôle photoprotecteur supplémentaire.

D'une part, nous avons pu constater que les plantules étiolées de la lignée *porA-Ds* éprouvaient un léger stress photo-oxydatif partiel en lumière forte, absent chez le mutant *porB-Salk*. Cet effet pourrait également être attribué à la diminution de la quantité globale de protéines POR chez les individus *porA-Ds* à l'obscurité. Cependant, nous devons noter qu'une plante sauvage d'*Arabidopsis* possède une quantité supérieure de protéine PORB. De ce fait chez un mutant *porB*, la quantité de protéines POR totale s'en trouve également fortement diminuée. L'existence d'un seuil quantitatif de protéines POR totales n'est pas exclu.

D'autre part, malgré la présence de PORB et de PORC au cours de la germination à la lumière, une accumulation d'anthocyanes indicatrice d'un stress lumineux est visible chez la lignée *porA-Ds* dès le début de la germination. Le même constat est fait dans le cas de la germination du double mutant *porA porB* sans être aggravé. Ainsi l'absence combinée de PORA et de PORB n'augmente apparemment pas le stress observé en cas d'absence de PORA seule, conférant potentiellement un rôle particulier à PORA lors de la germination. Il est intéressant de noter que le double mutant *porB porC* ne présente apparemment pas de

phénotype particulier à la germination si l'on en croit l'article concerné (Frick *et al.*, 2003). Ce mutant ne présente un phénotype *chlorina* qu'au bout de 4 jours de développement, puis *xantha* à 5 jours .

L'ensemble de ces observations suggèrent un rôle potentiellement photoprotecteur propre à PORA, au sein des corps prolamellaires lors d'une transition à la lumière, mais également lors de la mise en place des structures photosynthétiques lors d'une germination à la lumière.

Bien que les deux protéines PORA et PORB aient une activité enzymatique similaire, il existe une différence majeure entre les deux isoformes : l'import de PORA dépend de la présence de Pchl_{id} alors que PORB est importé constitutivement.

Un import Pchl_{id}-dépendant permet à la fois de limiter la présence de Pchl_{id} libre photo-oxydable (Meskauskienė *et al.*, 2001) mais également de garantir l'activité de l'enzyme POR. En effet, à la lumière et en absence de Pchl_{id}, les protéines POR sont dégradées dans le stroma par une protéase (Reinbothe *et al.*, 1995b). L'effet de la protéase sur les deux protéines PORA et PORB a été démontré chez l'orge, cependant la quantité totale de protéine PORB dans le plaste est maintenue relativement constante par une transcription accrue (Holtorf *et al.*, 1995), ce qui n'est pas le cas de PORA dont la transcription du gène est également régulée négativement par la lumière. L'import de la protéine PORA sous forme d'un complexe avec son substrat permettrait à la fois de limiter la présence de Pchl_{id} libre, son import étant ajusté à la quantité de Pchl_{id} libre excédentaire, mais garantirait son activité enzymatique au moment de la mise en place des structures photosynthétiques à la lumière.

Une fois que les protéines POR ont réduit la Pchl_{id}, elles redeviennent sensibles à la protéase, permettant ainsi de libérer la Chl_{id} synthétisée. Dans le cas de PORA, le très faible taux de transcrits présent à la lumière au-delà de trois jours ne laisse pas présager d'un *turnover* de la protéine suffisant pour garantir une activité enzymatique à long terme. L'activité enzymatique de la protéine PORA au delà des premiers jours de développement à la lumière est donc mise en doute. Le phénotype *xantha* développé par le double mutant *porB porC* au bout 4 jours semble aller dans ce sens (Frick *et al.*, 2003). Il semblerait donc que le rôle de PORA soit double au début du développement, avec un rôle photoprotecteur par l'intermédiaire de son import Pchl_{id}-dépendant, mais également un rôle catalytique optimisant la mise en place des structures photosynthétiques, aux côtés de PORB et PORC.

L'activité enzymatique de PORA à la lumière au-delà des premiers jours de développement ne semble pas être maintenue. Cependant la protéine reste détectable tout au long du développement de la plante, et ce malgré un transcrit pratiquement indétectable à la lumière. Une autre observation attire également notre attention. La quantité de protéine PORB à l'obscurité se trouve fortement diminuée chez la lignée *porA-Ds*. Il semblerait donc qu'il y ait une co-régulation de l'expression des deux isoformes.

Ce type de régulation a déjà été observé pour la famille multigénique des protéines FtsH (Sakamoto *et al.*, 2003). Dans ce cas, les deux protéines forment un hétérocomplexe. Si l'une des deux est absente, la stabilité de l'autre est remise en cause. Une activité minimale de la protéine restante est tout de même conservée par la formation d'homocomplexes, cependant le développement de la plante s'en trouve tout de même affecté.

Le parallélisme de nos observations avec celles de Sakamoto et coll. nous laisse donc envisager l'existence d'un complexe PORA/PORB chez *Arabidopsis*.

Un complexe PORA/PORB, nommé LHPP, a été précédemment identifié chez l'orge à l'obscurité (Reinbothe *et al.*, 1999). Cependant il ne semblerait pas que le modèle sur lequel est basé le LHPP puisse être directement transposable à *Arabidopsis*. Tout d'abord, comme nous l'avons vu au cours de l'introduction, bien que présentant de fortes homologues de séquence, les isoformes PORA/PORB d'orge et d'*Arabidopsis* ne sont pas orthologues. Leur dénomination commune A et B étant liée à la similarité de leur profil d'expression avec les phytochromes A et B (Armstrong *et al.*, 1995). D'autre part, le modèle du LHPP est basé sur une stœchiométrie PORA/PORB de 5 : 1 à l'obscurité, conférant un rôle d'antenne photoprotectrice à PORA compte-tenu de son affinité pour la Pchl*ide b*. Dans le cas d'*Arabidopsis*, une proportion différentes de protéines PORA/PORB est rapportée, avec une accumulation largement majoritaire de PORB par rapport à PORA. De plus, les affinités de chacune des protéines POR d'*Arabidopsis* pour l'une ou l'autre des formes de Pchl*ide* n'ont pas été établies à ce jour.

Il reste cependant de nombreuses expériences à réaliser pour apporter des éléments à cette hypothèse. Des expériences en double hybride, de co-immunoprécipitation (nécessitant des anticorps spécifique à PORA et à PORB, de préférence d'*Arabidopsis*) mais également des dosages spectroscopiques nous permettront de valider ou non l'existence d'un complexe PORA/PORB chez *Arabidopsis*. Si l'existence de ce complexe PORA/PORB est confirmée chez *Arabidopsis*, des expérimentations supplémentaires pourront permettre d'établir des rapprochements avec le complexe LHPP.

MATERIELS ET METHODES

MATERIELS ET METHODES

1. Souches bactériennes, plasmides et techniques de clonage

1.1 Génotype, milieux et conditions de culture

- ✓ Deux souches bactériennes ont été utilisées : *Escherichia coli* DH5 α , pour le clonage et *Agrobacterium tumefaciens* GV3121 pour la transformation stable d'*Arabidopsis thaliana*.
- ✓ La transformation s'effectue par électroporation (Gene Pulser™ de Biorad – Résistance 200 Ohms – 2,5 kV - Capacitance 25 μ Fd) selon les recommandations du fournisseur.
- ✓ Les bactéries transformées sont cultivées avec du LB (Lubria Bertani Broth, Sigma), en milieu liquide sous agitation (180 rpm minimum) ou sur milieu solide (LB + 1,5 % agar) pendant 12h à 37°C pour *E.coli* ou 48h à 28°C pour *A.tumefaciens*. Pour la sélection des bactéries transformées, le milieu de culture est supplémenté par un ou plusieurs antibiotiques selon le vecteur utilisé, aux concentrations usuelles suivantes :

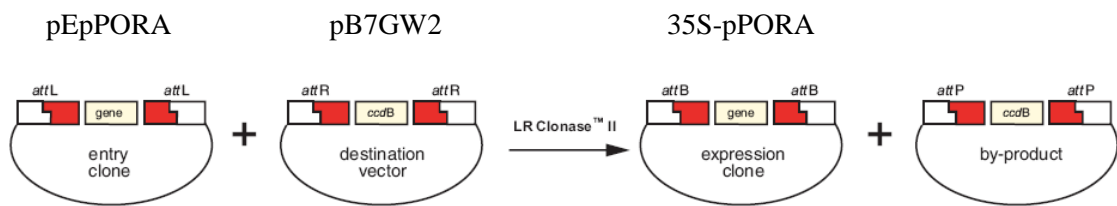
Souche	Antibiotique	Concentration finale
<i>E.coli</i> DH5 α	Spectinomycine	100 μ g/mL
<i>A.tumefaciens</i> GV3121	Rifampycine	50 μ g/mL
	Gentamycine	25 μ g/mL
	Spectinomycine	100 μ g/mL

1.2 Constructions plasmidiques et techniques de clonage

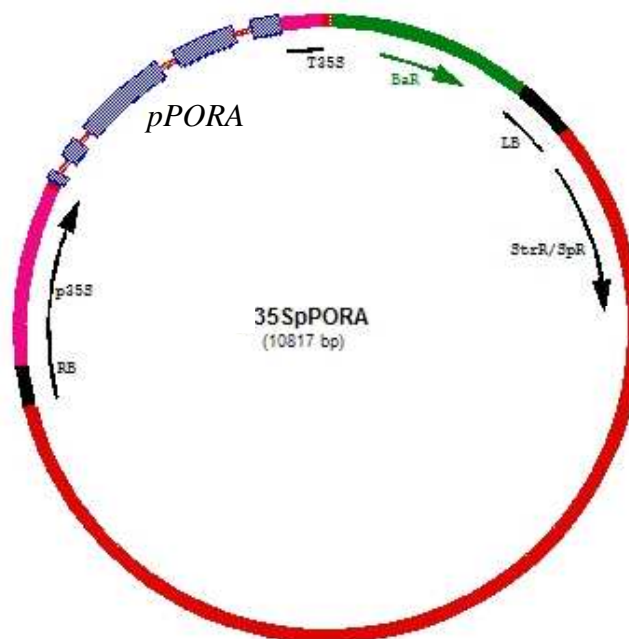
Une seule construction a été réalisée au cours de mes travaux. Il s'agit du clone 35S-pPORA utilisé pour la complémentation du mutant *porA-Ds*.

Le vecteur de transformation 35S-pPORA a été obtenu en utilisant le système de clonage Gateway (Invitrogen). Un vecteur d'entrée pEpPORA (construit par Jean-Marc Bonneville), contenant la séquence codante complète de *PORA* d'*Arabidopsis thaliana* a été recombiné par

réaction LR avec le vecteur de destination pB7GW2 (Karimi *et al.*, 2002 ; <http://www.psb.ugent.be/gateway>) selon le protocole préconisé par Invitrogen.



Le vecteur recombinant obtenu, appelé vecteur d'expression, consiste en un vecteur binaire portant la résistance à la spectinomycine, dont le T-DNA comporte la séquence codante de *PORA* (*pPORA*) sous contrôle du promoteur et du terminateur 35S et le gène *BaR* qui confère la résistance au glufosinate d'ammonium.



Deux microlitres de la réaction LR ont servi à transformer par électroporation la souche DH5 α , sélectionnée sur spectinomycine. Le vecteur d'expression a été récupéré par minipréparation selon la technique de lyse alcaline (Sambrook and Russell, 2001) puis le profil de digestion par des enzymes de restriction a été vérifié. La jonction promoteur - phase codante de *PORA* a été contrôlée par séquençage à partir d'une amorce dans le promoteur 35S (plateforme de séquençage gérée par Jean-Pierre Alcaraz). Il est ensuite introduit chez

A. tumefaciens par électroporation, amplifié et vérifié par PCR. Une colonie est sélectionnée et cultivée pour transformer par « Floral Dip » les inflorescences du mutant à compléter (Clough and Bent, 1998) (cf. § 3.2.a du Matériels et Méthodes).

2. Matériel végétal et conditions de culture

2.1 Ecotypes et allèles mutants

L'ensemble des lignées utilisées sont indiquées ci-dessous:

Lignées	Ecotype	Provenance
<i>porA-Salk</i> SALK_036137	Columbia	Salk Institute
<i>porA-Ds</i> SGT4757_5_3	Landsberg	Cold Spring Harbor
<i>porA-WiscLox</i> WiscDsLox485-488A6	Columbia	University of Wisconsin
<i>porB-Salk</i> SALK_043887	Columbia	Salk Institute

La position de l'insertion pour chacune de ces lignées est visualisable sur le site du T-DNA Express (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>) et leur achat peut se faire notamment *via* le site TAIR (<http://www.arabidopsis.org/>).

2.2 Culture en terre

La culture en terre de plantes se fait sur du terreau (Motte-Domaine) préalablement imbibé d'eau, autoclavé (20 min à 120°C) et traité au Trigard (larvicide des mouches mineuses). Les graines sont directement semées en terre sans stérilisation de surface préalable ; les plantes provenant de boîtes de culture y sont repiquées. Les pots sont ensuite recouverts d'un film en plastique pendant 7 à 10 jours afin de maintenir une atmosphère saturée en eau. L'arrosage s'effectue par subirrigation 2 fois/semaine. Les conditions de culture sont mentionnées § 2.4.

2.3 Culture *in vitro*

Toutes les manipulations de culture *in vitro* sont réalisées en conditions stériles sous une hotte à flux laminaire.

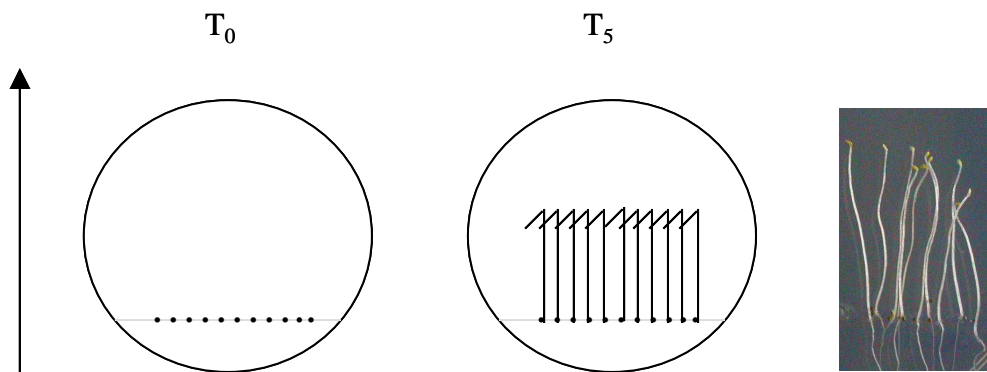
- ✓ Avant d'être semées *in vitro*, les graines sont stérilisées en surface par immersion dans une solution de chlore diluée au cinquième dans de l'éthanol absolu. La solution de chlore ou solution de stérilisation est réalisée par dissolution d'une pastille d'environ 1,5 g de chlore actif Javel Dose (Eau Ecarlate) dans 40 mL d'eau distillée. Après 8 min d'agitation, puis décantation, la solution de stérilisation est éliminée et les graines lavées 2 fois 5 min à l'éthanol absolu, puis séchées sous hotte pendant au moins 4 heures.
- ✓ Les graines stérilisées sont semées sur milieu MS gélosé stérilisé par autoclave (pour 1L : 4,3 g de sels MS (Sigma) ; 10 g de saccharose ; 0,5 g de MES ; pH 5,7 (KOH) ; 8 à 12 g d'Agar). Le cas échéant, ce milieu de culture contient un antibiotique pour la sélection de plantes transformées (sulfate de kanamycine (Sigma) à 50 µg/mL ; glufosinate-ammonium (Riedel-de Haën) à 5 µg/mL, sélection à la lumière ; hygromycine (Euromedex) à 20µg/mL, sélection à l'obscurité. Elles sont ensuite placées à l'obscurité à 4°C pendant 48 h avant d'être exposées à la lumière.

2.4 Conditions de culture

	Condition lumineuse	Intensité lumineuse	Température	Hygrométrie	Néons fluorescents utilisés
Culture en terre	jour long (16h/8h)	70 µE.m ⁻² .s ⁻¹	Jour : 23°C Nuit 21°C	60-70%	Blancs = MazdaFluor 36 W ; Horticoles = Osram Fluora 36 W
	jour continu	70 µE.m ⁻² .s ⁻¹	23°C	non contrôlée	Blancs = MazdaFluor 58 W
Culture <i>in vitro</i>	jour long (16h/8h)	70 µE.m ⁻² .s ⁻¹	23°C	non contrôlée	Blancs = MazdaFluor 58 W ; Horticoles = Osram Fluora 58 W
	jour continu	70 µE.m ⁻² .s ⁻¹	23°C	non contrôlée	Blancs = MazdaFluor 58 W
	jour continu	120 µE.m ⁻² .s ⁻¹	23°C	non contrôlée	Blancs = Philips 40 W

2.5 Test de photoblanchiment

Les graines sont semées sur du milieu MS 12g/L d'agar, alignées au bas de la boîte (schéma ci-dessous). Après un séjour de 48h à 4°C, les semis sont exposés 1h à la lumière (120 µE.m⁻².s⁻¹) pour stimuler la germination et sont mises à l'obscurité en position verticale pendant 5 jours. Les plantules étioilées, alignées les unes à côté des autres, sont alors exposées à l'horizontale sous une lumière assez forte (120 µE.m⁻².s⁻¹). Une photographie est prise au bout de 24h et de 48h d'exposition.



3. Manipulations génétiques des plantes

3.1 Fécondation croisée

La fécondation s'effectue manuellement sous la loupe binoculaire au moyen d'une pince. Seuls les bourgeons floraux encore fermés sont sélectionnés afin d'éviter tout risque d'autofécondation, les autres fleurs de la hampe sont coupées. Dans un premier temps, les étamines de la fleur sélectionnée sont éliminées (émasculation). Puis 48h après, cette fleur émasculée de la plante dite « femelle » est fécondée par le pollen provenant d'une fleur à maturité du parent mâle. Les croisements sont marqués à l'aide d'un fil et les graines F1 sont récoltées environ 15 jours après.

3.2 Transformation stable

a. Transformation par « floral dip »

Arabidopsis est transformé par immersion des inflorescences dans une culture d'*Agrobacterium* (*floral dip*) selon le protocole proposé par Clough et Bent, à raison d'environ 50 plantes par pot et 6 pots par construction (Clough and Bent, 1998).

b. Sélection des transformants

La sélection des transformants (génération T1) a été réalisée sur milieu MS à 8g/L d'agar contenant du Glufosinate-ammonium (Sigma) à 5µg/mL. Environ 1000 graines doivent être semées afin d'obtenir en moyenne 3 transformants exprimant le gène de résistance. Seule la

première paire de feuilles des individus résistants se développe. Les plantules résistantes sont alors transférées en terre.

4. Analyse des acides nucléiques

4.1 ADN

a. Extraction d'ADN génomique

Deux types d'extraction sont possible selon l'utilisation prévue :

- Extraction rapide (Tampon Edwards). Ce protocole est utilisé pour le génotypage par PCR.
- Extraction longue (Tampon CTAB). Ce protocole permet l'extraction de grandes quantités d'ADN et de bonne qualité, alors utilisable pour un Southern Blot.

Extraction rapide

Une feuille ou un morceau de feuille de 0,5 cm² est broyé en tube Eppendorf à l'aide d'une piston. Cinq cent microlitres de tampon Edwards (Tris-HCl 200mM pH7,5 ; NaCl 250mM ; EDTA 25mM ; SDS 0,5 %) sont ajoutés au broyat puis le tout est centrifugé 1 min à 13000rpm. Trois cent cinquante microlitres de surnageant sont mis à précipiter dans un nouveau tube en présence d'un volume d'isopropanol. Le contenu est mélangé par retournement trois à quatre fois puis laissé au repos à température ambiante pendant 4 min avant une centrifugation de 5 min à 13000rpm. Le culot est séché sous une hotte à température ambiante pendant une heure puis repris dans 20 µL d'eau désionisée. Un microlitre de la suspension d'ADN est directement utilisée pour le génotypage dans un volume réactionnel final de 20 µL.

Extraction longue

Environ 1 g de matériel végétal est broyé au mortier dans l'azote liquide puis traité par un tampon de lyse (CTAB 2 % ; NaCl 1,4M ; 2-mercaptoéthanol 0,2 % ; EDTA 20mM ; Tris-HCl 100mM ; PVP-40 1 % ; pH 8) selon le protocole proposé par (Doyle and Doyle, 1990). Le culot d'ADN génomique est repris dans 300 µL de Tris-HCl 10mM pH8. L'ADN est dilué et dosé au spectrophotomètre à 260 nm (Biophotometer, Eppendorf).

b. Southern Blot

▪ Digestion de l'ADN génomique

Pour chaque digestion, 10 µg d'ADN génomique sont repris dans un volume final de 100 µL contenant le tampon de digestion adéquat et de l'eau, le tout placé à 4°C pendant la nuit. Le lendemain, 5 unités d'enzyme sont ajoutées et le tube est incubé à 37°C pendant environ 2 heures. 5 unités d'enzyme sont rajoutées toutes les heures tout au long de la journée, puis 15 unités lors du dernier ajout pour une incubation sur la nuit. Un nouvel ajout de 5 unités est effectué le lendemain et la digestion est encore maintenue 3 à 4 heures.

L'ADN génomique digéré est alors purifié par une extraction au chloroforme et précipité depuis la phase aqueuse résultante par 1/10ème de volume d'acétate de sodium (3M pH 5,2) et 2 volumes d'éthanol absolu à -80°C pendant 1h. Après un lavage à l'éthanol 70 %, le culot d'ADN génomique est repris dans 50 µL de TE pH8 avant d'être dosé au spectrophotomètre à 260 nm (Biophotometer, Eppendorf).

L'équivalent de 10 µg d'ADN digéré sont séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose 0,8 % (p/v) sous une tension de 1V/cm. Le gel, coloré au bromure d'éthidium, est photographié avant d'être traité 10 min dans un bain de dépurination d'HCl 0,25N, puis deux fois 15 min dans des bains de dénaturation (NaOH 0.5N, NaCl 1.5M) et de neutralisation (Tris HCl 0.5M pH 7.5, NaCl 1.5M) avec un rinçage rapide à l'eau distillée entre chaque solution. L'ADN est transféré par capillarité sur une membrane de nylon (SensiBlot™ Plus Nylon membrane, Fermentas). Le transfert s'effectue sur la nuit en présence de tampon SSC 20X (Tris Sodium Citrate 300mM, NaCl 3M, pH 7) selon Sambrook et Russell (2001). Le lendemain, la membrane est rincée 5 min dans du SSC 10X puis incubée à 80°C pendant une demi heure pour fixer l'ADN génomique.

▪ Marquage radioactif de la sonde, purification et quantification

Marquage radioactif

Une sonde spécifique du gène à étudier est obtenue par PCR puis marquée radioactivement par random priming au ³²P-dCTP (Amersham) avec le kit de marquage « NeBlot Kit » d'après les recommandations du fournisseur (New England Biolabs).

Purification de la sonde

La sonde radioactive est purifiée sur colonne Sephadex G50 (Amersham-Biosciences) équilibrée avec du TE pH8. Avant dépôt sur la colonne, 10 µL de bleu dextran sont ajoutés

aux 50 µL de sonde pour faciliter la visualisation de la fraction d'ADN au cours de l'élution. L'élution est réalisée avec du tampon TE. La fraction contenant la sonde marquée est récupérée dans un tube Eppendorf.

Quantification

Deux microlitres de la sonde avant et après purification sont déposés sur des carrés de papier filtre indépendants. Chacun est ensuite placé dans un tube de quantification. La quantité de radioactivité est déterminée par l'intermédiaire d'un compteur à scintillation (Tri-Carb® 2900 TR, Perkin-Elmer). Le logiciel QuantaSmart™ permet la lecture des données, exprimées en cpm (coups par minute). La différence entre la quantification avant et après purification permet de déterminer l'efficacité du marquage.

▪ Hybridation et révélation

La membrane est insérée dans un tube à hybridation et mise à préhybrider pendant 1h à 65°C sous agitation avec du tampon d'hybridation préalablement chauffé à 65°C (NaHPO₄ 0,5 M pH 7,2 ; EDTA 1 mM ; SDS 7 % ; BSA 1 %). Juste avant de commencer l'hybridation, la sonde est dénaturée 5 min à 100°C puis placée sur la glace. L'équivalent 10⁶ cpm/mL de tampon est ajouté au tampon de préhybridation et la membrane est laissée à hybrider toute la nuit. Le lendemain, la membrane est lavée 2 fois 10 min à température ambiante dans un tampon de lavage (SSC 0,1X ; 0,1 % SDS). La membrane est ensuite entourée d'un film plastique, pour être exposée avec un film autoradiographique Kodak Biomax MS-1 à -80°C dans une cassette contenant deux écrans intensifieurs Kodak (Biomax MS intensifying screen). Le temps d'exposition varie de 2 à 15 jours. Le film est révélé en chambre noire placé dans un bain de révélation (révélateur KODAK, dilué au 1/5) jusqu'à apparition du signal, rincé, puis protégé par un bain dans du fixateur (Fixateur KODAK, dilué au 1/5). Le film est finalement rincé et séché.

4.2 ARN

a. Extraction des ARN totaux d'*Arabidopsis thaliana*

Le matériel végétal est préalablement broyé au mortier dans l'azote liquide. Environ 500 µL de poudre sont traités par du tampon d'extraction comme indiqué dans (Martinez-Zapater

and Salinas, 1998). Le culot d'ARN est repris dans 20 μL d' H_2O -DEPC (H_2O préalablement traitée au DEPC à raison de 1 pour 1000, puis autoclavée pour détruire le DEPC).

b. Traitement à la DNase I

L'ARN extrait contient souvent de l'ADN contaminant. Ce dernier est éliminé par deux traitements successifs à la DNase I (Euromedex), selon les recommandations du fournisseur, à raison de 2U/ μg d'ARN. L'enzyme est ensuite éliminée par une extraction au phénol/chloroforme (1 :1, v/v) auquel est ajouté 0,1 volume de TNE 10X (Tris-HCL 200 mM pH 7,5, NaCl 1 M, EDTA 10 mM) pour précipiter les ARN. Après centrifugation, la phase aqueuse est récupérée et les ARN sont à nouveau précipités dans deux volumes d'éthanol absolu, 20 secondes dans l'azote liquide. Après sédimentation par centrifugation à 4°C pendant 20 min à 13000 rpm, les culots d'ARN sont rincés à l'éthanol 70 %, séchés et repris dans 15 μL d' H_2O -DEPC. Le dosage quantitatif des ARN se fait par spectrophotométrie (Biophotometer, Ependorf). Leur qualité est testée en déposant 300 ng d'ARN sur gel d'agarose 1 % (p/v).

L'absence d'ADN est vérifiée par PCR sur 300 ng d'ARN. Si une amplification est détectée, les ARN sont traités une troisième fois à la DNase I comme indiqué ci-dessus.

c. RT-PCR semi-quantitative

▪ Rétro-transcription (RT)

Un microgramme d'ARN totaux pour un volume final de 25 μL par réaction est utilisé, en présence d'oligo-dT et de la reverse transcriptase « SuperScript II » (Invitrogen), selon les recommandations du fournisseur.

▪ PCR

Environ 1 ng d'ADN génomique ou 1 μL de RT (ou l'équivalent à 40 μg d'ARN) sont utilisés par réaction de PCR de 20 μL . Les PCR sont effectuées avec l'ADN polymérase « BioTaq » (Abcsys) selon les recommandations du fournisseur. Les concentrations finales utilisées sont les suivantes : dNTP 200 μM (Fermentas), amorces oligonucléotidiques 0,25 μM chacune et MgCl_2 2,5 mM. La température d'hybridation est généralement de 55°C (adaptée selon le T_m de l'oligonucléotide) et le nombre de cycles effectués peut varier de 20 à 40 (35 en général).

Un cycle PCR se compose classiquement de :

Dénaturation 95°C 5 min

35x $\left\{ \begin{array}{l} \text{Dénaturation } 95^{\circ}\text{C } 30\text{s} \\ \text{Hybridation } T_m \text{ } 30\text{s} \\ \text{Elongation } 72^{\circ}\text{C } 1 \text{ min (pour 1kb)} \end{array} \right.$

Élongation 72°C 5 min

Les produits PCR sont déposés sur un gel d'agarose (0,8 % à 1,2 % (p/v)) contenant du bromure d'éthidium (0,1 µg/mL de gel) et visualisés sous UV.

d. RT-PCR quantitative en temps réel

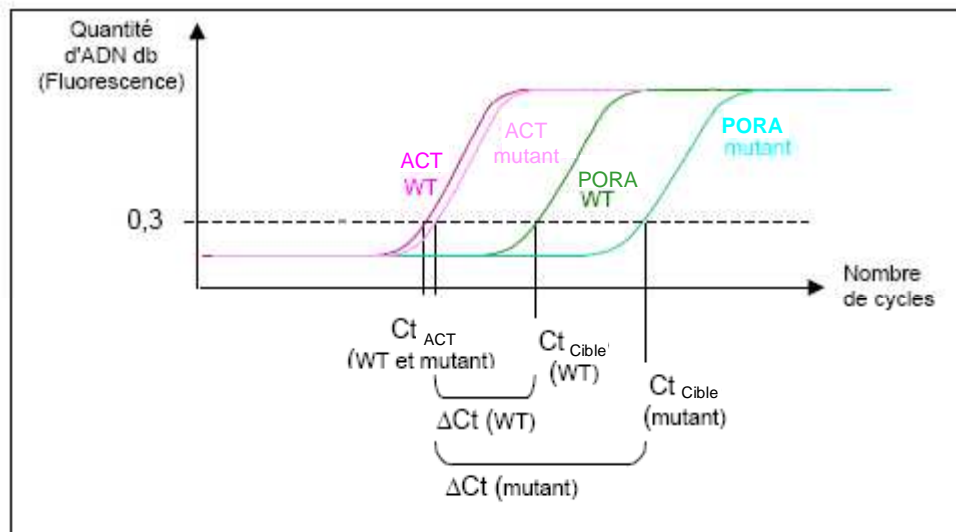
- Choix des oligonucléotides

Les oligonucléotides ont été dessinés à partir du logiciel Primer Express™ (Applied Biosystems) qui propose des couples d'amorces en fonction de paramètres optimisés pour l'appareil 5700 SDS, notamment une longueur d'amplicon de 50 à 150 pb. La concentration d'utilisation de ces amorces est de 3 µM. Les séquences des amorces utilisées sont indiquées en annexe.

- Réaction de PCR quantitative

Les ARN sont rétrotranscrits comme indiqué au § 4.2b. Une réaction de PCR semi-quantitative est préalablement réalisée sur un gène dont l'expression est constitutive (gène contrôle, on a utilisé celui codant pour l'actine d'*Arabidopsis thaliana*) afin de déterminer si la rétrotranscription a fonctionné et si les concentrations en ADNc sont homogènes entre chaque échantillon.

L'appareillage utilisé est le GenAmp® 5700 Sequence Detection System (5700 SDS, Applied biosystems). L'amplification d'un fragment par PCR suit un tracé exponentiel au fur et à mesure des cycles avant d'arriver à saturation. La PCR quantitative en temps réel permet de suivre ce tracé grâce à l'incorporation d'un marqueur moléculaire fluorescent, le SYBR green, se fixant sur l'ADN double brin. Ce fluorochrome est excité à 494 nm et réémet à 521 nm. L'amplification des produits de PCR est proportionnelle à l'intensité de la fluorescence, ce qui permet au final d'établir une courbe de la quantité d'ADN résultant de l'amplification en fonction du nombre de cycles de PCR (voir figure ci-dessous).



$$\Delta\Delta Ct \text{ mutant} = \Delta Ct \text{ mutant} - \Delta Ct \text{ wt}$$

$$\text{Quantité relative d'ARNm} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Le mix de PCRq est préparé comme suit. Le milieu réactionnel d'un volume de 25 μ L comprend : le couple d'oligonucléotides à 300 nM chacun, 10 à 100 ng d'ADNc et le «SYBR® Green PCR Master Mix» à une concentration 1x (Applied Biosystems). Le « MasterMix » contient l'ADN polymérase (AmpliTaq Gold®), les dNTPs (dont l'UTP), le SYBR Green et une référence passive (ROX®). Cette dernière est une molécule fluorescente aux propriétés d'excitation/émission proches de celles du SYBR green mais qui ne se fixe pas à l'ADN, elle sert ainsi à corriger les fluctuations de fluorescence liées aux différences de volume ou de concentration entre les divers échantillons. Le programme d'amplification comprend une première étape de dénaturation de l'ADN et d'activation de l'enzyme à 95 °C (*Hot Start*) pendant 10 min suivie de 40 cycles comprenant chacun 15 sec de dénaturation à 95 °C et 1 min d'hybridation/élongation à 60°C. Les plaques 96 puits utilisées ainsi que leurs bouchons sont spécialement conçus pour le système optique (Applied Biosystems). Chaque échantillon est testé trois fois indépendamment. L'analyse des résultats se fait sur la moyenne des trois valeurs.

- Analyse des résultats et quantification

La méthode utilisée est dite des $\Delta\Delta Ct$. A chaque courbe PCR est attribué un cycle seuil (Ct), cycle à partir duquel la fluorescence détectée augmente significativement par rapport à

un seuil préalablement défini (0,3). Pour chaque échantillon d'ADNc, la mesure de l'expression du gène d'intérêt du mutant (ΔCt mutant) est déduite de la comparaison de son Ct avec celui issu de l'amplification d'un gène contrôle d'expression constitutive, ici l'actine. Chaque échantillon (ΔCt mutant) est ensuite comparé à l'échantillon correspondant chez le sauvage (ΔCt sauvage). Ainsi chaque valeur de ΔCt mutant se voit retrancher celle du ΔCt de l'échantillon sauvage, c'est le $\Delta\Delta\text{Ct}$ ($\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}$ mutant - ΔCt sauvage). Ainsi la quantité d'ADNc chez le mutant est normalisée par rapport à un gène contrôle et à l'échantillon sauvage. Elle s'exprime par la valeur $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$. En effet, en raison d'une amplification optimale liée entre autre à la faible taille des amplicons, l'efficacité de PCR est proche de 1 à chaque cycle, doublant la quantité à chaque cycle de PCR.

Dans le cas d'une cinétique d'expression, les valeurs de ΔCt de chaque échantillon au temps X (T_x) sont comparés individuellement à celle de l'échantillon au temps T_0 ($\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct } T_x - \Delta\text{Ct } T_0$).

5. Analyse des protéines

5.1 Extraction des protéines

Une fois le matériel végétal broyé au mortier à l'azote liquide, 50 μL de poudre sont transférés dans un Eppendorf et maintenus 5 min à -20° . Puis 200 μL de SDG2X (Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8 ; glycérol 10 %, DTT 130mM ; SDS 2,5 %) y sont ajoutés. Ce tampon sert à la fois de tampon d'extraction et de tampon de charge.

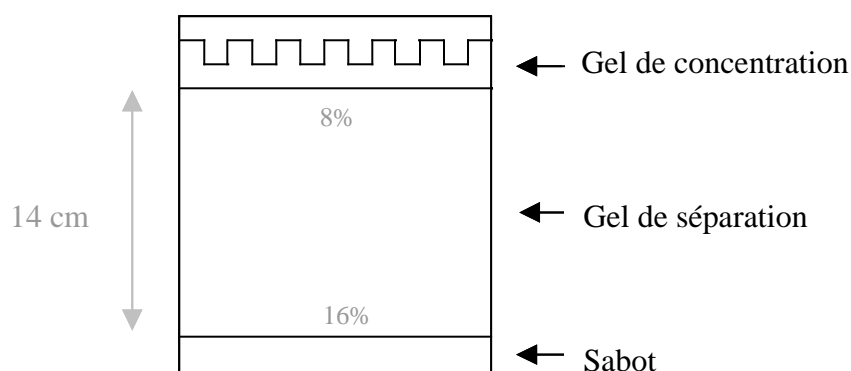
L'ensemble est dénaturé 5 min à 95°C puis centrifugé 5 min à 13000 rpm. Le surnageant est récupéré et dosé par coloration au bleu de Coomassie selon la méthode ESEN (Esen, 1978) avec pour référence une solution de BSA à 2mg/mL diluée dans du SDG2X.

5.2 Gel et électrophorèse

La séparation des protéines se fait par électrophorèse dénaturante sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE). La faible différence entre les masses moléculaires de PORA, PORB et PORC (37, 36 et 38 kDa respectivement) rendent nécessaire la réalisation d'un gel haute résolution en gradient d'acrylamide (monoAcrylamide/bisAcrylamide 30:1) entre 8 % et 16 %. De plus, on utilise le système Protean II xi (Biorad) qui permet une séparation sur un grand gel (14 cm), optimisant l'effet du gradient.

Le gel se compose de trois parties de bas en haut : le sabot, le gel de séparation et le gel de concentration comme indiqué sur le schéma ci dessous.

- Le sabot se compose d'une solution A, dite légère (Acrylamide 8 % (v/v) ; Tris-HCl 0,4 M pH 8,8; SDS 0,1 %). Pour la polymérisation, 35 μ L d'APS 10 % et 12,5 μ L de Temed sont ajoutés aux 5 mL de solution A.
- Le gel de séparation, en gradient 16 %-8 %, est coulé à l'aide d'un générateur de gradient (Biorad) et d'une pompe péristaltique (Minipuls3, Gilson) par dilution progressive à volume constant d'une solution B (10 mL) dense (Acrylamide 16 % (v/v) ; Tris-HCl 0,4 M pH 8,8; SDS 0,1 %, saccharose 10 %), par de la solution A (25 mL). A chaque solution ont été ajoutés de l'APS 10 % (25 μ L et 50 μ L pour les solutions B et A respectivement) et du Temed (6 μ L et 12 μ L) pour déclencher la polymérisation.
- Le gel de concentration se compose d'une solution à 7,2 % d'acrylamide (avec du Tris-HCl 240 mM pH 6,8 ; SDS 0,1 %) à laquelle ont été ajouté 30 μ L d'APS 10 % et 7,5 μ L de Temed.



Les protéines, auxquelles a été ajouté du bleu de charge, sont préalablement dénaturées pendant 5 min à 95°C puis centrifugées 5 min à 13000 rpm, avant d'être chargées sur gel. Six microlitres d'un marqueur de taille sont déposés dans un puits du gel (Page Ruler Prestained Protein Ladder Plus, Fermentas). La migration se fait à 4°C sur la nuit à raison de 10 mA/gel constant dans du tampon de migration (Tris-HCl 0,25 M pH 8,3 ; Glycine 1,92 M ; SDS 1 %). La migration est stoppée lorsque le front de migration se trouve au niveau du sabot.

5.3 Transfert sur membrane (Western-blot)

Un système de « sandwich » est réalisé à partir d'éponges et de papier Whatman préalablement imbibés dans du tampon de transfert (Tris 26 mM ; Glycine 190 mM ; SDS 0,04 % (p/v) ; Ethanol 20 % (v/v)). Le gel est placé au contact d'une membrane de nitrocellulose (TransBlot Transfer Medium 0,45 µm, Biorad) imbibée de tampon de transfert entre deux fois deux feuilles de papier wathman et deux éponges. Le transfert s'effectue dans une cuve remplie de tampon de transfert pendant 5h30 à ampérage constant (210 mA) en chambre froide (4°C).

Pour contrôler la qualité du transfert et l'homogénéité des quantités de protéines chargées, la membrane est colorée 10 min au Rouge Ponceau (0,5 % (p/v) Rouge Ponceau dans 1 % (v/v) acide acétique), puis décolorée à l'eau distillée jusqu'à distinguer nettement les protéines. Le rinçage se poursuit jusqu'à totale disparition de la coloration.

5.4 Révélation immunologique de la membrane

L'anticorps primaire anti-PORA d'orge utilisé dans l'ensemble de ces travaux est un anticorps polyclonal produit chez le lapin à partir de la protéine PORA d'Orge surproduite par *E.Coli*. Sous agitation constante et à température ambiante, la membrane est d'abord saturée pendant une heure dans du TBS-T (Tris 20 mM, NaCl 140 mM pH 7,4 , Tween 0,1 %) contenant du lait écrémé à 5 %. Puis elle est rincée quatre fois 10 min dans du TBS-T avant d'être incubée pendant une heure dans l'anticorps primaire (l'anticorps est dilué dans du TBS-T-Lait écrémé 5 % au 1/1500^{ème} pour l'IgG de lapin anti-PORA d'Orge). La membrane est de nouveau rincée quatre fois 10 min dans du TBS-T avant d'être incubée pendant une heure avec l'anticorps secondaire (Anticorps de chèvre anti-lapin couplé à la peroxydase de raifort : HRP (BioRad), dilué dans du TBS-T-Lait écrémé 5 % au 1/3000^{ème}). Quatre derniers rinçages de dix minutes sont réalisés avant une détection de type ECL.

L'anticorps secondaire est couplé à la peroxydase de Raifort (HRP). La réaction chimique consiste en l'oxydation du luminol par le peroxyde d'hydrogène, catalysé par la HRP, en condition alcaline. La membrane est incubée pendant une minute avec un mélange équivalent des deux substrats de la HRP (1 mL de réactif 1 + 1 mL de réactif 2, ECL Western Blotting reagents, Amersham-Biosciences). Puis elle est placée entre deux couches de film alimentaire et mise dans une cassette à rayons X. Le signal lumineux produit par cette

réaction de chimioluminescence est détectée par exposition d'un film autoradiographique (Kodak Biomax MR-1 ; cf. § 4.1b) avec des temps d'exposition allant de 1 à 15 min.

6. Dosage et analyse des pigments

6.1 Spectrophotométrie

Le matériel végétal récolté est pesé avant d'être broyé au piston (15 à 50 mg). 1 mL d'acétone 80 % sont ajoutés et l'extrait est centrifugé à 13000 rpm pendant 1 min. Le surnageant est récupéré et dosé au spectrophotomètre (Nicolet Evolution 100, Thermo) à trois longueurs d'onde différentes : 470 nm (caroténoïdes), 663 nm (Chl *a*) et 647 nm (Chl *b*). Les concentrations sont calculées à partir des formules suivantes (Lichtenthaler, 1987) :

$$\text{Chl } a : (12,25 A_{663} - 2,79 A_{645}) / \text{poids matériel en mg}$$

$$\text{Chl } b : (21,50 A_{645} - 5,10 A_{663}) / \text{poids matériel en mg}$$

$$\text{Car} : 5,05 A_{470} - (1,82 [\text{Chl } a] + 85,02 [\text{Chl } b]) / 198$$

La lecture de l'absorbance à 652 nm permet d'obtenir la concentration en chlorophylles totales (*a* et *b*) à partir de la formule suivante $\text{Chl} : (A_{652} / 36) / \text{poids matériel en mg}$

6.2 HPLC

a. Préparation des échantillons

Des feuilles d'*Arabidopsis* sont prélevées (dans le cas du mutant *porA-Ds* il s'agit de la plante entière), placées dans un Eppendorf 2 mL préalablement pesé et immédiatement plongées dans l'azote liquide. Le matériel est broyé dans l'Eppendorf et en présence d'azote liquide à l'aide d'un piston. Le tube contenant le matériel broyé est à nouveau pesé afin de déterminer la quantité de matériel végétal qu'il contient. Le contenu des tubes est ajusté de façon à ce que tous contiennent environ 20 mg de matériel frais. Les échantillons sont ensuite lyophilisés pendant 48h (-50°C, sous vide) puis de nouveau pesés pour s'assurer que la lyophilisation s'est bien déroulée (la masse du matériel lyophilisé doit représenter environ 10 % du poids frais). Les échantillons sont conservés à 4°C à l'abri de la lumière avant de procéder à l'extraction des pigments.

b. Extraction des pigments

Les échantillons lyophilisés sont incubés pendant 1h à l'obscurité et à 4°C dans du méthanol (Carlo Erba, qualité HPLC) contenant 5 mM de Tris pH 7,5, à raison de 400 µL/2 mg de masse lyophilisée. Deux centrifugations de 15 min à 13000 rpm avec récupération du surnageant permettent d'éliminer les débris. Les pigments contenus dans la phase méthanol sont séchés par un courant d'azote puis repris dans 100 µL de diméthyl formamide (DMF – Carlo Erba, qualité HPLC). Cinquante microlitres de l'échantillon à doser sont transférés dans un flacon spécialement conçu pour l'analyse par HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*).

c. Dosage et analyse des pigments

Les mesures par HPLC (Varian ProStar 240) ont été effectuées par Marcel Kuntz. La composition en pigments des échantillons est analysée sur colonne YMC-carotenoid C30. La phase mobile comprend de l'eau méthanol (20/80 (v/v)) en présence de 0,2 % d'acétate d'ammonium (A), de méthanol (B) et de tert-méthyl-butyl éther (C). L'élution se fait par un mélange de 5 % A – 95 % B pendant 10 min, puis de 5 % A – 80 % B – 15 % C en gradient linéaire jusqu'à 5 % A – 30 % B – 65 % C étalé sur 25 min. La rééquilibrage de la colonne se fait avec un mélange de 5 % A – 95 % B sur 25 min. Le flux est de 1 mL.min⁻¹ et la température de la colonne est maintenue à 30°C.

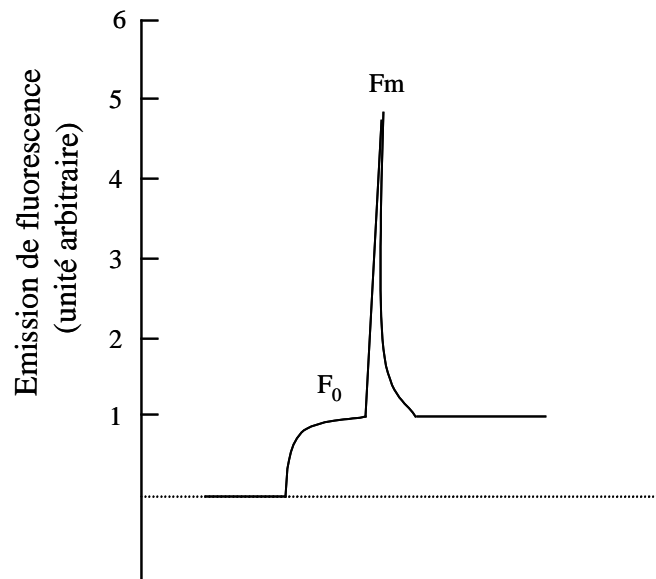
Les pigments sont identifiés à partir de leur temps de rétention et leur spectre dans le visible, par comparaison avec des standards (Logiciel PolyView 2000, Varian). Les valeurs utilisées pour les histogrammes correspondent à la surface des pics. Trois plantes différentes de chaque génotype ont été analysées par condition.

7. Mesure de fluorescence de la chlorophylle

L'efficacité photosynthétique du PSII est mesurée grâce à un Mini-Pam (Walz ; PAM pour *Pulse Amplitude Modulation*) qui permet de mesurer la fluorescence émise par les pigments chlorophylliens en réponse à des flashes de lumière saturante (2500 µE.m⁻².s⁻¹).

Avant la mesure, les feuilles sont incubées pendant 30min à l'obscurité, permettant au site Q_A du PSII d'être totalement réoxydé. Cet état correspond à la fluorescence minimale, notée Fo. Un flash de lumière de 0,8 s est appliqué et la fluorescence maximale est mesurée

(F_m). Le rapport $(F_m - F_0)/F_m$, également noté F_v/F_m , correspond au rendement quantique maximal.



8. Microscopie électronique

8.1 Fixation

Le matériel concerné correspond à des plantules au stade cotylédons, âgées de 5 jours, cultivées à l'obscurité continue. La condition « obscurité » doit être respectée jusqu'à fixation complète des échantillons par le glutaraldéhyde (travail sous une lampe « safe light »). Les étapes ultérieures peuvent se dérouler à la lumière. La fixation est réalisée dans des Eppendorf 1,5 mL, à raison de deux plantules par tube, dans un 1 mL de solution à chaque étape.

La fixation se fait sous vide et à 4°C en présence de glutaraldéhyde 2,5 % dilué dans du tampon phosphate (0,1 M pH 7,2). Le vide est maintenu jusqu'à ce que les échantillons ne soient plus à la surface du liquide (2 à 3h). Les échantillons sont ensuite soigneusement rincés 3 fois 15 min à 4°C dans du tampon phosphate avant d'être incubés sous la hotte pendant 2h à 4°C dans du tétroxyde d'osmium 1 % dilué dans du tampon phosphate. Les échantillons sont rincés 3 fois 15 min dans du tampon phosphate sous hotte aspirante, puis incubés 30 min à 20°C dans une solution d'acide tannique 1 % diluée dans du tampon phosphate. Les échantillons sont à nouveau rincés 3 fois 15 min dans du tampon phosphate à 4°C, et repris dans un volume final de 400 µL de tampon phosphate.

Les échantillons ont été envoyés par DHL à l'IPMC de l'INRA de Villenave d'Ornon, où ont été réalisés inclusion et observation. Les échantillons ont été entourés de pains de glace afin de les maintenir au frais le plus longtemps possible.

8.2 Inclusion et observation

Les échantillons ont été inclus dans de la résine Epon (Fluka) et observés avec un microscope électronique à transmission CM10 (FEI). Les images ont été acquises avec une caméra XR60 AMT (Advanced Microscopy Techniques, Danvers, MA, USA).

9. Analyse bio-informatique

L'analyse du promoteur du gène *PORA* a été réalisée à partir d'une base de données construite sur les motifs trouvés dans les éléments cis-régulateurs (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html>). Les données d'analyse de microarrays proviennent du site <https://www.genevestigator.ethz.ch>

ANNEXES

ANNEXE 1 :

Mutant d'insertion *porA-WiscLox*

1. Présentation du mutant *porA-WiscLox (porA-WL)*

La lignée *porA-WL* (WiscDsLox 485-488A6), produite par l'Université du Wisconsin, nous a été fournie par NASC (*The European Arabidopsis Stock Centre*, Nottingham, UK). Dans un fond génétique *Columbia*, la lignée a été vendue comme présentant une insertion dans le 5^{ème} et dernier exon, à 9 pb du codon Stop (Figure 1).

La structure du T-DNA WiscLox est complexe (Figure 1). Dans son ensemble, il s'agit d'un T-DNA contenant un promoteur 35S en son extrémité gauche. A l'intérieur se trouvent plusieurs éléments fonctionnels dérivés du système de transposition Ac/Ds du maïs d'une part, et du système de recombinaison Cre/Lox d'autre part (Medberry *et al.*, 1995). Ces éléments permettent à l'utilisateur de créer de nouveaux mutants, soit par insertion, *via* la transposition de l'élément Ds entre le site d'insertion initial du T-DNA et un locus génétiquement proche, soit par délétion, *via* la transposition de l'élément Ds puis élimination par recombinaison de la séquence située entre les deux sites LoxP. Les deux possibilités peuvent cibler un gène d'intérêt. Pour que ces événements aient lieu, il est nécessaire d'effectuer un croisement de la plante porteuse de l'insertion Wisc-Lox avec une lignée exprimant la transposase Ac (Système Ds) et/ou la recombinase Cre (Système Cre/Lox).

En ce qui nous concerne, nous avons utilisé ce mutant d'insertion comme une simple lignée où le gène *PORA* a été interrompu.

Le lot de graines reçu correspond à la troisième génération après transformation (T3) où les génotypes individuels sont à confirmer. Toutes les graines ont germé et se sont développées normalement comparativement à l'écotype sauvage semé en parallèle. Après quinze jours de croissance, les douze plantes ont été génotypées (voir § 4 de cette annexe). Aucune plante « homozygote » n'a été détectée à ce stade. Deux individus « hétérozygotes » (T3-6 et T3-12) ont donc été choisis pour produire la génération T4 sur laquelle a porté une partie des analyses (T4-6 et T4-12).

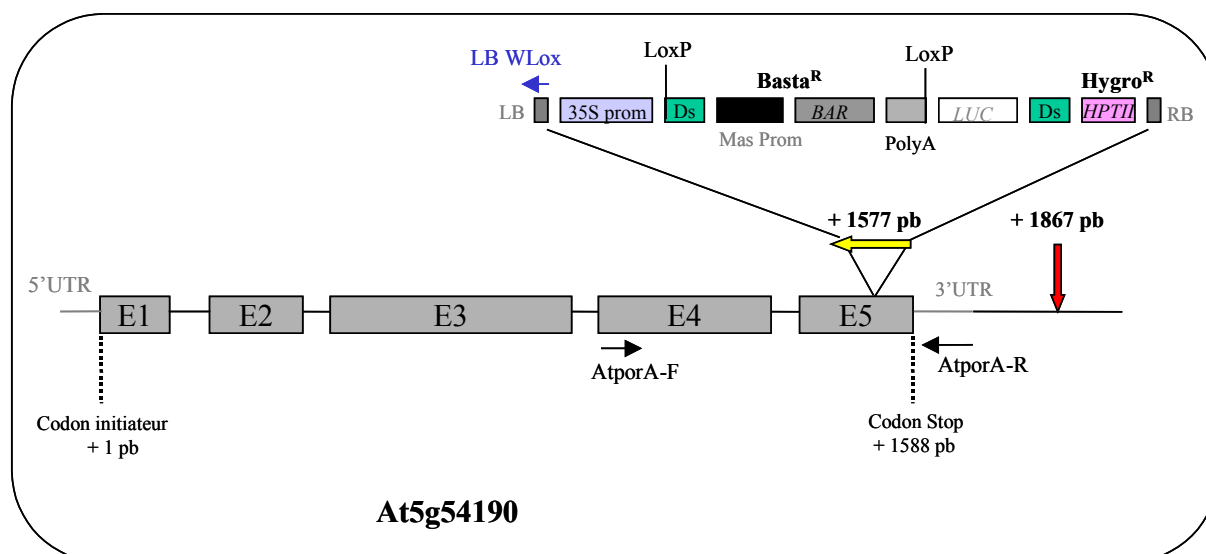


Figure 1 : Carte de l'insertion de T-DNA dans le gène *PORA* (At5g54190) chez le mutant *porA-WiscLox*

Les cinq exons du gène sont représentés par les rectangles grisés (E1 à E5). Le T-DNA est délimité par ses bordures gauche (LB : *Left Border*) et droite (RB : *Right Border*). La construction contient un gène de résistance au glufosinate d'ammonium ($Basta^R$) et la séquence codante du gène de l'hygromycine phosphotransférase II (*HPTII*) conférant la résistance à l'hygromycine. 35S prom : promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur. LoxP : séquences de 21 pb qui permettent l'élimination par recombinaison de la séquence interne en présence de la recombinase Cre. Ds : séquences répétées de 11 pb permettant la transposition de la séquence interne en présence de la transposase Ac. LUC : séquence codante de la luciférase. Les couples d'amorces utilisées pour le génotypage, symbolisées sur ce schéma par des flèches, sont AtporA-F/AtporA-R (allèle sauvage) et AtporA-F/LB-WLox (allèle mutant). La flèche rouge située à + 1867 pb indique la position réelle de l'insertion. La position à + 1577 pb était la position théorique mentionnée sur le site de référencement « T-DNA express ».

2. Tests de résistance au glufosinate d'ammonium et à l'hygromycine

2.1 Résistance au glufosinate d'ammonium

Une centaine de graines des familles T4-6 et T4-12 ont été semées sur MS 1% saccharose contenant du glufosinate d'ammonium à 5 µg/mL. Au bout de 8 à 10 jours de culture en jour long (16h/8h), la première paire de feuilles des plantes résistantes sort, *a contrario* des plantules sensibles qui restent bloquées au stade cotylédons.

Une ségrégation de type 3 : 1 est observée ($\frac{3}{4}$ de résistants : $\frac{1}{4}$ de sensibles) comme attendu dans le cas d'une insertion unique du gène de résistance (Figure 2).

	T4-6	%	T4-12	%
Sensibles	27	25,7	35	25,5
Résistants	78	74,3	102	74,5
Total	105	100	137	100

Figure 2 : Test de résistance au glufosinate d'ammonium (5µg/mL).

Les effectifs de plantes sensibles et résistantes au sein des familles T4-6 et T4-12 sont indiqués, correspondant à une ségrégation de type 3 : 1.

2.2 Résistance à l'hygromycine

Une soixantaine de graines des familles T4-6 et T4-12 ont été semées sur MS 1% saccharose contenant de l'hygromycine à 20µg/mL. La résistance à l'hygromycine est détectable sur des plantules étiolées de 5 jours. Les plantes sensibles présentent un hypocotyle court (Figure 3-A à gauche), tandis que celui des plantes résistantes est long (Figure 3-A à droite), équivalent à celui d'une plante sauvage sur milieu sans hygromycine.

Dans le cas de nos deux familles, on observe une ségrégation de type 3 : 1 ($\frac{3}{4}$ de résistants : $\frac{1}{4}$ de sensibles) (Figure 3-B). La lignée contient donc un gène actif de résistance à l'hygromycine qui ségrège comme un locus mendélien simple. L'existence de cette résistance était inattendue. En effet, le gène *HPTII* du T-DNA WiscLox n'a pas de promoteur propre (Figure 1), il devrait donc s'exprimer sous le contrôle du promoteur 35S que lorsque l'insertion Ds est excisée sous l'action de la transposase Ac, qui n'a pas été employée ici. Comme la résistance au glufosinate observée précédemment doit également être contrôlée par le promoteur 35S, cela suggère qu'il existe au moins une autre insertion T-DNA dans la lignée *porA-WLox*. Cette dernière doit être incomplète (ne confère pas de résistance au glufosinate) et/ou remaniée (confère une résistance inattendue à l'hygromycine). La proportion 3 : 1 observée indique *a priori* qu'une seule insertion incomplète et/ou remaniée confère la résistance à l'hygromycine.

Les familles T4-6 et T4-12 présentant un profil identique en terme de résistance au glufosinate d'ammonium et à l'hygromycine, seule la famille T4-6 est conservée pour la suite des analyses.

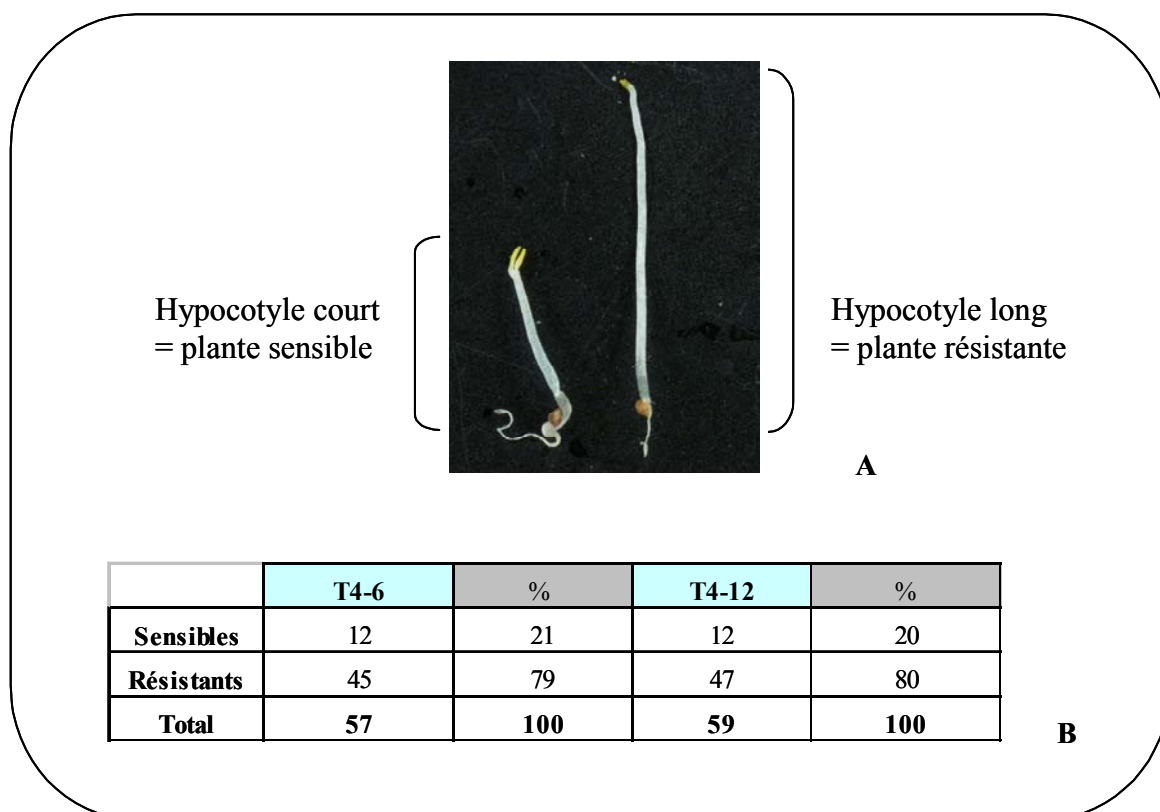


Figure 3 : Test de résistance à l'hygromycine (20µg/mL) sur les familles T4-6 et T4-12.

A. Phénotype des plantules sensibles et résistantes après 5 jours d'étiollement. **B.** Effectifs de plantes sensibles et résistantes au sein des familles T4-6 et T4-12, correspondant à une ségrégation de type 3:1.

3. Vérification du nombre d'insertion par Southern-blot

Afin de déterminer le nombre d'insertion de T-DNA dans la lignée *porA-WLox*, un Southern-blot a été réalisé sur un pool de plantes « hétérozygotes » de la génération T4. Deux enzymes de restriction ont été utilisées à savoir *NheI* et *EcoNI*. La sonde permettant de détecter la ou les insertions de T-DNA correspond à la séquence codante de *HPTII* (Figure 4-A).

Le profil de Southern-blot fait apparaître quatre fragments marqués quelle que soit l'enzyme utilisée. Parmi les fragments détectés, l'un d'entre eux correspond, par la taille, à l'insertion de T-DNA dans le gène *PORA* (indiqué par une étoile * dans la Figure 4-C). Les trois autres fragments indiquent la présence de trois insertions supplémentaires chez le mutant *porA-WLox*.

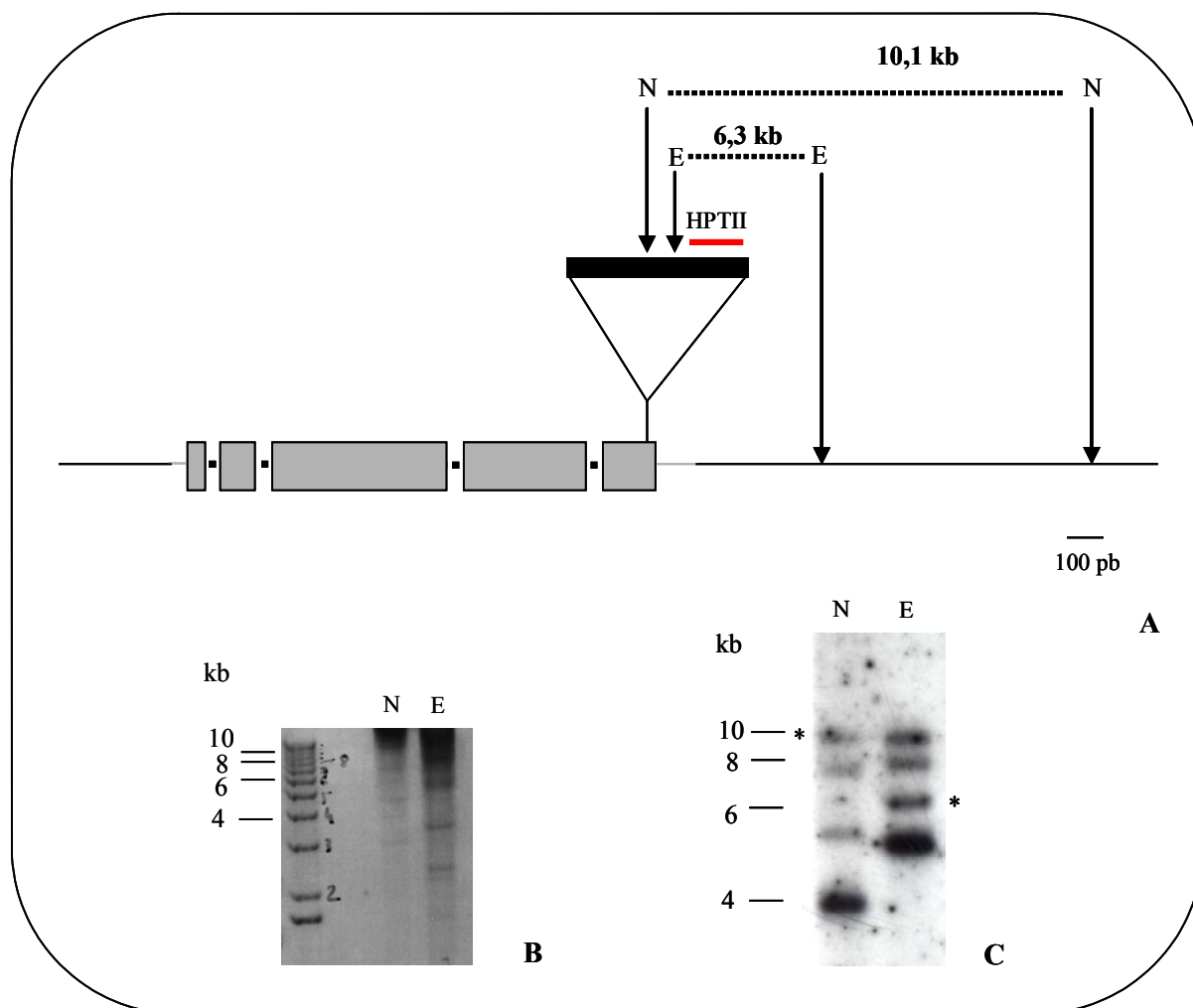


Figure 4 : Détermination du nombre d'insertions par Southern-blot dans la lignée *porA-WLox*.
A. Profil de digestion théorique. Les détails du gène *PORA* et du T-DNA se trouvent en Figure 1. Attention, l'insertion n'est pas à l'échelle. Deux enzymes ont été employées : [N] = *NheI* ; [E] = *EcoNI*. Entre deux sites de digestion est mentionnée la taille attendue (en kb) des fragments d'ADN génomique reconnus par la sonde. **B.** Profil de digestion visualisé sous UV après coloration du gel au BET. **C.** Profil par autoradiographie du Southern-blot après hybridation avec la sonde NPTII radiomarquée. * : fragment de taille attendu.

4. Analyse génétique

Une premier semis sur terre d'une trentaine de graines de la population T4-6 est placé en salle de culture en jour long. Après extraction rapide d'ADN génomique sur des plantes âgées de 15 jours, chaque individu est génotypé par PCR avec les combinaisons d'amorces suivantes (représentées par des flèches sur la Figure 1) : AtporA-F / AtporA-R pour l'allèle sauvage et AtporA-F / LB-WLox pour l'allèle mutant.

Sur la trentaine de plantes testées, aucun individu « homozygote » n'a été détecté. De plus toutes les plantes étaient « hétérozygotes » pour l'insertion. Un nouveau semis d'environ 70 graines a été génotypé à son tour et de la même façon, aucun individu « homozygote » n'a été identifié. Cette observation a également été faite sur la génération suivante (T5-6). Au final, sur les deux cent plantes génotypées, la quasi totalité des individus ont été classés « hétérozygotes » pour l'insertion avec seulement vingt-huit individus « sauvages » (Figure 5).

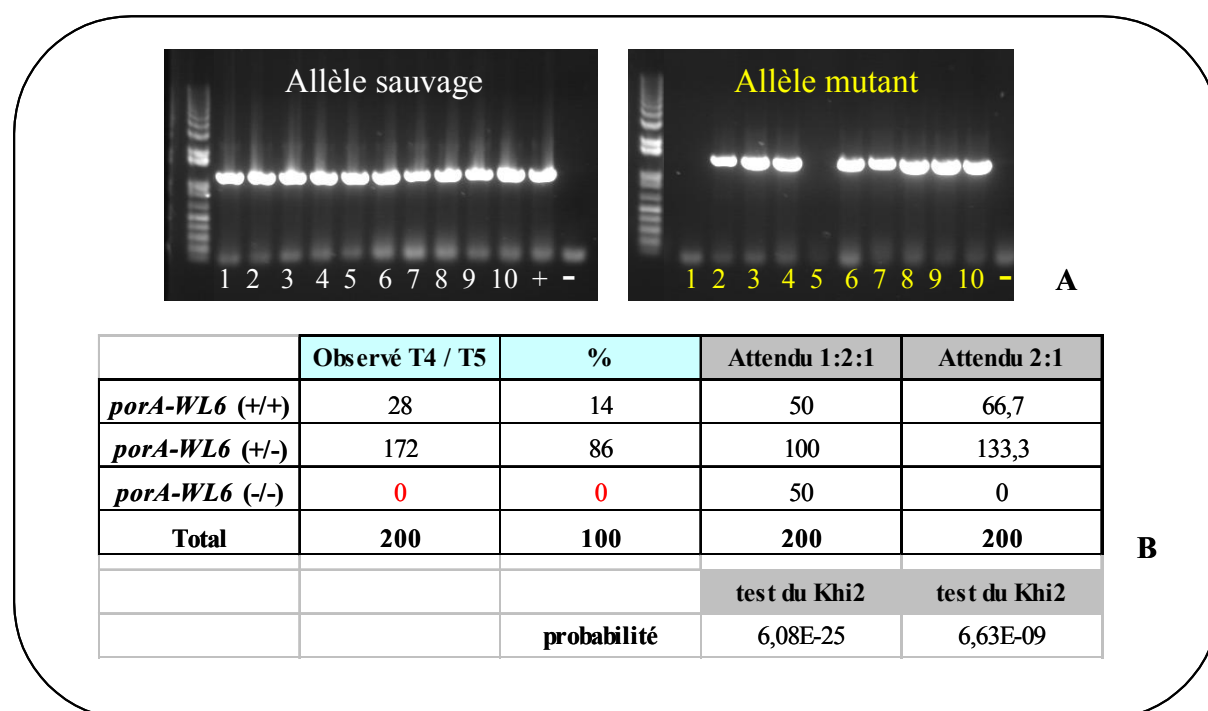


Figure 5 : Génotypage par PCR de la famille 6 sur les générations T4 et T5.

Les données sur les deux générations ont été regroupées dans le même tableau. **A.** Amplification par PCR des allèles sauvage et mutant chez quelques individus de la génération T4. **B.** Effectifs d'individus sauvages (+/+), hétérozygotes (+/-) et homozygotes (-/-) pour l'insertion, également exprimées en pourcentage. Les tests statistiques (tests de Khi2) nous permettent de rejeter aussi bien l'hypothèse d'une ségrégation 1 : 2 : 1 (ségrégation mendélienne) que celle d'une ségrégation 2 : 1 (si la présence de l'insertion à l'état homozygote engendrait la létalité) avec des probabilités d'erreur très faibles (respectivement de $6,08 \cdot 10^{-25}$ et de $6,63 \cdot 10^{-9}$).

Nous nous sommes alors demandé si nous étions en présence d'une mutation embryon létale, ce qui n'expliquerait toutefois pas la déficience en individus sauvages. Nous avons testé cette hypothèse en comparant le contenu de siliques du même âge de plantes hétérozygotes et sauvages pour l'insertion ainsi que de Columbia.

Des fleurs de plantes génotypées « hétérozygotes » ou « sauvages » pour l'insertion ainsi que de plantes Columbia, ont été marquées par un fil de couture au stade juste avant anthèse (plus ou moins un jour). Une dizaine de siliques de chaque génotype a été récoltée à 8 jours après fécondation puis ouverte sous la loupe binoculaire afin de comptabiliser les graines matures et celles qui ont avortées.

Un taux de 12 % d'avortement a été constaté au sein des siliques hétérozygotes du mutant *porA-WLox* comparativement aux siliques Columbia et celles « sauvages » pour l'insertion. Ce taux de moitié inférieur par rapport aux 25% attendus dans le cas d'un mutant embryonal fut une observation inattendue supplémentaire qui nous a conduit à ré-examiner la séquence d'insertion. Une nouvelle visite sur le site du « T-DNA express » fait état d'un site d'insertion du T-DNA différent par rapport à celui initialement annoncé. Le site d'insertion théorique ne se trouverait plus à 9 pb en amont du codon Stop mais à 279 pb en aval, dans la région intergénique. Nous avons confirmé ce positionnement par séquençage à partir de la bordure gauche de l'insertion. Le mutant *porA-WLox* n'est donc pas un mutant *porA*.

La position revisitée de l'insertion explique l'impossibilité apparente de détecter des homozygotes par PCR. En effet, l'amorce AtporA-R se situant de ce fait en amont de l'insertion, l'allèle sauvage est donc constamment amplifié. La faible proportion d'individus sauvages reste cependant inexplicée. La présence de trois autres insertions dans cette lignée est sans doute à relier à cette distorsion de ségrégation ainsi qu'à l'existence d'embryons abortifs.

La caractérisation de la lignée *Wisc-Lox* avait pour but de répondre en partie à la question du rôle de PORA *in vivo*. Cette lignée ne correspondant pas à un mutant *porA*, son étude a été interrompue.

ANNEXE 2 :

Liste des amorces PCR utilisées

Nom	Gène	Séquence	T° d'utilisation	Utilisation principale
AtporA-F	AtporA	GATAATGGCGTGCAGAGACTT	55°C	Génotypage
AtporA-R	AtporA	GAATCAGCCAAAACACAACACTACTAA	55°C	Génotypage
AtporA-R3	AtporA	GTTTGCTTCGATGAAGTCTGTGC	55°C	Génotypage
PORA-R	AtporA	TGCGGACAGAGAAAGCAGAGG	55°C	Génotypage du mutant <i>porA-Salk</i>
AtporA R-RT	AtporA	CGTCTCATCATTGTTGGATCCA	55°C	
Atpor3.1	AtporA	ATTTCACTTTCGGAGCAAAGC	55°C	RT-semi quantitative
Atpor3.2	AtporA	TCTTGGCGTCTAAGGAAGATT	55°C	RT-semi quantitative + Génotypage du 35S-PORA
AtporA (SB) R	AtporA	GTTGCAGACTTTGCTATC	55°C	sonde wt southern-blot
porB-F1	AtporB	CAACAATGGCCCTTCAAGCTG	55°C	génotypage du mutant <i>porB</i>
porB-R1	AtporB	AAGCCTTTGCACCGTCGAAAT	55°C	génotypage du mutant <i>porB</i> + RT-semi quantitative RT-quant
porB-F2	AtporB	TAATGTACCACCGAAGGCGAATC	55°C	RT-semi quantitative + RT-quantitative
porB-R2	AtporB	CAGAATCAGATATCTAAAAATCCCGGAAA	55°C	RT-semi quantitative
PorC-F (RTQ)	AtporC	AGCAAGTGATGCGGAGAAGG	55°C	RT-quantitative
PorC-R (RTQ)	AtporC	ACGTTCTCGCTAACCTCCCAC	55°C	RT-quantitative
LBa1	T-DNA (Salk)	TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG	55°C	Génotypage du mutant <i>porA-Salk</i>
LB Wisc	T-DNA LB	AACGTCCGCAATGTGTTATTAAGTTGTC	55°C	génotypage du mutant <i>porA-WL</i>
RB_Salk	pBin-ROK2	GAGAACCTGGCGTGCAATCCA TCT	55°C	Génotypage
Ds5-2		CGAAATCGATCGGGATAAAA	55°C	Génotypage
35S F	promoteur 35 S	CGCACAAATCCCACTATCCTT	55°C	Génotypage
AtAcl.1	Actin	TGGGATGACATGGAGAAGAT	55°C	RT-semi quantitative
AtAcl.2	Actin	ATACCAATCATAGATGGCTGG	55°C	RT-semi quantitative
Act-F (RTQ)	actine	FTCAGAGAAGAAGCACCGCC	55°C	RT-quantitative
Act-R (RTQ)	actine	ACCCGGCTTGAGAAATGGT	55°C	RT-quantitative
HPT (F)	Resistance hygrom	GATGTAGGAGGGCGTGGATA	55°C	sonde T-DNA Southern-blot <i>porA-WL</i>
HPT R	Resistance hygrom	ATTTGTGTACGCCGACAGT	55°C	sonde T-DNA Southern-blot <i>porA-WL</i>
NPTII-F2	résistance Kanam	CGGTTCTTTTGTCAAGACC	58°C	sonde T-DNA Southern-blot <i>porA-Ds</i> et <i>porA-Salk</i>
NPTII-R2	résistance Kanam	CAATATCACGGGTAGCCAAC	58°C	sonde T-DNA Southern-blot <i>porA-Ds</i> et <i>porA-Salk</i>

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Akita M, Nielsen E, Keegstra K** (1997). Identification of protein transport complexes in the chloroplastic envelope membranes via chemical cross-linking. *J Cell Biol.* **136**: 983-994.
- Alawady A, Reski R, Yaronkaya E, Grimm B** (2005). Cloning and expression of the tobacco CHLM sequence encoding Mg protoporphyrin IX methyltransferase and its interaction with Mg chelatase. *Plant Mol Biol.* **57**: 679-691.
- Aldridge C, Maple J, Moller SG** (2005). The molecular biology of plastid division in higher plants. *J Exp Bot.* **56**: 1061-1077
- Ankele E, Kindgren P, Pesquet E, Strand A** (2007). In vivo visualization of Mg-protoporphyrin IX, a coordinator of photosynthetic gene expression in the nucleus and the chloroplast. *Plant Cell.* **19**: 1964-1979
- Apel K, Santel HJ, Redlinger TE, Falk H** (1980). The protochlorophyllide holochrome of barley (*Hordeum vulgare* L.). Isolation and characterization of the NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase. *Eur J Biochem.* **111**: 251-258.
- Apel K** (1981). The protochlorophyllide holochrome of barley (*Hordeum vulgare* L.). Phytochrome-induced decrease of translatable mRNA coding for the NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase. *Eur J Biochem.* **120**: 89-93.
- Apel K, Hirt H** (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol.* **55**: 373-399.
- Armstrong GA, Runge S, Frick G, Sperling U, Apel K** (1995). Identification of NADPH:protochlorophyllide oxidoreductases A and B: a branched pathway for light-dependent chlorophyll biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **108**: 1505-1517.
- Armstrong GA, Apel K, Rudiger W** (2000). Does a light-harvesting protochlorophyllide a/b-binding protein complex exist? *Trends Plant Sci.* **5**: 40-44.
- Aronsson H, Sohrt K, Soll J** (2000). NADPH:Protochlorophyllide oxidoreductase uses the general import route into chloroplasts. *Biol Chem.* **381**: 1263-1267.
- Baker ME** (1994). Protochlorophyllide reductase is homologous to human carbonyl reductase and pig 20 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Biochem J.* **300**: 605-607.
- Barnes SA, Nishizawa NK, Quaggio RB, Whitelam GC, Chua NH** (1996). Far-red light blocks greening of *Arabidopsis* seedlings via a phytochrome A-mediated change in plastid development. *Plant Cell.* **8**: 601-615.
- Barthélemy X, Bouvier G, Radunz A, Docquier S, Schmid G, Franck F** (2000). Localization of NADPH-protochlorophyllide reductase in plastids of barley at different greening stages. *Photosynth Res* **64**: 63-76
- Beale SI** (1999). Enzymes of chlorophyll biosynthesis. *Photosynthesis Research* **60**: 43-73
- Bedard J, Jarvis P** (2005). Recognition and envelope translocation of chloroplast preproteins. *J Exp Bot.* **56**: 2287-2320
- Beer NS, Griffiths T** (1981). Purification of the enzyme NADPH: protochlorophyllide oxidoreductase. *Biochem. J.* **195**: 83-92
- Benli M, Schulz R, Apel K** (1991). Effect of light on the NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol.* **16**: 615-625.
- Birve SJ, Selstam E, Johansson LB** (1996). Secondary structure of NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase examined by circular dichroism and prediction methods. *Biochem J.* **317**: 549-555.
- Blankenship RE** (2001). Molecular evidence for the evolution of photosynthesis. *Trends Plant Sci.* **6**: 4-6.

- Canaani OD, Sauer K** (1977). Analysis of the Subunit Structure of Protochlorophyllide Holochrome by Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Plant Physiol.* **60**: 422-429.
- Cavalier-Smith T** (2000). Membrane heredity and early chloroplast evolution. *Trends Plant Sci.* **5**: 174-182.
- Chandok MR, Sopory SK, Oelmuller R** (2001). Cytoplasmic kinase and phosphatase activities can induce PsaF gene expression in the absence of functional plastids: evidence that phosphorylation/dephosphorylation events are involved in interorganellar crosstalk. *Mol Gen Genet.* **264**: 819-826.
- Choquet Y, Rahire M, Girard-Bascou J, Erickson J, Rochaix JD** (1992). A chloroplast gene is required for the light-independent accumulation of chlorophyll in *Chlamydomonas reinhardtii*. *EMBO J.* **11**: 1697-1704.
- Chory J** (1991). Light signals in leaf and chloroplast development: photoreceptors and downstream responses in search of a transduction pathway. *New Biol.* **3**: 538-548.
- Cline K, Henry R** (1996). Import and routing of nucleus-encoded chloroplast proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **12**: 1-26.
- Clough SJ, Bent AF** (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **16**: 735-743
- Cornah JE, Terry MJ, Smith AG** (2003). Green or red: what stops the traffic in the tetrapyrrole pathway? *Trends Plant Sci.* **8**: 224-230.
- Dahlin C, Sundqvist C, Timko MP** (1995). The in vitro assembly of the NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase in pea chloroplasts. *Plant Mol. Biol.* **29**: 317-330
- Dahlin C, Aronsson H, Wilks HM, Lebedev N, Sundqvist C, Timko MP** (1999). The role of protein surface charge in catalytic activity and chloroplast membrane association of the pea NADPH: protochlorophyllide oxidoreductase (POR) as revealed by alanine scanning mutagenesis. *Plant Mol Biol.* **39**: 309-323.
- Dahlin C, Aronsson H, Almkvist J, Sundqvist C** (2000). Protochlorophyllide-independent import of two NADPH:Pchlde oxidoreductase proteins (PORA and PORB) from barley into isolated plastids. *Physiol. Plantarum* **109**: 298-303
- Darrah PM, Kay SA, Teakle GR, Griffiths WT** (1990). Cloning and sequencing of protochlorophyllide reductase. *Biochem J.* **265**: 789-798.
- Dehesh K, Ryberg M** (1985). The NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase is the major protein constituent of prolamellar bodies in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Planta* **164**: 396-399
- Demmig-Adams B, Gilmore AM, Adams WW** (1996). Carotenoids 3: in vivo function of carotenoids in higher plants. *FASEB J.* **10**: 403-412
- Douglas SE** (1998). Plastid evolution: origins, diversity, trends. *Curr Opin Genet Dev.* **8**: 655-661.
- Doyle J, Doyle J** (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* **12**: 13-15
- Dyall SD, Brown MT, Johnson PJ** (2004). Ancient invasions: From endosymbionts to organelles. *Science* **304**: 253-257
- Eckhardt U, Grimm B, Hortensteiner S** (2004). Recent advances in chlorophyll biosynthesis and breakdown in higher plants. *Plant Mol Biol.* **56**: 1-14.
- El Refy A, Perazza D, Zekraoui L, Valay JG, Bechtold N, Brown S, Hülskamp M, Herzog M, Bonneville JM** (2003). The *Arabidopsis* KAKTUS gene encodes a HECT protein and controls the number of endoreduplication cycles. *Mol Genet Genomics.* **270**: 403-414
- Falciatore A, Merendino L, Barneche F, Ceol M, Meskauskiene R, Apel K, Rochaix JD** (2005). The FLP proteins act as regulators of chlorophyll synthesis in response to light and plastid signals in *Chlamydomonas*. *Genes Dev.* **19**: 176-187.

- Forreiter C, van Cleve B, Schmidt A, Apel K** (1990). Evidence for a general light-dependent negative control of NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase in angiosperms. *Planta* **183**: 126-132
- Forreiter C, Apel K** (1993). Light-independent and light-dependent protochlorophyllide-reducing activities and two distinct NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase polypeptides in mountain pine (*Pinus mugo*). *Planta*. **190**: 536-545.
- Franck F, Sperling U, Frick G, Pochert B, van Cleve B, Apel K, Armstrong GA** (2000). Regulation of etioplast pigment-protein complexes, inner membrane architecture, and protochlorophyllide a chemical heterogeneity by light-dependent NADPH:protochlorophyllide oxidoreductases A and B. *Plant Physiol.* **124**: 1678-1696.
- Frick G, Su Q, Apel K, Armstrong GA** (2003). An *Arabidopsis* *porB porC* double mutant lacking light-dependent NADPH:protochlorophyllide oxidoreductases B and C is highly chlorophyll-deficient and developmentally arrested. *Plant J.* **35**: 141-153.
- Fujita Y, Takagi H, Hase T** (1996). Identification of the *chlB* gene and the gene product essential for the light-independent chlorophyll biosynthesis in the cyanobacterium *Plectonema boryanum*. *Plant Cell Physiol.* **37**: 313-323.
- Fujita Y, Takagi H, Hase T** (1998). Cloning of the gene encoding a protochlorophyllide reductase: the physiological significance of the co-existence of light-dependent and -independent protochlorophyllide reduction systems in the cyanobacterium *Plectonema boryanum*. *Plant Cell Physiol.* **39**: 177-185.
- Fujita Y, Bauer CE** (2000). Reconstitution of light-independent protochlorophyllide reductase from purified *bchl* and *BchN-BchB* subunits. In vitro confirmation of nitrogenase-like features of a bacteriochlorophyll biosynthesis enzyme. *J Biol Chem.* **275**: 23583-23588.
- Griffiths W, Kay S, Oliver R** (1985). The presence and photoregulation of protochlorophyllide reductase in green tissues. *Plant Mol. Biol.* **4**: 13-22
- Griffiths WT** (1978). Reconstitution of chlorophyllide formation by isolated etioplast membranes. *Biochem J.* **174**: 681-692.
- Gutensohn M, Fan E, Frielingsdorf S, Hanner P, Hou B, Hust B, Klosgen RB** (2006). Toc, Tic, Tat et al.: structure and function of protein transport machineries in chloroplasts. *J Plant Physiol.* **163**: 333-347
- Hammond SM, Caudy AA, Hannon GJ** (2001). Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. *Nat Rev Genet.* **2**: 110-119
- Havaux M, Niyogi KK** (1999). The violaxanthin cycle protects plants from photooxidative damage by more than one mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 8762-8767
- Holtorf H, Reinbothe S, Reinbothe C, Bereza B, Apel K** (1995). Two routes of chlorophyllide synthesis that are differentially regulated by light in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Proc Natl Acad Sci U S A.* **92**: 3254-3258.
- Holtorf H, Apel K** (1996). Transcripts of the two NADPH protochlorophyllide oxidoreductase genes *PorA* and *PorB* are differentially degraded in etiolated barley seedlings. *Plant Mol Biol.* **31**: 387-392.
- Ivanova Y, Smith MD, Chen K, Schnell DJ** (2004). Members of the Toc159 import receptor family represent distinct pathways for protein targeting to plastids. *Mol Biol Cell.* **15**: 3379-3392
- Johanningmeier U** (1988). Possible control of transcript levels by chlorophyll precursors in *Chlamydomonas*. *Eur J Biochem.* **177**: 417-424.
- Johnson MP, Havaux M, Triantaphylidès C, Ksas B, Pascal AA, Robert B, Davison PA, Ruban AV, Horton P** (2007). Elevated zeaxanthin bound to oligomeric LHCII

- enhances the resistance of Arabidopsis to photooxidative stress by a lipid-protective, antioxidant mechanism. *J Biol Chem.* **282**: 22605-22618
- Joyard J, Block M, Pineau B, Albrieux C, Douce R** (1990). Envelope membranes from mature spinach chloroplasts contain a NADPH:protochlorophyllide reductase on the cytosolic side of the outer membrane. *J Biol Chem.* **265**: 21820-21827.
- Karpinski S, Escobar C, Karpinska B, Creissen G, Mullineaux PM** (1997). Photosynthetic electron transport regulates the expression of cytosolic ascorbate peroxidase genes in Arabidopsis during excess light stress. *Plant Cell.* **9**: 627-640.
- Keegstra K, Cline K** (1999). Protein import and routing systems of chloroplasts. *Plant Cell.* **11**: 557-570.
- Kelner A** (1949). Effect of Visible Light on the Recovery of *Streptomyces Griseus* Conidia from Ultra-violet Irradiation Injury. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **35**: 73-79.
- Kim C, Apel K** (2004). Substrate-dependent and organ-specific chloroplast protein import in planta. *Plant Cell.* **16**: 88-98
- Kimura M, Manabe K, Abe T, Yoshida S, Matsui M, Yamamoto YY** (2003). Analysis of hydrogen peroxide-independent expression of the high-light-inducible ELIP2 gene with the aid of the ELIP2 promoter-luciferase fusions. *Photochem Photobiol.* **77**: 668-674.
- Kouranov A, Chen X, Fuks B, Schnell DJ** (1998). Tic20 and Tic22 are new components of the protein import apparatus at the chloroplast inner envelope membrane. *J Cell Biol.* **143**: 991-1002.
- Koussevitzky S, Nott A, Mockler TC, Hong F, Sachetto-Martins G, Surpin M, Lim J, Mittler R, Chory J** (2007). Signals from chloroplasts converge to regulate nuclear gene expression. *Science.* **316**: 715-719
- Kovtun Y, Chiu WL, Tena G, Sheen J** (2000). Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**: 2940-2945.
- Kuroda H, Masuda T, Ohta H, Shioi Y, Takamiya K** (1995). Light-enhanced gene expression of NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase in cucumber. *Biochem Biophys Res Commun.* **210**: 310-316.
- Lebedev N, Van Cleve B, Armstrong G, Apel K** (1995). Chlorophyll Synthesis in a Deetiolated (det340) Mutant of Arabidopsis without NADPH-Protochlorophyllide (PChlide) Oxidoreductase (POR) A and Photoactive PChlide-F655. *Plant Cell.* **7**: 2081-2090
- Lee KP, Kim C, Lee DW, Apel K** (2003). TIGRINA d, required for regulating the biosynthesis of tetrapyrroles in barley, is an ortholog of the FLU gene of Arabidopsis thaliana. *FEBS Lett.* **553**: 119-124.
- Lichtenthaler HK** (1987). Chlorophylls and carotenoids - pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology* **148**: 350-382
- Mapleston RE, Griffiths WT** (1980). Light modulation of the activity of protochlorophyllide reductase. *Biochem J.* **189**: 125-133.
- Martin W, Herrmann RG** (1998). Gene transfer from organelles to the nucleus: how much, what happens, and Why? *Plant Physiol.* **118**: 9-17.
- Martinez-Zapater JM, Salinas J** (1998) Preparation of RNA, Vol 82 : Arabidopsis protocols. In H Press, ed, *Methods in Molecular Biology*,,
- Masuda T, Fusada N, Shiraishi T, Kuroda H, Awai K, Shimada H, Ohta H, Takamiya K** (2002). Identification of two differentially regulated isoforms of protochlorophyllide oxidoreductase (POR) from tobacco revealed a wide variety of light- and development-dependent regulations of POR gene expression among angiosperms. *Photosynth Res.* **74**: 165-172.

- Masuda T, Fusada N, Oosawa N, Takamatsu K, Yamamoto YY, et al.** (2003). Functional analysis of isoforms of NADPH: protochlorophyllide oxidoreductase (POR), PORB and PORC, in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Physiol. **44**: 963-974.
- Masuda T, Takamiya K** (2004). Novel Insights into the Enzymology, Regulation and Physiological Functions of Light-dependent Protochlorophyllide Oxidoreductase in Angiosperms. Photosynth Res. **81**: 1-29.
- Matringe M, Camadro JM, Block MA, Joyard J, Scalla R, Labbe P, Douce R** (1992). Localization within chloroplasts of protoporphyrinogen oxidase, the target enzyme for diphenylether-like herbicides. J Biol Chem. **267**: 4646-4651.
- McCormac AC, Fischer A, Kumar AM, Soll D, Terry MJ** (2001). Regulation of HEMA1 expression by phytochrome and a plastid signal during de-etiolation in *Arabidopsis thaliana*. Plant J. **25**: 549-561.
- Meskauskiene R, Nater M, Goslings D, Kessler F, op den Camp R, Apel K** (2001). FLU: a negative regulator of chlorophyll biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. Proc Natl Acad Sci U S A. **98**: 12826-12831
- Meskauskiene R, Apel K** (2002). Interaction of FLU, a negative regulator of tetrapyrrole biosynthesis, with the glutamyl-tRNA reductase requires the tetratricopeptide repeat domain of FLU. FEBS Lett. **532**: 27-30.
- Morita MT, Tasaka M** (2004). Gravity sensing and signaling. Curr Opin Plant Biol. **7**: 712-718.
- Mullet J, Klein P, Klein R** (1990). Chlorophyll Regulates Accumulation of the Plastid-Encoded Chlorophyll Apoproteins CP43 and D1 by Increasing Apoprotein Stability. Proc Natl Acad Sci U S A **87**: 4038-4042
- Nakagawara E, Sakuraba Y, Yamasato A, Tanaka R, Tanaka A** (2007). Clp protease controls chlorophyll b synthesis by regulating the level of chlorophyllide a oxygenase. Plant J. **49**: 800-809
- Nott A, Jung HS, Koussevitzky S, Chory J** (2006). Plastid-to-nucleus retrograde signaling. Annu Rev Plant Biol. **57**: 739-759.
- Oliver RP, Griffiths WT** (1980). Identification of the polypeptides of NADPH--protochlorophyllide oxidoreductase. Biochem J. **191**: 277-280.
- Oliver RP, Griffiths WT** (1981). Covalent labelling of the NADPH: protochlorophyllide oxidoreductase from etioplast membranes with [3H]N-phenylmaleimide. Biochem J. **195**: 93-101.
- Oosawa N, Masuda T, Awai K, Fusada N, Shimada H, Ohta H, Takamiya K** (2000). Identification and light-induced expression of a novel gene of NADPH--protochlorophyllide oxidoreductase isoform in *Arabidopsis thaliana*. FEBS Lett. **474**: 133-136.
- Oster U, Tanaka R, Tanaka A, Rudiger W** (2000). Cloning and functional expression of the gene encoding the key enzyme for chlorophyll b biosynthesis (CAO) from *Arabidopsis thaliana*. Plant J. **21**: 305-310.
- Overmyer K, Brosche M, Kangasjarvi J** (2003). Reactive oxygen species and hormonal control of cell death. Trends Plant Sci. **8**: 335-342.
- Parinov S, Sevugan M, Ye D, Yang WC, Kumaran M, Sundaresan V** (1999). Analysis of flanking sequences from dissociation insertion lines: a database for reverse genetics in *Arabidopsis*. Plant Cell. **11**: 2263-2270.
- Pfannschmidt T, Schutze K, Brost M, Oelmuller R** (2001). A novel mechanism of nuclear photosynthesis gene regulation by redox signals from the chloroplast during photosystem stoichiometry adjustment. J Biol Chem. **276**: 36125-36130

- Pollmann S, Springer A, Buhr F, Lahroussi A, Samol I, et al.** (2007). A plant porphyria related to defects in plastid import of protochlorophyllide oxidoreductase A. PNAS **104**: 2019-2023
- Pontier D, Albrieux C, Joyard J, Lagrange T, Block MA** (2007). Knock-out of the magnesium protoporphyrin IX methyltransferase gene in Arabidopsis. Effects on chloroplast development and on chloroplast-to-nucleus signaling. J Biol Chem. **282**: 2297-2304
- Pyke KA** (1999). Plastid division and development. Plant Cell. **11**: 549-556.
- Rapp JC, Mullet JE** (1991). Chloroplast transcription is required to express the nuclear genes *rbcS* and *cab*. Plastid DNA copy number is regulated independently. Plant Mol Biol. **17**: 813-823.
- Reinbothe C, Apel K, Reinbothe S** (1995a). A light-induced protease from barley plastids degrades NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase complexed with chlorophyllide. Mol Cell Biol **15**: 6206-6212
- Reinbothe C, Lebedev N, Apel K, Reinbothe S** (1997). Regulation of chloroplast protein import through a protochlorophyllide-responsive transit peptide. Proc Natl Acad Sci U S A **94**: 8890-8894
- Reinbothe C, Lebedev N, Reinbothe S** (1999). A protochlorophyllide light-harvesting complex involved in de-etiolation of higher plants. Nature **397**: 80-84
- Reinbothe C, Buhr F, Pollmann S, Reinbothe S** (2003a). In vitro reconstitution of light-harvesting POR-protochlorophyllide complex with protochlorophyllides a and b. J Biol Chem **278**: 807-815
- Reinbothe C, Lepinat A, Deckers M, Beck E, Reinbothe S** (2003b). The extra loop distinguishing POR from the structurally related short-chain alcohol dehydrogenases is dispensable for pigment binding but needed for the assembly of light-harvesting POR-protochlorophyllide complex. J Biol Chem **278**: 816-822
- Reinbothe C, Satoh H, Alcaraz JP, Reinbothe S** (2004a). A novel role of water-soluble chlorophyll proteins in the transitory storage of chlorophyllide. Plant Physiol **134**: 1355-1365
- Reinbothe C, Bartsch S, Eggink LL, Hooper JK, Brusslan J, Andrade-Paz R, Monnet J, Reinbothe S** (2006a). A role for chlorophyllide a oxygenase in the regulated import and stabilization of light-harvesting chlorophyll a/b proteins. Proc Natl Acad Sci U S A. **103**: 4777-4782
- Reinbothe C, Buhr F, Bartsch S, Desvignes C, Quigley F, Pesey H, Reinbothe S** (2006b). In vitro-mutagenesis of NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase B: two distinctive protochlorophyllide binding sites participate in enzyme catalysis and assembly. Mol Genet Genomics. **275**: 540-552
- Reinbothe S, Reinbothe C, Holtorf H, Apel K** (1995b). Two NADPH:Protochlorophyllide Oxidoreductases in Barley: Evidence for the Selective Disappearance of PORA during the Light-Induced Greening of Etiolated Seedlings. Plant Cell **7**: 1933-1940
- Reinbothe S, Runge S, Reinbothe C, van Cleve B, Apel K** (1995c). Substrate-dependent transport of the NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase into isolated plastids. Plant Cell **7**: 161-172
- Reinbothe S, Reinbothe C** (1996). Regulation of Chlorophyll Biosynthesis in Angiosperms. Plant Physiol **111**: 1-7
- Reinbothe S, Reinbothe C, Apel K, Lebedev N** (1996). Evolution of chlorophyll biosynthesis--the challenge to survive photooxidation. Cell **86**: 703-705
- Reinbothe S, Mache R, Reinbothe C** (2000). A second, substrate-dependent site of protein import into chloroplasts. Proc Natl Acad Sci U S A **97**: 9795-9800

- Reinbothe S, Quigley F, Gray J, Schemenewitz A, Reinbothe C** (2004b). Identification of plastid envelope proteins required for import of protochlorophyllide oxidoreductase A into the chloroplast of barley. Proc Natl Acad Sci U S A **101**: 2197-2202
- Reinbothe S, Quigley F, Springer A, Schemenewitz A, Reinbothe C** (2004c). The outer plastid envelope protein Oep16: role as precursor translocase in import of protochlorophyllide oxidoreductase A. Proc Natl Acad Sci U S A **101**: 2203-2208
- Richter S, Lamppa GK** (1998). A chloroplast processing enzyme functions as the general stromal processing peptidase. Proc Natl Acad Sci U S A. **95**: 7463-7468.
- Rochaix JD** (2001). Assembly, function, and dynamics of the photosynthetic machinery in *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant Physiol. **127**: 1394-1398.
- Runge S, Sperling U, Frick G, Apel K, Armstrong GA** (1996). Distinct roles for light-dependent NADPH:protochlorophyllide oxidoreductases (POR) A and B during greening in higher plants. Plant J. **9**: 513-523.
- Ryberg M, Dehesh K** (1986). Localization of NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase in dark-grown wheat (*Triticum aestivum*) by immuno-electron microscopy before and after transformation of the prolamellar bodies. Physiol. Plantarum **66**: 616-624
- Sakamoto W, Zaltsman A, Adam Z, Takahashi Y** (2003). Coordinated regulation and complex formation of yellow variegated1 and yellow variegated2, chloroplastic FtsH metalloproteases involved in the repair cycle of photosystem II in *Arabidopsis* thylakoid membranes. Plant Cell. **15**: 2843-2855. Epub 2003 Nov 2820.
- Sambrook J, Russell D** (2001) *Molecular Cloning. A laboratory manual*, Ed Third edition. Cold Spring Harbour Lab. Press, New York
- Santel HJ, Apel K** (1981). The protochlorophyllide holochrome of barley (*Hordeum vulgare* L.). The effect of light on the NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase. Eur J Biochem. **120**: 95-103.
- Sato-Nara K, Demura T, Fukuda H** (2004). Expression of photosynthesis-related genes and their regulation by light during somatic embryogenesis in *Daucus carota*. Planta. **219**: 23-31
- Schemenewitz A, Pollmann S, Reinbothe C, Reinbothe S** (2007). A substrate-independent, 14:3:3 protein-mediated plastid import pathway of NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase A. Proc Natl Acad Sci U S A. **104**: 8538-8543
- Scheumann V, Schoch S, Rudiger W** (1998). Chlorophyll a formation in the chlorophyll b reductase reaction requires reduced ferredoxin. J Biol Chem. **273**: 35102-35108.
- Schnell DJ, Kessler F, Blobel G** (1994). Isolation of components of the chloroplast protein import machinery. Science. **266**: 1007-1012.
- Schulz R, Steinmuller K, Klaas M, Forreiter C, Rasmussen S, Hiller C, Apel K** (1989). Nucleotide sequence of a cDNA coding for the NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase (PCR) of barley (*Hordeum vulgare* L.) and its expression in *Escherichia coli*. Mol Gen Genet. **217**: 355-361.
- Skinner JS, Timko MP** (1998). Loblolly pine (*Pinus taeda* L.) contains multiple expressed genes encoding light-dependent NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase (POR). Plant Cell Physiol. **39**: 795-806.
- Smith JHC, Kupke DW** (1956). Some properties of extracted protochlorophyll holochrome. Nature **178**: 751-752
- Spano AJ, He Z, Timko MP** (1992a). NADPH: protochlorophyllide oxidoreductases in white pine (*Pinus strobus*) and loblolly pine (*P. taeda*). Evidence for light and developmental regulation of expression and conservation in gene organization and protein structure between angiosperms and gymnosperms. Mol Gen Genet. **236**: 86-95.

- Spano AJ, He Z, Michel H, Hunt DF, Timko MP** (1992b). Molecular cloning, nuclear gene structure, and developmental expression of NADPH: protochlorophyllide oxidoreductase in pea (*Pisum sativum* L.). Plant Mol Biol. **18**: 967-972.
- Sperling U, van Cleve B, Frick G, Apel K, Armstrong GA** (1997). Overexpression of light-dependent PORA or PORB in plants depleted of endogenous POR by far-red light enhances seedling survival in white light and protects against photooxidative damage. Plant J. **12**: 649-658.
- Stern D, Higgs D, Yang J** (1997). Transcription and translation in chloroplasts. Trends Plant Sci. **2**: 308-315
- Strand A, Asami T, Alonso J, Ecker JR, Chory J** (2003). Chloroplast to nucleus communication triggered by accumulation of Mg-protoporphyrin IX. Nature **421**: 79-83.
- Su Q, Frick G, Armstrong G, Apel K** (2001). POR C of *Arabidopsis thaliana*: a third light- and NADPH-dependent protochlorophyllide oxidoreductase that is differentially regulated by light. Plant Mol Biol. **47**: 805-813.
- Sullivan JA, Gray JC** (1999). Plastid translation is required for the expression of nuclear photosynthesis genes in the dark and in roots of the pea *lip1* mutant. Plant Cell. **11**: 901-910.
- Suzuki JY, Bauer CE** (1992). Light-independent chlorophyll biosynthesis: involvement of the chloroplast gene *chlL* (*frxC*). Plant Cell. **4**: 929-940.
- Suzuki JY, Bauer CE** (1995). A prokaryotic origin for light-dependent chlorophyll biosynthesis of plants. Proc Natl Acad Sci U S A. **92**: 3749-3753.
- Takio S, Nakao N, Suzuki T, Tanaka K, Yamamoto I, Satoh T** (1998). Light-dependent expression of protochlorophyllide oxidoreductase gene in the liverwort, *Marchantia paleacea* var. *diptera*. Plant Cell Physiol. **39**: 665-669.
- Tanaka R, Tanaka A** (2005). Effects of chlorophyllide oxygenase overexpression on light acclimation in *Arabidopsis thaliana*. Photosynth Res. **85**: 327-340.
- Teakle GR, Griffiths WT** (1993). Cloning, characterization and import studies on protochlorophyllide reductase from wheat (*Triticum aestivum*). Biochem J. **296**: 225-230.
- Tzvetkova-Chevolleau T, Hutin C, Noel LD, Goforth R, Carde JP, et al.** (2007). Canonical signal recognition particle components can be bypassed for posttranslational protein targeting in chloroplasts. Plant Cell. **19**: 1635-1648
- Vothknecht UC, Kannangara CG, von Wettstein D** (1998). Barley glutamyl tRNA^{Glu} reductase: mutations affecting haem inhibition and enzyme activity. Phytochemistry. **47**: 513-519.
- Weber S** (2005). Light-driven enzymatic catalysis of DNA repair: a review of recent biophysical studies on photolyase. Biochim Biophys Acta. **1707**: 1-23.
- Wilks HM, Timko MP** (1995). A light-dependent complementation system for analysis of NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase: identification and mutagenesis of two conserved residues that are essential for enzyme activity. Proc Natl Acad Sci U S A. **92**: 724-728.
- Williams WP, Selstam E, Brain T** (1998). X-ray diffraction studies of the structural organisation of prolamellar bodies isolated from *Zea mays*. FEBS Lett. **422**: 252-254.
- Willows R** (1999). Photosynthesis: Making light of a dark situation. Nature **397**: 27-28
- Wollman FA, Minai L, Nechushtai R** (1999). The biogenesis and assembly of photosynthetic proteins in thylakoid membranes I. Biochim Biophys Acta. **1411**: 21-85.

- Zimmermann P, Hirsch-Hoffmann M, Hennig L, Gruissem W (2004).**
GENEVESTIGATOR. Arabidopsis microarray database and analysis toolbox. Plant Physiol. **136**: 2621-2632.
- Zimmermann P, Hennig L, Gruissem W (2005).** Gene-expression analysis and network discovery using Genevestigator. Trends Plant Sci. **10**: 407-409.

Résumé

Si les gymnospermes, les mousses, ou encore les algues vertes sont capables de verdir à l'obscurité, ce n'est pas le cas des angiospermes. Chez ces derniers, la voie de biosynthèse de la chlorophylle est bloquée au niveau de la pénultième étape qui correspond à la réduction de la protochlorophyllide en chlorophyllide. Cette réaction est catalysée par la NADPH : protochlorophyllide oxydoréductase (POR) dont l'activité est strictement dépendante de la lumière. Chez *Arabidopsis thaliana*, trois isoformes, PORA, PORB et PORC, ont été identifiées. Nous avons décidé d'étudier de façon systématique l'expression de ces gènes au cours du développement d'*Arabidopsis thaliana*. Nos résultats confirment que l'expression des gènes *POR* est soumise à un contrôle par la lumière. Alors que les protéines PORA et PORB sont principalement exprimées à l'obscurité, PORB et PORC sont les formes majoritaires dans les tissus photosynthétiques à la lumière. Cependant un taux faible mais non nul de transcrit *PORA* ainsi que de la protéine correspondante a été détecté à la lumière au cours du développement de la plante. Cette donnée pose donc la question du rôle éventuel de la protéine PORA au delà de la skotomorphogenèse.

Nous avons entrepris la caractérisation de mutants *porA*, le rôle de cette protéine n'ayant été déduit qu'à partir d'études indirectes jusqu'à ce jour. Un allèle nul a été identifié qui présente un phénotype complexe. Nous avons cherché à caractériser les anomalies photosynthétiques dont il est l'objet. Par ailleurs, nous avons construit un double mutant *porA porB*. Son étude parallèlement à celle du simple mutant *porA*, nous a permis de confirmer la redondance fonctionnelle des protéines PORA et PORB dans l'établissement des corps prolamellaires des cotylédons de la plante étiolée. Ces études suggèrent également un rôle photoprotecteur pour la protéine PORA.

Abstract

Gymnosperms, mosses and green algae are able to turn green even in the dark. In contrast, chlorophyll biosynthesis is blocked in angiosperms at its penultimate step, the reduction of protochlorophyllide into chlorophyllide. This reaction is catalyzed by the NADPH: protochlorophyllide oxidoreductase (POR), whose function is entirely light-dependent. Three POR isoforms (PORA, PORB and PORC) have been identified in *Arabidopsis thaliana* and their expression have been mainly studied at the transcript level. We have therefore decided to analyze both *POR* transcript and protein accumulation during plant development. We have confirmed that *POR* gene expression is tightly regulated by light: much like their transcripts, the PORA and PORB proteins are mainly accumulated in the dark while PORB and PORC are mainly observed in the photosynthetic tissues. However, weak levels of both *PORA* transcript and protein were detected in the light, raising the intriguing question of the possible role of PORA beyond skotomorphogenesis.

Up to now, the studies concerning the role of the PORA enzyme are indirect. We have therefore decided to investigate the function of the protein more in details using independent *porA* mutants. Among them a knock out *porA* line presents a complex phenotype, in which defects in the photosynthetic process have been identified. We have also obtained a double mutant that is KO for both the *PORA* and *PORB* alleles. The comparison of the *porA porB* double mutant with the *porA* mutant has show that the PORA and PORB isoforms are functionally redundant in the establishment of the prolamellar bodies in cotyledons of etiolated plants. Our results also suggest that PORA may act as photoprotector.