



HAL
open science

Etude de la fonction du facteur de transcription plastidial, Sigma 3 chez *Arabidopsis thaliana*

Ouafa Zghidi

► **To cite this version:**

Ouafa Zghidi. Etude de la fonction du facteur de transcription plastidial, Sigma 3 chez *Arabidopsis thaliana*. Biologie végétale. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2008. Français. NNT: . tel-00473335

HAL Id: tel-00473335

<https://theses.hal.science/tel-00473335>

Submitted on 15 Apr 2010

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.

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER

Discipline : BIOLOGIE

Etude de la fonction du facteur de
transcription plastidial, Sigma 3 chez
Arabidopsis thaliana

Présentée et soutenue publiquement par

Ouafa ZGHIDI

Le 30 Juin 2008

Directrice de thèse : Silva Lerbs-Mache

Composition du jury

Mr Hans Geiselman	<i>président</i>
Mr Dominique Job	<i>rapporteur</i>
Mr Thierry Lagrange	<i>rapporteur</i>
Mme Laurence Drouard	<i>examineur</i>
Mme Silva Lerbs-Mache	<i>examineur</i>

Thèse préparée dans l'équipe « Transcription du génome plastidial et division des plastes »
Laboratoire Plastes et Différenciation cellulaire

A mes parents

Remerciements

Je tiens à exprimer tout d'abord mes remerciements aux membres du jury, qui ont accepté d'évaluer mon travail de thèse.

Merci à Monsieur Hans Geiselman, d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse, Monsieur Thierry Lagrange et Monsieur Dominique Job d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce manuscrit. Merci également à Madame Laurence Drouard d'avoir accepté d'examiner mon mémoire et de faire partie de mon jury de thèse.

Je remercie tout particulièrement Mme S. Lerbs-Mache pour son encadrement et sa confiance tout au long de ma thèse.

Je remercie également Livia pour sa disponibilité et ses conseils qui m'ont guidé lors de l'accomplissement de ce travail.

Merci à Monsieur Michel Herzog de m'avoir accueillie dans son laboratoire ainsi qu'à tous les membres du Laboratoire Plastiques et Différenciation Cellulaire, tout particulièrement à Régis Mache pour son aide lors de la rédaction de ce mémoire de thèse. Je remercie vivement Emeline Lambert pour son aide et sa disponibilité pendant ces derniers mois. Merci aussi à Hanane, Florence, Denis, Mohamed, Mustafa et Sumaira.

Merci à Emilie, Maryam et Abir pour tous les bons moments qu'on a partagé ensemble, leur soutien et leur amitié. Je souhaite à tous les thésards encore présents plein de courage et de réussite.

Je remercie infiniment mon père de m'avoir toujours soutenu et encouragé dans les projets que j'entreprends. Merci également à ma mère, mon frère et mes sœurs pour leur irremplaçable et inconditionnel soutien.

Un grand merci à mon mari d'avoir toujours été présent pour écarter les doutes, soigner les blessures et partager les joies. Cette thèse est un peu la sienne...

A ma petite Waad, la joie de ma dernière année de thèse, merci d'avoir su m'aider à ta manière à achever ce travail...

Sommaire

Introduction

1	Les plastes	2
1.1	Structure et fonctions	2
1.2	Origine du plaste	4
2	Le génome plastidial	4
2.1	Structure	4
2.2	Organisation des gènes plastidiaux	5
3	Les ARN polymérase plastidiales.....	6
3.1	L'ARN polymérase codée par le plaste, PEP.....	6
3.2	L'ARN polymérase codée par le noyau, NEP.....	7
3.3	Coordination de la transcription entre NEP et PEP.....	7
4	Les promoteurs plastidiaux	9
4.1	Les promoteurs PEP	9
4.1.1	Le promoteur <i>psbA</i>	10
4.1.2	Le promoteur <i>psbD</i> LRD.....	11
4.1.3	Le promoteur <i>rbcL</i>	12
4.1.4	Le promoteur <i>rrnP2</i>	12
4.2	Les promoteurs NEP	14
4.2.1	Promoteurs NEP de type I.....	14
4.2.2	Promoteurs NEP de type II.....	14
4.2.3	Les promoteurs des ARNt.....	15
4.2.4	Le promoteur Pc de l'opéron <i>rrn</i>	15
5	Les facteurs sigma plastidiaux	17
5.1	Structure et fonction	17
5.2	Caractérisation par transcription <i>in vitro</i>	19
5.3	Localisation subcellulaire.....	20
5.4	Profils d'expression.....	21
5.5	Fonctions	22
5.5.1	AtSig2.....	23
5.5.2	AtSig5.....	23
5.5.3	AtSig4.....	24
5.5.4	AtSig6.....	24
5.5.5	OsSig1	24
5.6	Spécificité du facteur sigma 3	25
6	Contrôle post-transcriptionnel de l'expression génique dans le plaste	26
6.1	Maturation et stabilité des transcrits plastidiaux	26
6.1.1	Rôle de l'extrémité 5' UTR.....	27
6.1.2	Rôle de l'extrémité 3'UTR.....	27
6.1.2.1	Polyadénylation.....	28
6.1.3	Processing intercistronique	29
6.2	Régulation de la traduction	29
6.2.1	Rôle du 3' et 5' UTR.....	29
6.2.2	Autorégulation de la traduction.....	30
7	Projet de thèse	30
<u>Chapitre I Caractérisation du mutant homozygote sig3</u>		
1	Caractérisation du mutant homozygote <i>sig3</i>	32
1.1	Obtention du mutant homozygote <i>sig3</i>	32

1.2	Phénotype du mutant <i>sig3</i>	33
2	Comparaison de l'accumulation des transcrits plastidiaux dans les plantes sauvages et mutantes par analyse avec une puce à ADN	34
2.1	Stratégie adoptée	35
2.2	Conditions expérimentales	36
2.3	Analyse des résultats obtenus par puce à ADN.....	37
3	Confirmation des résultats obtenus par puce à ADN : identification des gènes transcrits par SIG3	40
3.1	Diminution de l'expression du gène <i>psbN</i>	40
3.2	Diminution de l'accumulation du transcrit <i>atpH</i>	42
3.3	Diminution des transcrits <i>atpB</i> et <i>atpE</i>	43
3.4	Augmentation de l'accumulation de l'ARNm <i>rbcL</i> ?	45
4	Conclusion.....	45
Chapitre II Rôle du facteur sigma 3 au niveau de l'expression de l'opéron <i>psbB</i>		
1	Rôle du facteur sigma 3 au niveau de l'expression de l'opéron <i>psbB</i>	48
1.1	Identification du promoteur <i>psbN</i>	48
1.2	Rôle de SIG3 au niveau de l'accumulation et processing des transcrits de l'opéron <i>psbB</i>	51
1.3	Rôle de SIG3 au niveau de l'accumulation des protéines de l'opéron <i>psbB</i>	53
1.3.1	Caractérisation de l'anticorps anti-PsbT	53
1.4	Étude de l'accumulation des transcrits <i>psbT</i>	55
1.4.1	Caractérisation des transcrits antisens de <i>psbT</i>	55
1.4.1.1	Détermination de l'extrémité 5' du transcrit <i>psbT</i> antisens	55
1.4.1.2	Détermination de l'extrémité 3'	57
1.5	Caractérisation des extrémités 5' des transcrits sens de <i>psbT</i>	58
1.6	Caractérisation de l'ARN double brin sens et antisens de <i>psbT in vivo</i>	61
1.7	Régulation de l'expression de <i>psbT</i> via l'ARN antisens : hypothèses	64
2	Conclusion du chapitre II	65
Chapitre III Régulation de l'expression des sous-unités plastidiales de l'ATP synthase par le facteur SIG3		
1	Régulation de l'expression des sous-unités plastidiales de l'ATP synthase par le facteur SIG3	67
1.1	Analyse de l'expression des gènes de l'opéron <i>atpI/atpH/atpF/atpA</i> à l'aide du mutant <i>sig3</i>	69
1.1.1	Identification du promoteur du gène <i>atpH</i>	69
1.1.2	Expression du gène <i>atpH</i> au cours de la germination	71
1.1.3	Analyse des transcrits <i>atpI</i>	74
1.1.4	Analyse des transcrits <i>atpF</i>	76
1.2	Analyse de l'expression des gènes de l'opéron <i>atpB/E</i>	79
1.2.1	Détermination des transcrits <i>atpB</i>	79
1.2.2	Détermination des transcrits <i>atpE</i>	81
2	Conclusion.....	83
Discussion		
Conclusion générale		
Matériel et Méthodes		
1	Matériel végétal et conditions de culture	98
1.1	Stérilisation en surface des graines d'Arabidopsis.....	98
1.2	Culture <i>in vitro</i> d'Arabidopsis.....	98
1.3	Culture en terre d'Arabidopsis	98
2	Méthodes d'analyse des acides nucléiques	98

2.1	Extraction rapide d'ADN génomique à partir de feuilles d'Arabidopsis.....	98
2.2	Amplification par PCR.....	99
2.3	Séparation de fragments ADN sur gel d'agarose.....	99
2.4	Séquençage des ADN.....	99
2.5	Clonage de fragment d'ADN.....	99
2.6	Extraction d'ARN.....	100
2.6.1	A partir de plantules d'Arabidopsis.....	100
2.6.2	A partir de graines d'Arabidopsis (différents stades de germination).....	101
2.7	Traitement des ARN à la DNase I.....	102
2.8	Analyse des ARN par RT-PCR.....	102
2.9	Analyse du profil d'expression des transcrits plastidiaux par puce à ADN.....	102
2.9.1	Préparation de la sonde.....	103
2.9.2	Hybridation des membranes.....	103
2.9.3	Analyse des résultats.....	103
2.10	Analyse des ARN par Northern blot.....	104
2.11	Analyse des ARN par extension d'amorce.....	104
2.11.1	Marquage de l'oligonucléotide.....	105
2.11.2	Séquençage Manuel.....	105
2.11.3	Réaction d'extension d'amorce.....	106
2.11.4	Préparation de gel de polyacrylamide dénaturant.....	106
2.12	Détermination de l'origine des transcrits.....	106
2.12.1	Capping <i>in vitro</i> des ARN par guanylyltransferase.....	107
2.12.2	5' Race couplée au traitement à la phosphatase (TAP).....	107
2.12.3	Déterminations des extrémités 3' et 5' d'un transcrit par Circular RT-PCR.....	108
2.13	108
2.14	Détermination de l'existence d'ARN double brin <i>in vivo</i>	109
3	Méthodes d'analyses des protéines.....	109
3.1	Extraction des protéines.....	109
3.2	Isolement de chloroplastes intacts d'Arabidopsis.....	110
3.2.1	Séparation des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE).....	110
3.3	Détection immunologique d'un transfert Western (western blot).....	111
	Références bibliographiques.....	114

Introduction

1 Les plastes

1.1 Structure et fonctions

Les plastes sont des organites qui jouent un rôle important au sein de la cellule végétale. En effet, ils sont le siège de plusieurs réactions métaboliques indispensables pour le développement des plantes tels que : la synthèse des acides gras, des acides aminés aromatiques et non aromatiques, des bases puriques et pyrimidiques, des isoprénoïdes (intervenant dans la biosynthèse des caroténoïdes et des stérols) et les tétrapyrroles (intervenant dans la biosynthèse de la chlorophylle).

Le rôle majeur des chloroplastes est la photosynthèse. Chacun est entouré d'une double membrane constituant les enveloppes externes et internes. Des membranes photosynthétiques, les thylacoïdes, s'étendent à l'intérieur du plaste en formant un réseau de vésicules aplaties (Fig.1) en partie empilées les unes sur les autres formant des structures appelées grana.

La membrane thylacoidienne contient quatre complexes protéiques majeurs impliqués dans la réaction lumineuse de la photosynthèse : les photosystèmes (PS) I et II, le complexe cytochrome b6/f et l'ATP synthase. Les deux photosystèmes sont présents dans les granas : le PS II est limité aux membranes internes du grana (n'ayant pas de contact avec le stroma). Le PSI est situé au niveau des thylacoïdes ayant une face en contact avec le stroma.

Le stroma, contient le système génétique du plaste ainsi que la plupart des enzymes intervenant dans les métabolismes en particulier ceux qui sont responsables de la conversion du CO₂ en glucides durant la photosynthèse. Il contient des quantités variables de grains d'amidon et des gouttelettes lipidiques appelées palstoglobules. Les enveloppes sont le siège de la biogenèse des lipides et contrôlent l'échange de molécules entre le stroma et le cytoplasme. La membrane externe est perméable à des molécules faisant moins de 10 kDa. La membrane interne est par contre plus sélective, et contient des petites molécules jouant le rôle de transporteurs des ions et des métabolites (Flügge, 2001).

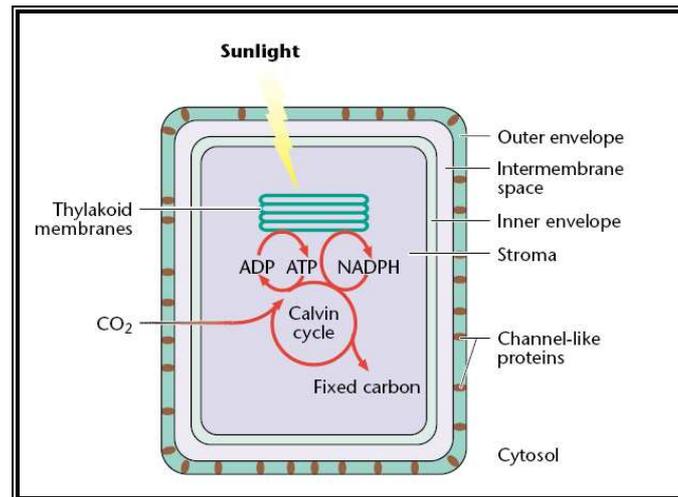


Figure 1 : Les chloroplastes sont le siège de la photosynthèse et de la fixation du CO_2 atmosphérique. Ils sont entourés d'une double membrane (enveloppes externe et interne). Ils possèdent en plus des membranes thylacoïdiennes riches en chlorophylle où se déroule la photosynthèse. Lors de la phase lumineuse, l'ATP et le NADPH sont utilisés pour convertir le CO_2 atmosphérique en composés organiques grâce à des enzymes situées dans le stroma (cycle de Calvin) (Schéma tiré de Flüggé, 2001).

Dans les tissus méristématiques, les plastes existent sous une forme indifférenciée, non pigmentée, appelée proplaste.

En absence de lumière les proplastés se développent en étioplastes qui sont formés d'une structure para-cristalline appelée corps prolamellaire. Ces derniers se transforment après illumination en thylacoïdes permettant ainsi l'apparition des chloroplastes. Dans les tissus non pigmentés tels que les trichomes, les proplastés se développent en leucoplastes capables de synthétiser et de stocker plusieurs substances comme des huiles aromatiques (élaioplastés). Les amyloplastés localisés au niveau des racines et dans le tubercule de pomme de terre sont la source de stockage de carbone sous forme d'amidon. Dans certains fruits et fleurs, les plastés existent sous forme de chromoplastés riches en pigments de couleurs diverses tels que les caroténoïdes et les xanthophylles (Fig.2).

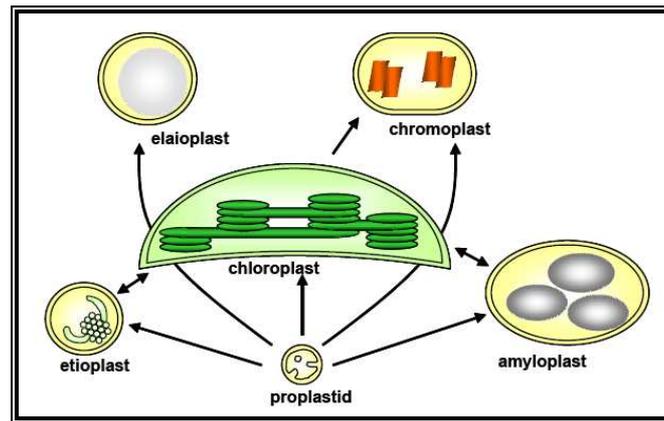


Figure 2 : Les différents types de plastes. Les chloroplastes sont issus de la différenciation des proplastates ainsi que tous les autres types de plastes. Toutefois, la plupart des types de plastes sont interconvertibles selon les conditions de développement (Schéma tiré de de López-Juez and Pyke, 2005).

1.2 Origine du plaste

Les plastes sont issus de l'endosymbiose d'une cyanobactérie avec une cellule eucaryote, événement intervenu il y a un milliard d'années environ (Dyall et al., 2004).

Durant la co-évolution de l'endosymbionte (le plaste) et de la cellule hôte, plusieurs gènes « plastidiaux » ont été transférés vers le noyau. Certains ont gardés une destinée plastidiale. Ils sont alors adressés au plaste grâce à un peptide de transit. Chez *Arabidopsis thaliana* environ 18% des gènes nucléaires sont d'origine cyanobactérienne (Martin et al., 2002).

Du fait de leur double origine génétique, les plastes sont considérés comme étant des organites semi autonomes. Ils possèdent leur propre génome (appelé aussi plastome) qui code pour des protéines plastidiales, mais la majorité des autres protéines plastidiales sont codées par le noyau (environ 80% chez *Arabidopsis thaliana*). Ainsi, le noyau contrôle la biogenèse du plaste.

2 Le génome plastidial

2.1 Structure

Les plastes possèdent leur propre génome, constitué de plusieurs molécules d'ADN plastidial, chacune étant appelée chromosome ou parfois plastome. Le degré de polyploïdie varie : les proplastates contiennent environ vingt copies de leur génome (400 par cellule méristématique) alors que les chloroplastes contiennent approximativement 100 copies (soit jusqu'à 10,000 copies pour des cellules contenant 100 plastates) (Sugiura, 1992). Ces génomes ne sont pas nécessairement organisés en cercles individuels (un génome par cercle). Il a été récemment

démontré qu'en plus de la forme circulaire monomérique du plastome, plusieurs formes linéaires organisées en dimère, trimère et même tétramères ont été observées (Bendich, 2004). Il demeure par contre encore incertain sous quelle forme l'ADN plastidial joue le rôle de matrice pour la replication d'ADN *in vivo*. Scharff and Koop en 2006 ont montré que les extrémités de l'ADN plastidial linéaire chez le tabac correspondent à des origines de replication connues.

Les ADN plastidiaux tout comme le chromosome bactérien sont compactés en nucléoïdes. Les chloroplastes contiennent plusieurs nucléoïdes.

Le chromosome plastidial circulaire contient deux régions inversées répétées (IR) séparant une large et une petite région (LSC et SSC respectivement). Il contient entre 120 et 160Kpb codant pour environ 120 à 135 gènes (Pour une liste complète des génomes séquencés : <http://megasun.bch.umontreal.ca/ogmp>).

Le chromosome plastidial des plantes supérieures contient 4 gènes codant des ARN ribosomiques (16S, 23S, 5S et 4.5S), 30 gènes codant des ARNt, plus de 72 gènes codant des polypeptides et plusieurs ORF codant des protéines de fonctions encore inconnues (*ycf*).

Les gènes plastidiaux codant des polypeptides appartiennent à plusieurs catégories : les gènes codant l'appareil transcriptionnel plastidial de type procaryotique (gènes *rpo*) ; de l'appareil traductionnel ; de l'appareil photosynthétique et des sous unités de la NADH-déhydrogénase (gènes *ndh*). Un seul gène (*clpP*) code une sous unité de protéase.

2.2 Organisation des gènes plastidiaux

Comme chez les bactéries, la plupart des gènes plastidiaux sont organisés en opéron. Ils s'expriment sous forme d'unités polycistroniques (Sugiura, 1992). Chez *Arabidopsis thaliana*, il existe environ 35 unités de transcription polycistronique. La majorité des opérons plastidiaux codent pour des sous unités appartenant à un même complexe moléculaire (comme les gènes *ndh* par exemple). Toutefois certaines exceptions existent tel que l'opéron *psbB* qui contient en plus des gènes *psb*, les gènes *pet*.

Certains gènes plastidiaux possèdent des introns appartenant au groupe I ou au groupe II. Dans le plastome du tabac 18 gènes plastidiaux contiennent des introns (6 ARNt et 12 protéines) (Sugita and Sugiura, 1996 ; Rochaix, 1996).

D'une manière générale, la maturation des transcrits plastidiaux comprend l'épissage, l'editing (conversion de C en U), et le processing des longs ARNs polycistroniques.

3 Les ARN polymérases plastidiales

Les plastes possèdent leur propre machinerie génétique faisant intervenir deux types d'ARN polymérases et des ribosomes plastidiaux. Ainsi, les plastes assurent la synthèse d'au moins 5% de leur protéines (Shiina et al., 2005).

Bien que le génome du chloroplaste soit plus petit que celui des cyanobactéries, la transcription plastidiale est très complexe. On distingue dans les plastes deux systèmes de transcription qui diffèrent selon leur origine génétique :

- Un système de type procaryote mettant en jeu une ARN polymérase plastidiale de type eubactérien, multimérique constituée de quatre sous unités α , β , β' et β'' appelée PEP pour *Plastid Encoded RNA Polymerase*
- Un système de type phagique comprenant deux ARN polymérases nucléaires de type phagiques, monomériques appelées NEP pour *Nuclear Encoded RNA Polymerase*

3.1 L'ARN polymérase codée par le plaste, PEP

La PEP est une enzyme multimérique qui peut se présenter sous deux formes bien distinctes.

Le core enzyme est formé de deux sous unités α , une sous unité de β , de β' et de β'' . Ces sous unités sont codées respectivement par les gènes *rpoA*, *B*, *C1* et *C2*. Ces gènes sont organisés comme chez les bactéries en deux opérons : l'opéron *rpoB* contenant les gènes *rpoB*, *C1* et *C2* et l'opéron *rpoA* qui comporte en plus des gènes codant pour des protéines ribosomales.

Le core enzyme est nécessaire pour l'étape d'élongation lors de la synthèse d'ARN. Cependant, l'initiation de la transcription nécessite la reconnaissance spécifique d'une séquence nucléotidique dite séquence promotrice. Ceci s'effectue par la deuxième forme d'enzyme dite holoenzyme.

L'holoenzyme est donc la forme complète de l'ARN polymérase plastidiale, PEP. Elle est formée suite à la fixation sur le core enzyme d'un facteur de transcription plastidial, dit facteur sigma (σ) codé par le noyau.

Des mutants transplastomiques chez le tabac, nuls pour l'une des sous unités de la polymérase ($\Delta rpoA$, $\Delta rpoB$, $\Delta rpoC1$) ont été créés. Ils ont permis de mettre en évidence le rôle de la PEP dans la transcription de gènes photosynthétiques (Allison et al., 1996 ; Santis-MacIossek et

al., 1999). Ces mutants sont albinos viables et si on les cultive avec un apport de glucides (dans le milieu de culture), ils accumulent en plus certains des transcrits plastidiaux.

L'expression du génome plastidial nécessite donc l'activité d'un second système de transcription impliquant une ARN polymérase monomérique, de type phagique, codée par le noyau : NEP (*Nuclear Encoded RNA Polymerase*).

3.2 L'ARN polymérase codée par le noyau, NEP

La présence d'une ARN polymérase plastidiale de type phagique a été démontrée selon une approche biochimique réalisée au sein de notre laboratoire par Lerbs-Mache (1993). En effet, S. Lerbs-Mache a montré l'existence d'un polypeptide de 110kDa, dans les chloroplastes d'épinard lequel présente des similarités immunologiques avec l'ARN polymérase du bactériophage T7. Il est aussi capable de reconnaître le même type de promoteurs.

Le premier gène candidat *rpoTp* codant pour cette ARN polymérase a été découvert dans le génome nucléaire d'*Arabidopsis*. Il est supposé provenir d'une duplication du gène mitochondrial (Hedtke et al., 1997). La fonction de *rpoTp* comme polymérase plastidiale a été démontrée par Liere et al., 2004 en utilisant des tabacs transgéniques surexprimant cette polymérase.

Chez les plantes monocotylédones on dénombre deux NEP, une mitochondriale (RPOTm) et une plastidiale (RPOTp) (Ikeda and Gray, 1999). Par contre chez les plantes dicotylédones, il existe un troisième gène (*rpoTmp*) codant pour une ARN polymérase de type T7 (Hedtke et al., 1997). Il serait issu d'une seconde duplication qui est apparue après la divergence entre les monocotylédones et les dicotylédones. Chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, cette polymérase RPOTmp est importée à la fois dans les plastes et dans les mitochondries (Hedtke et al., 2000).

3.3 Coordination de la transcription entre NEP et PEP

La transcription des gènes dans le noyau se fait par l'intermédiaire de trois ARN polymérases. La coordination de la transcription entre chaque ARN polymérase se fait de manière gène-spécifique : chacune transcrit un groupe de gènes. La pol I transcrit les gènes ribosomiques (ARN r), la pol II transcrit les ARNm et la pol III transcrits les petits ARN tels que les ARNt. Dans le chloroplaste, bien que trois ARN polymérases coexistent aussi, la coordination de la transcription s'effectue de manière différente.

L'étude des mutants transplastomiques, en particulier des mutants déficients en PEP a permis de mieux caractériser les gènes cibles des polymérase plastidiales. La comparaison du profil d'expression des gènes dans les plantes mutantes par rapport à la plante sauvage a permis de classer les gènes plastidiaux en trois groupes (Allison et al., 1996 ; Hajdukiewicz et al., 1997).

- Gènes de groupe I transcrits exclusivement par la PEP (gènes photosynthétiques)
- Gènes de groupe II transcrits aussi bien par la PEP que par les NEP (opéron *rrn* par exemple)
- Gènes de groupe III transcrits exclusivement par les NEP.

Ceci montre bien que les deux types de polymérase se partagent la transcription des différents gènes plastidiaux. La question qui est alors posée est :

Comment s'effectue cette distribution de rôle entre les deux polymérase PEP et NEP ? Est ce que la régulation de la transcription plastidiale est dépendante du stade du développement ?

Des études réalisées par Mullet, 1993, ont permis de répondre partiellement à ces questions. Il a pris l'orge, une espèce monocotylédone comme modèle d'étude. Cette espèce a la caractéristique d'avoir un gradient de différenciation des plastes tout au long de la feuille. Sur ce modèle, il a pu observer que la NEP est active pendant les jeunes stades de développement qui renferment des proplastes. Elle transcrit les gènes plastidiaux codant l'appareil transcriptionnel (l'opéron *rpoB*) et traductionnel du plaste. Ceci lui a permis d'émettre une hypothèse de mise en place séquentielle des activités polymérase plastidiales au cours du développement des plastes : il y aurait une activation en cascade des deux systèmes de transcription, la NEP étant active aux jeunes stades de développement (dans les proplastes) elle permettrait de transcrire les gènes de ménage y compris ceux codant pour les sous-unités de la PEP. Ensuite, une fois que la PEP est synthétisée, au cours des stades plus développés (chloroplaste) cette dernière s'associe aux facteurs sigma et commence à transcrire les gènes photosynthétiques.

Certaines études réalisées récemment ont commencé à remettre en question ce modèle. En effet, Cahoon et al., 2004 ont montré, chez le maïs, que les deux activités transcriptionnelles des NEP et de la PEP augmentent au cours de stades de différenciation des plastes. Toutefois, l'accumulation des transcrits NEP ne varie pas au cours du développement des plastes. Par contre les transcrits PEP deviennent plus abondants dans les plastes matures. Il a donc été suggéré que le niveau d'accumulation constant des transcrits NEP proviendrait d'une diminution de leur stabilité compensée par une augmentation de l'activité NEP. La

déstabilisation sélective des transcrits NEP a été aussi observée dans les mutants déficients en PEP où tous les gènes plastidiaux sont transcrits par le système phagique, NEP (Legen et al., 2002). La déstabilisation des transcrits NEP pourrait être due à un événement post-transcriptionnel. Ceci montre bien que le turnover des ARNm dans les chloroplastes varie considérablement entre les transcrits NEP et PEP et qu'il existe probablement une régulation post-transcriptionnelle des transcrits dépendante de l'ARN polymérase jouant un rôle important dans le développement des chloroplastes.

Demarsy et al., 2006, ont apporté un autre élément de réponse concernant la coordination de la transcription plastidiale entre les NEP et la PEP. Une étude expérimentale systématique de l'expression des composants des systèmes de transcription plastidiale (les sous unités de la PEP, les facteurs sigma, les NEP) au cours de la germination et des jeunes stades de développement chez *Arabidopsis thaliana* et l'épinard a été entreprise. Les résultats obtenus contredisent le modèle de mise en place séquentielle de l'appareil transcriptionnel plastidial qui a été proposé précédemment par Mullet, 1993. A la place, un modèle de mise en place simultanée des deux appareils de transcription NEP et PEP pendant la phase de germination a été établi. En effet, il a été démontré que la PEP est déjà active pendant la phase d'imbibition de la graine et de la germination. L'inhibition de l'activité PEP par l'inhibiteur tagetitoxin est associée à un retard de germination des graines d'*Arabidopsis* (Demarsy et al., 2006 ; Courtois et al., 2007).

4 Les promoteurs plastidiaux

PEP et NEP reconnaissent différents types de promoteurs. Les promoteurs PEP sont similaires aux promoteurs reconnus par l'enzyme holo d'*E. coli* associée aux facteurs sigma 70 tandis que les promoteurs NEP ressemblent à ceux reconnus par les polymérases phagiques T3/T7.

4.1 Les promoteurs PEP

L'ARN polymérase plastidiale a une origine eubactérienne. De ce fait, les promoteurs PEP présentent des variants de séquences consensus -10 (TATAaT) et -35 (TTGaca) du promoteur typique σ^{70} d'*E. coli*. Les nucléotides écrits en majuscules sont fortement conservés dans les promoteurs PEP (Liere and Maliga, 2001). Certains promoteurs plastidiaux de type σ^{70} possèdent des éléments *cis* régulateurs :

- Une TATA-box localisée entre le consensus -10/-35

- Un motif TGn localisé à une paire de base de distance en amont de la région -10 (promoteur -10 long)
- Une boîte AAG située en amont de la région -35

Le rôle régulateur des ces différents motifs sera discuté dans les différents exemples de promoteur présentés ci-dessous.

L'efficacité de la transcription initiée à partir d'un promoteur PEP varie considérablement selon le degré d'homologie des boîtes -10/-35 avec les séquences consensus bactérienne. Ainsi, le gène *psbA* est transcrit 40 fois plus que le gène *petB* chez l'orge (pour revue voir Shiina et al., 2005). Certains gènes plastidiaux tels que *psbA*, *rbcL*, *psbD*, *psaA*, et *rrnP1* (*rrnP2* d'après la nomenclature de Lerbs-Mache, 2000) sont fortement exprimés par rapport à d'autres gènes ayant des promoteurs PEP dans les feuilles matures. Ces promoteurs présentent en effet une architecture particulière.

4.1.1 Le promoteur *psbA*

Le gène *psbA* code pour la protéine D1, composante essentielle du centre réactionnel du photosystème II. La transcription du gène *psbA* est activée par la lumière et dépendante du stade de développement (Klein and Mullet, 1990). La protéine D1 ainsi que D2 (codée par le gène *psbD*) sont des protéines photosynthétiques rapidement endommagées par la lumière (Christopher and Mullet, 1994). De ce fait l'expression de D1 et D2 est régulée de manière différentielle à plusieurs niveaux tels que la stabilité des ARNm, la traduction, mais aussi de manière primordiale au niveau de la transcription.

Plusieurs essais de transcription *in vitro* ont montré que *psbA* est transcrit à partir d'un promoteur unique de type σ^{70} possédant des séquences -10/-35 très conservées chez les plantes (Liere and Maliga, 2001). Une caractérisation détaillée du promoteur a été effectuée par transcription *in vitro* chez la moutarde. Cette étude a permis d'identifier la présence d'une boîte TATA située entre les hexamères -10 et -35. En comparant le taux de transcription *in vitro* à partir d'extraits de plantes étiolées et cultivées à la lumière, il a été montré que la boîte TATA ainsi que l'élément -10 du promoteur sont suffisants pour maintenir une activité transcriptionnelle basique du promoteur *psbA* dans les étioplastes. Par contre la présence de l'élément -35 du promoteur est obligatoire pour atteindre le taux élevé de transcription de *psbA* nécessaire dans les extraits de chloroplastes matures (photosynthétiquement actifs) (Eisermann et al., 1990).

Un autre type de régulation d'expression du promoteur *psbA* a été observé chez le blé. Ce promoteur présente en plus de la boîte TATA, un motif TGn situé en amont de l'élément -10 (aussi appelé séquence -10 étendu) (Sato et al., 1999). L'étude réalisée sur le blé a été effectuée sur des extraits à partir de parties de feuilles caractérisées par des stades de différenciation de plastides différents : la partie basale de la feuille présentant des plastides non différenciés ou proplastides, tandis que l'extrémité de la feuille contient des chloroplastes matures. Cette étude a donc mis en évidence deux types d'activités PEP : une activité constitutive indépendante de la lumière observée dans les proplastides nécessitant les deux éléments -10/-35 du promoteur et une forte activité dépendante de la lumière (dans les chloroplastes présents dans l'extrémité de la feuille) dépendante uniquement de la région -10 (élément -10 étendu). Il a été proposé que la différence entre les deux activités de la PEP observée dans la base et l'extrémité des feuilles de blé serait due à l'association de différents facteurs sigma. De ce fait le motif TGn de la région -10 étendu serait impliqué dans la reconnaissance de certains facteurs sigma dans les chloroplastes matures. En effet, il a été démontré chez la moutarde que les facteurs SIG1 et SIG2 reconnaissent le motif TGn de la région -10 étendu (Homann and Link, 2003).

4.1.2 Le promoteur *psbD* LRP

Le gène *psbD* code pour la protéine D2, une autre composante importante du centre réactionnel du photosystème II. Cette protéine a, tout comme D1, un très rapide turnover lumière dépendant. Chez les plantes supérieures, le gène *psbD* forme un opéron avec le gène *psbC*. Ils sont transcrits à partir de plusieurs promoteurs PEP. Un des promoteurs PEP de *psbD* est très bien étudié c'est le promoteur *psbD* LRP (=Light Responsive Promoter). Comme son nom l'indique, ce promoteur est très fortement régulé par la lumière. Il est activé spécifiquement par des irradiations élevées de lumière bleu et ultraviolette (plus de 10 nmol m⁻² s⁻¹) (Christopher and Mullet, 1994).

L'architecture du promoteur *psbD* LRP a été étudiée dans de nombreuses espèces et semble être bien conservée dans le règne végétal (pour revue voir Liere and Maliga, 2001). Le promoteur *psbD* LRP est de type σ^{70} possédant des séquences -10/-35 très peu conservées, espacées d'environ 15 nucléotides au lieu de 17 ou 19 nt normalement. Ces séquences sont suivies en amont d'une région d'environ 28 nt dite boîte AAG ainsi qu'une région dite boîte PGT (Shiina et al., 2005 ; Liere and Maliga, 2001).

Des expériences de transcription *in vitro* ont montré que la polymérase purifiée d'E. coli est incapable d'initier la transcription à partir du promoteur *psbD* LRP. Ceci prouve l'existence

de facteurs de transcription additionnels nécessaires pour l'activité du promoteur *psbD* LRP. Chez l'orge, deux facteurs susceptibles d'interagir avec le promoteur *psbD* LRP ont été identifiés. Il s'agit du facteur AGF (*AAG box Factor*) liant spécifiquement la boîte AAG et du facteur PGTF (*PGT binding Factor*) interagissant avec la boîte PGT (Kim and Mullet, 1995). L'activité de PGTF est régulée par une kinase ADP dépendante. PGTF serait impliqué dans l'activation du promoteur *psbD* LRP en réponse à la lumière (Kim et al., 1999).

La transcription à partir du promoteur *psbD* LRP dépend uniquement de l'élément -10 chez le riz, le blé et l'orge (pour revue voir Liere and Maliga, 2001).

4.1.3 Le promoteur *rbcL*

Le gène plastidial *rbcL* code la grande sous unité de la ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase. Il est transcrit à partir d'un seul promoteur PEP contenant des éléments -10/-35 très conservés espacés de 18 nt. Ces éléments sont indispensables pour l'initiation de la transcription *in vitro* à partir du promoteur *rbcL* (Gruissem and Zurawski, 1985). La transcription de *rbcL* est régulée par la lumière chez l'orge (Klein and Mullet, 1990) le tabac et *Arabidopsis* (Shiina et al., 1998 ; Shiina et al., 2005).

De plus, la région située entre -16 et -102 du site d'initiation de la transcription du gène *rbcL* a été identifiée comme un site de liaison de CDF1, un facteur chloroplastique qui joue un rôle dans la régulation de la transcription de *rbcL* par la lumière, le stade de développement et le tissu pour certaines plantes (pour revue voir Shiina et al., 2005).

4.1.4 Le promoteur *rrnP2*

L'opéron *rrn* plastidial code les quatre ARNr (*rrn16*, *rrn 23*, *rrn4,5* et *rrn 5*) ainsi que deux ARNt : *trnI* et *trnA*.

L'opéron *rrn* possède quatre promoteurs distincts : *rrn P1*, *rrn P2*, *rrn Pc* et *rrn P3* (d'après la nomenclature de Lerbs-Mache, 2000). Les promoteurs *rrn P1* et *rrn P2* sont des promoteurs PEP tandis que le promoteur *rrn Pc* et *rrn P3* sont des promoteurs NEP (Lerbs-Mache, 2000). Cependant l'usage de promoteur pour l'initiation de la transcription diffère selon les plantes. Par exemple, chez le tabac, la transcription de l'opéron *rrn* s'effectue à partir du promoteur *rrn P2*, un promoteur PEP de type σ^{70} . Il contient des éléments -35 (TTGACG) et -10 (TATATT) très conservés. Toutefois, ces éléments ne sont pas suffisants pour permettre une initiation de la transcription *in vivo*. En effet, des études approfondies du promoteur ont mis en évidence l'importance d'une séquence nucléotidique (hexamère : GTG

GGA) située en amont du site -35 du promoteur. Cette séquence encore appelée RUA (*rRNA operon upstream activator*) est très bien conservée chez les plantes (monocotylédones et dicotylédones) sauf le pois (Suzuki et al., 2003).

La transcription à partir du promoteur *rrn P2* du tabac n'est pas dépendante de l'élément -10 (le -35 étant indispensable pour la transcription à partir de ce promoteur). Ainsi, il a été suggéré par Suzuki et al. (2003) que la séquence RUA pourrait remplacer l'élément -10 dans le promoteur *rrn P2*. Cependant, plusieurs hypothèses sont émises quant au mode d'interaction de la PEP avec la région RUA (une interaction directe ou par l'intermédiaire de facteurs spécifiques tels les facteurs sigma ou autres).

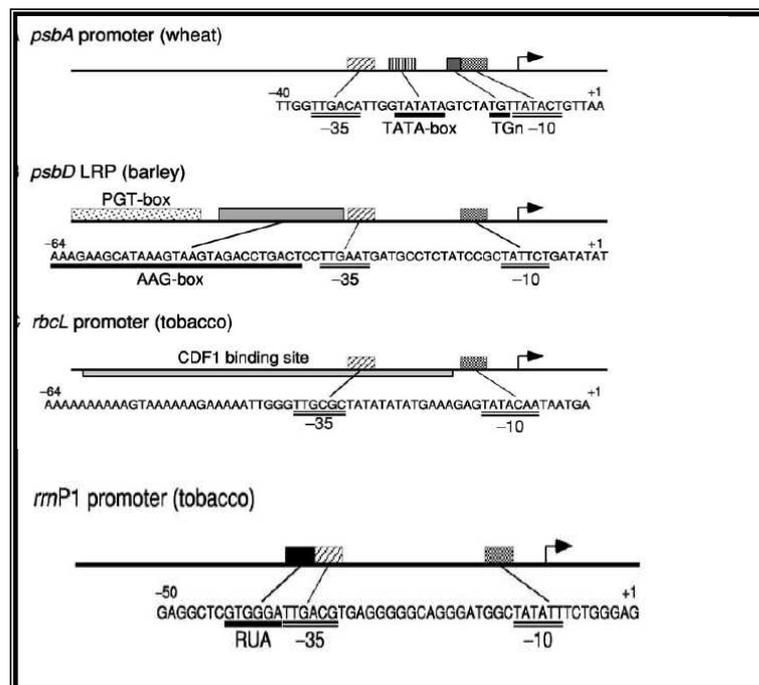


Figure 3 : Exemples des promoteurs PEP –dépendants nécessitant des éléments régulateurs en *cis* (tiré de Shiina et al., 2005).

4.2 Les promoteurs NEP

Les transcrits NEP ainsi que leur site d'initiation spécifiques ont été d'abord déterminés dans les mutants PEP. L'alignement des régions 5'UTR des gènes transcrits par la NEP a pu mettre en évidence l'existence d'un motif très conservé YRTA juste en aval du site d'initiation de la transcription. Ce motif est identique au promoteur mitochondrial phagique (type T3/T7). Ces promoteurs sont connus comme promoteur NEP type I (Allison et al., 1996; Hajdukiewicz et al.1997). D'autres promoteurs NEP, encore appelés promoteur NEP de type II, ont été identifiés chez certains gènes (tel que *ClpP-53*). Ils ne présentent pas d'éléments consensus. Les caractéristiques ainsi que des exemples des deux types de promoteurs NEP seront détaillés dans les paragraphes suivants.

4.2.1 Promoteurs NEP de type I

Les promoteurs NEP de type I sont caractérisés par la présence du motif très conservé YRTA. Des expériences visant à mieux disséquer l'architecture des régions promotrices de ces promoteurs ont permis de les diviser en deux sous groupes :

- Promoteur NEP de type Ia :

Ce sont des promoteurs dont l'initiation de la transcription est strictement dépendante de la présence du motif YRTA. On identifie à ce jour plusieurs promoteurs de ce type chez les plantes supérieures (tels que les promoteurs *rpoB-345*, *rps2-152*, *clpP-173*, *clpP-511*, *ycf2-1577*, et *accD-129* identifiés chez le tabac).

- Promoteur NEP de type Ib :

Ce type de promoteurs contient en plus du motif YRTA, un second motif conservé appelé boîte GAA. Le rôle important que joue cet élément dans l'initiation de la transcription a été démontré dans le promoteur *atpB-290* du tabac (Liere and Maliga, 2001 ; Shiina et al., 2005).

4.2.2 Promoteurs NEP de type II

Les promoteurs NEP de type II sont caractérisés par l'absence de séquence consensus ou motif YRTA. Ce type de promoteur est représenté par un exemple unique parmi les gènes plastidiaux : le promoteur principal du gène *ClpP* qui code une des sous unités de protéase plastidiale. Chez le tabac ce promoteur (*ClpP -53*) a été largement étudié *in vivo* en utilisant

une approche transplastomique. Les séquences indispensables au fonctionnement du promoteur sont situés en aval du site d'initiation de la transcription (entre -5 et +25) (Sriraman et al., 1998). La séquence du promoteur *ClpP* -53 ainsi que le site d'initiation de la transcription sont très conservés chez les monocotylédones, les dicotylédones, les conifères et les hépatiques.

4.2.3 Les promoteurs des ARNt

La plupart des ARNt plastidiaux sont transcrits par la PEP à partir de promoteur de type σ^{70} . Toutefois, la transcription de certains ARNt tels que les *trnS*, *trnR* et *trnT* chez l'épinard et *trnS*, *trnH* et *trnR* chez la moutarde est initiée à partir de promoteurs internes. Le site d'initiation de la transcription du gène *trnS* chez l'épinard se situe à 12 nucléotides en amont de la région codante mature de l'ARNt. L'analyse *in vitro* de la transcription du gène *trnS* a montré le rôle important d'une séquence nucléotidique riche en AT localisée en amont de la région codante (entre -31 et -11) (Wu et al., 1997). Toutefois, la région codante du gène *trnS* contient des séquences homologues aux blocs A et B constituant les promoteurs des ARNt nucléaires transcrits par la Pol III. Cependant, dans le génome d'*Arabidopsis* aucune ARN polymérase de type III adressée au plaste n'a été identifiée. A ce jour, l'ARN polymérase impliquée dans la transcription des ARNt dans le chloroplaste demeure inconnue.

4.2.4 Le promoteur Pc de l'opéron *rrn*

Le promoteur Pc de l'opéron *rrn* est un promoteur NEP « exceptionnel » car il diffère des deux types de promoteurs NEP connus à ce jour. En effet, le site d'initiation de la transcription à partir du promoteur Pc est localisé entre les éléments -10 /-35 du promoteur P2. En plus, il a été démontré que le promoteur *rrn Pc* est transcrit par une troisième NEP encore non identifiée en 2000, appelée NEP-2 (Bligny et al., 2000) récemment identifiée comme étant *rpoTmp* (Courtois et al., 2007). Le facteur CDF2 (*Chloroplast DNA-binding Factor*) interagit avec la NEP2 au niveau du promoteur *rrn Pc*, plus précisément dans une région située en amont de 28 bp du promoteur. Il s'agirait d'un activateur de la transcription du promoteur *rrn Pc* et d'un represseur de la transcription à partir du promoteur P2 par la PEP (Lerbs-Mache, 2000).

Chez *Arabidopsis thaliana*, des mutants d'insertion d'ADN-T des deux NEP *RPOTp* et *RPOTmp* ont été largement étudiés (Courtois et al., 2007). L'analyse des sites d'initiation de transcription des gènes NEP dans ces mutants a permis de distinguer le rôle de ces deux ARN

polymérase au cours de la transcription : *RPOTp* reconnaît spécifiquement les deux types de promoteurs (type I et type II) chez *Arabidopsis thaliana*. *RPOTmp* semble être spécifique d'un seul promoteur NEP, le promoteur *rrn Pc* au cours de la germination.

Ainsi, *RPOTp* est la principale NEP chez *Arabidopsis*. Par contre *RPOTmp* semble jouer un rôle spécifique au niveau de la transcription de l'opéron *rrn* au cours de la germination. Toutefois, ces deux polymérase peuvent se remplacer partiellement l'une l'autre. A un certain degré *RPOTmp* est capable de transcrire à partir des promoteurs de type I et II en absence de *RPOTp* (Courtois et al., 2007).

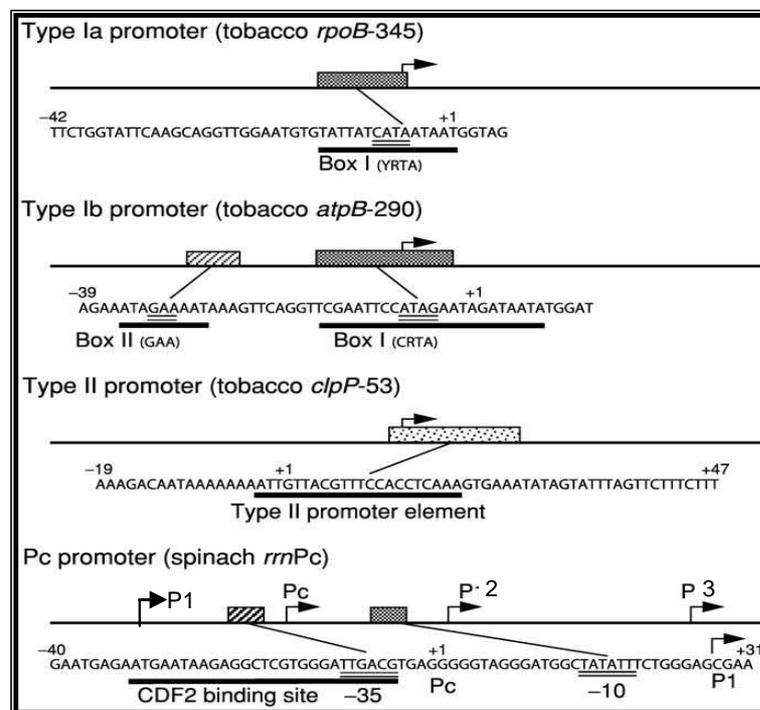


Figure 4 : Structures des différents types promoteurs NEP –dépendants ainsi que le promoteur *rrn Pc* (d'après Shiina et al., 2005).

5 Les facteurs sigma plastidiaux

La polymérase plastidiale PEP est responsable de la transcription des gènes photosynthétiques. Le profil de transcription de ces gènes semble varier selon les stades de développement ainsi que les conditions de culture (tel que la lumière). Chez les bactéries la reconnaissance des promoteurs par l'ARN polymérase est effectuée par l'association de facteurs de transcription appelés facteurs sigma. Ces facteurs sont multiples et assurent des fonctions différentes (reconnaissance spécifique de promoteurs) selon les conditions de culture.

Dans les chloroplastes des plantes supérieures plusieurs facteurs sigma ont été mis en évidence. A titre d'exemple, chez *Arabidopsis thaliana* il existe six facteurs sigma (*AtSIG1* jusqu'à *AtSIG6*) (Fujiwara et al., 2000 ; Hakimi et al., 2000). L'existence d'un tel nombre de facteurs de transcription plastidiaux pour la PEP pourrait suggérer que la transcription des gènes chloroplastiques est régulée de manière spécifique selon le stade de développement, la lumière, le stress, etc.

Afin d'élucider les mécanismes de régulation de la transcription plastidiale, plusieurs études ont été menées visant à mieux comprendre la structure, l'expression et le rôle des facteurs sigma chez les plantes. Nous allons détailler les résultats obtenus dans les paragraphes suivants.

5.1 Structure et fonction

Les facteurs sigma des plantes sont similaires à la fois à la famille des facteurs σ^{70} eubactériens et à la famille des facteurs σ^A des cyanobactéries (Fig. 5). Ces derniers sont composés de quatre régions (1-4) bien distinctes. Chez les facteurs sigma des plantes, on peut distinguer les régions 1.2, 2, 3 et 4 (Lysenko, 2007).

Une des différences primordiales entre les facteurs sigma bactériens et ceux des plantes réside dans la composition de la région N-terminale. En effet, après coupure du peptide de transit, les facteurs sigma des plantes possèdent une région N-terminale (200 à 300 acides aminés) qui les empêche d'interagir avec le système de transcription bactérien d'*E. coli* (Hakimi et al., 2000).

Chez les facteurs sigma bactériens, les régions conservées 1.2 et 2 forment le domaine σ_2 , la région 3 et 3.1, le domaine σ_3 tandis que la région 3.2 forme une boucle qui permet de connecter les domaines σ_3 et σ_4 (σ_4 formée par les régions 4.1 et 4.2) (voir figure 5). Ces trois

domaines lient spécifiquement l'enzyme cœur et l'ADN. Ces régions ont des propriétés différentes :

Les régions 2.1 et 2.2 forment la région principale liant le « core » enzyme, la région 2.4 permet la liaison à l'élément -10 du promoteur, la région 3 est impliquée dans la liaison au promoteur -10 étendu et enfin les régions 4.1 et 4.2 sont responsables de la reconnaissance de l'élément -35 du promoteur (pour revue voir Lysenko, 2007).

La comparaison des séquences de ces différentes régions des facteurs sigma bactériens par rapport à ceux des plantes a permis d'avoir des éléments de réponses concernant leurs rôles dans le chloroplaste.

En effet, du fait de l'absence d'homologie de séquence dans la région C-terminale (régions 2.1 et 2.2) avec les facteurs σ^{70} , le facteur AtSIG5, présente une affinité réduite pour le core enzyme (Lysenko, 2007). Ce facteur entre donc moins en compétition avec les autres facteurs pour la liaison au core enzyme. En revanche, il a été démontré que SIG5-holoenzyme présente un faible taux de transcription abortif. Cette caractéristique est liée à son rôle comme facteur de transcription induit lors d'un stress (Nagashima et al., 2004a).

La région 3 des facteurs sigma est peu conservée chez les plantes. Chez les facteurs σ^{70} cette région est nécessaire à la reconnaissance de l'extension TG de l'élément -10 du promoteur (via deux acides aminés H et E) (voir la revue de Lysenko, 2007). Chez les facteurs SIG1, SIG2 et SIG4 cette région semble être conservée contrairement aux facteurs SIG3, SIG5 et SIG6. Compte tenu de ces faits, SIG1, SIG2 et SIG4 ont probablement la plus grande capacité de se lier à l'extrémité 5' de l'élément -10. Ceci a été d'ailleurs démontré pour les facteurs SIG1 et SIG2 chez la moutarde (Homann and Link, 2003). Cette liaison assure une forte interaction entre l'holoenzyme et le promoteur ce qui permet aux facteurs sigma bactériens de se lier aux promoteurs ne possédant pas l'élément -35. Ceci laisse à suggérer que probablement les facteurs SIG1 et SIG2 des plantes reconnaissent spécifiquement les promoteurs ayant des éléments -10 étendu en absence de l'élément -35. Toutefois les autres facteurs sigma (SIG3, SIG5 et SIG6) semblent ne pas avoir cette capacité.

De même, le domaine σ_4 des facteurs sigma est responsable de la liaison entre une partie de la sous unité β du core enzyme avec le promoteur via l'élément -35. Chez les plantes, les séquences des régions 4.1 et 4.2 sont assez conservées, quoique chaque facteur sigma présente des substitutions d'acides aminés différentes mais conservées au sein de chaque groupe d'orthologues. Ces substitutions pourraient influencer la liaison soit avec la séquence -35 du promoteur soit avec le core enzyme (Lysenko, 2007). En effet, pour le facteur SIG1 de la

moutarde, une mutation dans la région 4.2 altère sa liaison avec l'élément -35 du promoteur (Homann and Link, 2003).

Ainsi, selon la structure de ce domaine, chaque facteur sigma présenterait une affinité spécifique au promoteur. Ceci montre bien, l'existence de plusieurs paramètres susceptibles d'être à l'origine des différents modes de régulation de la transcription plastidiale.

En résumé, il est fort probable que les facteurs sigma des plantes agissent de la même manière que ceux des bactéries au niveau de l'interaction avec le core enzyme et/ou le promoteur. De plus, les paralogues des facteurs sigma chez les plantes présentent des variabilités dans leurs séquences d'acides aminés dans les régions conservés (Lysenko, 2007). De ce fait, les facteurs sigma des plantes pourraient présenter des affinités différentes pour le core enzyme, différents taux de transcription abortifs ainsi qu'une reconnaissance sélective des différents types d'éléments -10/-35 du promoteur eubactérien.

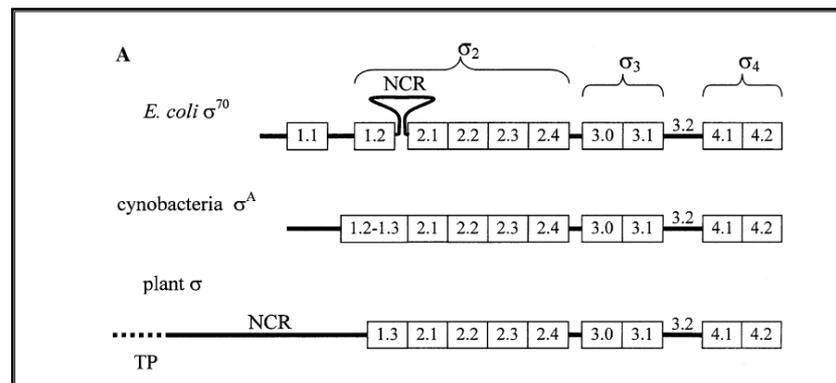


Figure 5 : Représentation schématique des facteurs sigma d'après Lysenko (2007).

5.2 Caractérisation par transcription *in vitro*

Des expériences de transcription *in vitro* utilisant des protéines recombinantes ont permis de démontrer que les gènes codant pour des facteurs sigma chez les plantes interviennent effectivement dans la transcription plastidiale. De ce fait, SIG1, SIG2 et SIG3 chez la moutarde et Arabidopsis ainsi que les facteurs SIG2 de maïs (ZmSIG2A et ZmSIG2B) sont capables de promouvoir une initiation spécifique de la transcription à partir de promoteurs PEP en interaction avec le core enzyme de l'ARN polymérase plastidiale (Suzuki et al., 2004) ou d'*E. coli* (Hakimi et al., 2000 ; Homann and Link, 2003). Rien n'est connu jusqu'à aujourd'hui concernant l'interaction directe entre les facteurs SIG4 et SIG6 avec un promoteur PEP de type σ^{70} *in vitro*.

Toutefois ces expériences de reconstitution du complexe holoenzyme et de transcription *in vitro* ont montré une variabilité concernant l'interaction des différents facteurs sigma selon le

promoteur PEP analysé. Cette différence de comportement des facteurs sigma semble varier selon les espèces (monocotylédones/dicotylédones) ou même selon les plantes étudiées (Arabidopsis ou moutarde). Prenons comme exemple les facteurs SIG1, SIG2 et SIG 3. Chez Arabidopsis, AtSIG2 et AtSIG3 s'associent au core enzyme d'E. coli et initient la transcription au promoteur *rbcL* (Hakimi et al., 2000) et *psbA* (Privat et al., 2003). AtSIG1 reconnaît ces promoteurs mais de manière plus faible. Chez la moutarde, ces facteurs se comportent différemment : SaSIG1 et SaSIG2 interagissent fortement avec le promoteur *rbcL* tandis que SaSIG3 le reconnaît, mais de manière plus faible (Homann and Link, 2003). Cette divergence qui existe entre Arabidopsis et la moutarde peut provenir du système de transcription hétérologue d'E. coli. En effet, si certains éléments régulateurs spécifiques à la PEP existent, ils ne pourraient pas interagir avec un tel système. Dans ce sens, Suzuki and Maliga, 2000, ont remplacé, chez le tabac, la sous unité α de la PEP avec celle du core enzyme d'E. coli, les plantes transplastomiques obtenues présentaient un phénotype blanchâtre comparable à celui des plantes déficientes en PEP (mutant Δ rhoA). Ceci montre bien que malgré son origine bactérienne, l'ARN polymérase plastidiale PEP, a acquis au cours de l'évolution des fonctions bien spécifiques mettant en œuvre probablement d'autres éléments régulateurs de la transcription. Une reconstitution *in vitro* en utilisant une forme purifiée active de la PEP avec les facteurs sigma apporterait alors des éléments de réponse plus fiables.

D'une manière générale, il est fort probable, d'après ces analyses de transcription *in vitro*, que les facteurs sigma ont aussi bien des fonctions spécifiques que redondantes. Toutefois la mise en évidence des fonctions redondantes a été réalisée grâce à des expériences de reconstitution *in vitro* en utilisant des facteurs sigma, ce qui ne reflète pas les conditions de compétition *in vivo*.

5.3 Localisation subcellulaire

Les facteurs sigma des plantes sont synthétisés dans le cytosol puis adressés au plaste *via* un peptide de transit situé dans leur région N-terminale. Ce peptide est donc responsable de l'adressage des facteurs sigma au chloroplaste, il est par la suite clivé libérant ainsi les facteurs sigma matures dans le plaste. L'adressage aux plastes a été démontré pour plusieurs facteurs sigma par fusionnement des régions N-terminales avec la protéine fluorescente GFP. Tel est le cas des facteurs AtSIG1, AtSIG2, AtSIG3 (Isono et al., 1997 ; Kanamaru et al., 1999) ; AtSIG5 (Yao et al., 2003) et AtSIG6 (Fujiwara et al., 2000) d'Arabidopsis.

De manière plus approfondie et grâce à des analyses immunologiques, il a été montré que AtSIG1, AtSIG2 sont localisés dans le stroma tandis que AtSIG3 est présent à la fois dans le stroma et les fractions membranaires (Privat et al., 2003).

De plus, pour certains facteurs sigma un double adressage aux plastes et aux mitochondries a été observé. Le facteur ZmSIG2B du maïs a été détecté par western blot et par fusion GFP à la fois dans les mitochondries et les chloroplastes (Beardslee et al., 2002). De plus le facteur ZmSIG2B semble jouer un rôle au niveau de la transcription dans la mitochondrie vu qu'il a été co-purifié avec l'ARN polymérase phagique mitochondriale RpoTm.

Un autre cas de double adressage a été aussi observé pour le facteur AtSIG5 d'Arabidopsis (Yao et al., 2003). On distingue deux transcrits *SIG5* obtenus grâce à un épissage alternatif de l'intron 1 du gène *Atsig5*. Chacun de ces transcrit peut être traduit indépendamment grâce à la présence de deux méthionines (M1 et M2, codon initiateur de la traduction). Des peptides traduits à partir de la deuxième méthionine M2, fusionnés à la protéine fluorescente GFP sont adressés exclusivement aux chloroplastes. Par contre ceux commençant par M1 se localisent au niveau des mitochondries. Le rôle du facteur sig5 dans les mitochondries est encore inconnu, cependant, dans le chloroplaste SIG5 est responsable de la transcription du gène *psbD* à partir du promoteur LRP (=Light Responsive Promoter) (Tsunoyama et al., 2004).

5.4 Profils d'expression

Chez *Arabidopsis thaliana*, les facteurs sigma sont exprimés très tôt : depuis l'imbibition jusqu'au sixième jour de développement. Les transcrits *SIG2* et *SIG5* sont présents dans les graines sèches (Demarsy et al., 2006). La protéine SIG3 est déjà présente dans la graine sèche contrairement à tout autre facteur sigma (Privat et al., 2003). Les protéines SIG2 et SIG1 commencent à apparaître vers le deuxième et troisième jour après imbibition.

L'expression précoce des facteurs sigma au cours du développement de la plante n'est pas spécifique d'Arabidopsis, elle a aussi été observée chez l'épinard. Demarsy et al., 2006, ont détecté dans les graines sèches d'épinard les transcrits *sig2* et *sig3* ainsi que la protéine SIG2. La quantité de transcrits et de protéines augmente au fur et à mesure de la croissance des plantules. La présence des facteurs sigma au cours des jeunes stades de développement est aussi corrélée avec l'expression des sous unités de la PEP. En effet, la PEP est déjà active pendant la phase de germination : elle assure la transcription de l'opéron *rrn* par l'intermédiaire du promoteur *rrnP2* au stade graine imbibée (Courtois et al., 2007). De plus

l'inhibition de l'activité PEP conduit à un retard de vitesse de germination des graines chez *Arabidopsis thaliana* (Demarsy et al., 2006).

Cependant l'expression des gènes plastidiaux transcrits par la PEP est majoritaire dans les tissus photosynthétiques de manière dépendante de la lumière. Ceci suggère que les facteurs sigma sont exprimés abondamment dans les tissus photosynthétiques.

En effet, la plupart des facteurs sigma sont transcrits majoritairement de manière lumière-dépendante dans les tissus verts (riches en chloroplastes) (Fujiwara et al., 2000 ; Isono et al., 1997). Chez *Arabidopsis* AtSIG1 est abondant dans les feuilles (Isono et al., 1997). AtSIG3 est présent dans les graines sèches, cotylédons et feuilles (Isono et al., 1997; Hakimi et al., 2000 ; Privat et al., 2003). AtSIG4 aussi est présent dans les feuilles, par contre il n'est pas exprimé dans les racines comme tout autre facteur sigma (sauf AtSIG5). AtSIG5 est exprimé de manière plus vaste : on le détecte dans les feuilles, tiges, siliques, fleurs et racines (Yao et al., 2003 ; Nagashima et al., 2004a ; Tsunoyama et al., 2004). AtSIG2 et AtSIG6 sont par contre plus abondants dans les feuilles et cotylédons (Isono et al., 1997 ; Privat et al., 2003 ; Loschelder et al., 2006).

On note ainsi que la majorité des gènes codant pour les facteurs sigma sont transcrits dans les feuilles vertes et très peu ou pas exprimés dans les racines. Cependant, certains facteurs sigma ont été détectés dans les tissus non-photosynthétiques. Le facteur AtSIG3 par exemple est présent dans les graines sèches ainsi que les plantes étiolées (Privat et al., 2003). Chez la moutarde, la protéine SaSIG3 est même plus abondante dans les plantes étiolées (Homman and Link, 2003). AtSIG5 est exprimée dans les racines et les fleurs (Yao et al., 2003 ; Nagashima et al., 2004a). Les facteurs ZmSIG2B et ZmSIG6 sont plus exprimés dans les tissus non-photosynthétiques (Lahiri and Allison, 2000 ; Beardslee et al., 2002).

En conclusion, la transcription plastidiale PEP-dépendante est plus active dans les chloroplastes mais peut aussi avoir lieu au niveau des plastes non photosynthétiques.

5.5 Fonctions

Nous avons souligné précédemment que les facteurs sigma peuvent avoir des fonctions redondantes au niveau de la transcription plastidiale *i.e.* ils peuvent reconnaître un même promoteur *in vitro* (Hakimi et al., 2000; Homman and Link, 2003 ; Privat et al., 2003). Toutefois ces fonctions ont toujours été démontrées grâce à des expériences de transcription *in vitro* réalisées en absence de compétition avec d'autres facteurs sigma. Si les facteurs sigma

présentent chacun des fonctions spécifiques, ceci sera décelé par des expériences qui reflètent les conditions de compétition *in vivo*, grâce à l'analyse de mutants nuls de facteurs sigma. En effet, ces dernières années plusieurs mutants d'*Arabidopsis* ayant des insertions d'ADN-T dans des gènes codant pour les facteurs sigma ont été obtenus. Leur caractérisation a permis de déceler le rôle des facteurs sigma dans la transcription plastidiale. Nous allons aborder par ordre chronologiques, les études récentes de mutants nuls de facteurs sigmas publiés chez *Arabidopsis thaliana*.

5.5.1 AtSig2

Les mutants déficients en SIG2 présentent un phénotype vert pâle dû à une diminution d'accumulation de la chlorophylle ainsi que des protéines photosynthétiques (Shirano et al., 2000 ; Kanamaru et al., 2001 ; Privat et al., 2003). L'analyse de l'accumulation des transcrits plastidiaux dans les mutants Δ SIG2 a montré une augmentation des transcrits NEP et une nette diminution du transcrit *psaJ* (Nagashima et al., 2004b).

De plus une diminution de sept gènes codant pour des ARNt a été observée (*trnE*, *trnY*, *trnD*, *trnM*, *trnVs* et *trnG*). Il a été suggéré que le phénotype vert pâle peut être relié directement à la diminution de synthèse de l'ARNt glutamate (gène *trnE*). Cet ARNt joue un rôle important dans le métabolisme plastidial : il est à la fois impliqué dans la traduction et dans la voie de biosynthèse des chlorophylles (Kanamaru et al., 2001).

5.5.2 AtSig5

Deux mutants du facteur sigma 5 ont été caractérisés (Yao et al., 2003 ; Nagashima et al., 2004a). L'étude réalisée par Nagashima et al., 2004a, attribue au facteur sigma 5 d'*Arabidopsis* un rôle dans la réponse au stress ainsi qu'une reconnaissance spécifique du promoteur BLRP de l'opéron *psbD*. Cet opéron code les protéines D2 et CP43, constituants majeurs du photosystème II. Ce promoteur est induit principalement suite à une irradiation par la lumière bleue et indirectement sous des conditions de stress (osmotique, salin etc). Ainsi, le facteur SIG5 pourrait participer à la réparation du centre réactionnel du photosystème II endommagé après photoinhibition (inhibition de la photosynthèse causée par de trop fortes intensités lumineuses), par l'activation de la transcription de D2.

L'autre mutant Δ SIG5 décrit par Yao et al., 2003, montre un phénotype d'embryo-léthalité à l'état homozygote. Cette même équipe a démontré un double adressage du facteur sigma 5 au plaste et à la mitochondrie. De plus, vu la différence entre les deux mutants (au niveau de

l'insertion de l'ADN-T) on pourrait imaginer que ce phénotype est lié au rôle du facteur SIG5 dans la mitochondrie.

5.5.3 AtSig4

Le mutant Δ SIG4 a été obtenu et analysé dans notre laboratoire par Favory et al. (2005). Ce mutant ne présentait aucun phénotype apparent dans les conditions normales de culture. L'analyse par une approche transcriptomique a pu montrer une absence du transcrit *ndhF* dans le mutant ce qui déstabilise par conséquent tout le complexe *ndh* chez *Arabidopsis*.

Le facteur sigma 4, jusqu'à présent identifié uniquement chez *Arabidopsis thaliana*, joue un rôle spécifique pour l'expression du gène *ndhF* dans l'expression du plastome.

5.5.4 AtSig6

Le mutant déficient pour le facteur sigma 6 présente quant à lui un phénotype vert pâle tout comme Δ SIG2 mais spécifique des cotylédons (Ishizaki et al., 2005 ; Loschelder et al., 2006). Ce phénotype est dû principalement à la diminution de la transcription des gènes liés à la photosynthèse dans les jeunes stades du développement (3 à 5 jours de développement).

Le facteur SIG6 semble jouer un rôle primordial (en assurant une activité PEP nécessaire) au cours des jeunes stades de développement des plastes. Toutefois, le fait que les plantes Δ SIG6 retrouvent un phénotype « sauvage » au-delà du 8^{ème} jour de développement, suggère que d'autres facteurs sigma sont capables de remplacer le facteur SIG6 au niveau de la transcription. En revanche, l'étude d'un autre mutant Δ SIG6 (Loschelder et al., 2006), montre qu'en plus de son rôle précoce dans les jeunes stades du développement, SIG6 joue un rôle spécifique et persistant tout au long du développement de la plante qui se manifeste au niveau de l'accumulation des transcrits de l'opéron *atpB/E* et du gène *trnV*.

5.5.5 OsSig1

Des mutants du facteur SIG1 ont été obtenus chez le riz (Tozawa et al., 2007). Ces mutants présentent un phénotype vert pâle dû à une diminution du taux de chlorophylle. L'analyse de l'expression de gènes plastidiaux a montré une spécificité de reconnaissance de l'opéron *psaA* par le facteur OsSig1. De ce fait, il est suggéré que le facteur sigma 1 joue un rôle important au niveau de la maintenance de l'activité du photosystème I chez le riz (Tozawa et al., 2007).

5.6 Spécificité du facteur sigma 3

SIG3 est le seul facteur sigma déjà présent dans les graines sèches d'*Arabidopsis* (Privat et al., 2003) ce qui suggère un rôle précoce et précis au cours du développement de la plantule. De plus, il a été montré que l'activité de la protéine SIG3 est modulée par un attachement à la membrane ce qui suggère une activation de la transcription du complexe SIG3-PEP holoenzyme selon le stade de développement (Hakimi et al, 2000). Ceci peut aussi être attribué à la structure particulière de la protéine SIG3. En effet, ce facteur sigma est homologue au facteur sigma SIG K de *Bacillus subtilis* au moins au niveau d'un domaine, dit domaine d'inhibition. Chez *B. subtilis*, cette région doit être clivée pour permettre une activation de la transcription via le facteur SIG K. Des analyses de transcription *in vitro* confirment cette hypothèse concernant le facteur SIG3. En effet, en utilisant plusieurs constructions de la protéine SIG3, il a été démontré que la partie N-terminale de SIG3 contient un domaine inhibant la transcription chez *Arabidopsis* (Hakimi et al., 2000) et la moutarde (Homman and Link, 2003). Cependant aucune évidence le clivage protéolytique de la protéine n'a été démontrée chez *Arabidopsis*.

Nous nous sommes intéressé alors, au niveau de ce travail à l'étude de la fonction du facteur SIG3 d'*Arabidopsis*, par la caractérisation de mutants d'insertion d'ADN-T du « Salk Institute Genomic Laboratory ».

6 Contrôle post-transcriptionnel de l'expression génique dans le plaste

L'élément déterminant de l'expression génique dans le plaste outre la transcription serait la stabilité de l'ARNm transcrit. Certes, une fois transcrit, les ARNm plastidiaux subissent plusieurs événements de maturation qui déterminent leur stabilité ainsi que leur taux d'accumulation (steady-state level).

Nous présenterons ici brièvement quelques éléments connus concernant les processus de maturation et de stabilité des ARNm plastidiaux.

6.1 Maturation et stabilité des transcrits plastidiaux

Pendant leur maturation (ou processing) les ARNm nouvellement synthétisés subissent une série de modification touchant leur extrémité 5' et 3'. En plus pour certains gènes plastidiaux possédant des introns, les ARNm doivent être épissés. La plupart de ces réactions sont effectuées par des enzymes appelées ribonucléases. Ces dernières sont de deux types différents : les exonucléases éliminent des nucléotides se trouvant soit à l'extrémité 5' ou 3' ; les endonucléases coupent à l'intérieur de l'ARNm. Ces ribonucléases sont responsables du processing ainsi que de la dégradation des ARNm.

Il a été démontré que les endonucléases plastidiales possèdent au moins deux activités : la formation de l'extrémité 3' et l'initiation de la dégradation de l'ARNm en déstabilisant la structure épingle à cheveux (pour réf. voir, Monde et al., 2000).

Plusieurs exonucléases ont été découvertes dans le plaste ayant des activités 3'→5' permettant la formation de l'extrémité 3' mature sous forme d'une structure en épingle à cheveux (ou tige-boucle) tel que la Polynucléotide phosphorylase ou PNPase. Elle participe aussi à la dégradation des ARNm plastidiaux polyadénylés. Cette activité est très connue chez les procaryotes. Une autre activité 5'→3' (n'existant pas chez les procaryotes) a été découverte dans le chloroplaste, plus précisément grâce à un mutant nucléaire de *Chlamydomonas mcd1* (Drager et al., 1998).

La formation des deux extrémités 5' et 3' d'un transcrit plastidial est donc très importante vu leur rôle au niveau du processing et de la stabilité. Nous aborderons ces différents aspects plus en détails ci-dessous.

6.1.1 Rôle de l'extrémité 5' UTR

Un gène plastidial peut présenter plusieurs transcrits différents par leurs extrémités 5'. Ces transcrits sont issus soit d'une initiation de la transcription soit suite à un phénomène de maturation ou processing. Contrairement aux transcrits nucléaires, ces transcrits ne possèdent pas de coiffe à leur extrémité 5'. Sachant que les ARNm plastidiaux néosynthétisés possèdent en leur extrémité 5' un groupement tri ou di phosphate, on pourrait les marquer spécifiquement en leur rajoutant une coiffe *in vitro* avec la guanyltransférase et du GTP marqué. Les transcrits maturés en 5' possèdent un groupement hydroxyl qui ne peut pas être marqué. Cette technique dite de « *capping in vitro* » permet de déterminer l'origine des transcrits selon leur extrémités 5'.

Ces extrémités 5' de l'ARNm constituent un élément déterminant pour la stabilité du transcrit plastidial. Certes, plusieurs études réalisées chez *Chlamydomonas* montrent l'existence de facteurs nucléaires interagissant avec la région 5'UTR (transcrite non traduite) pour stabiliser l'ARNm. D'autres éléments déterminants la stabilité du transcrit au niveau de la région 5'UTR sont les structures secondaires de l'ARN et les protéines liant l'ARN. L'étude structurale *in vitro* de la région 5'UTR de l'ARNm *petD* montre l'existence d'une petite structure d'épingle à cheveux essentielle pour la stabilité du messager ainsi que sa traduction (Higgs and al., 1999).

Il a toujours été présumé que ces structures secondaires (épingle à cheveux ou tige-boucle) protègent l'ARNm de la dégradation en recrutant des protéines empêchant les ribonucléases de se fixer sur le brin d'ARNm. Un autre mécanisme de stabilisation du transcrit par les structures secondaires a été démontré par Suay et al. (2005) *in vivo* pour la région 5'UTR du transcrit *rbcL* chez *Chlamydomonas*. La structure tige-boucle formée dans le 5'UTR permet de modifier la conformation de l'ARN de manière à former une structure particulière lui permettant de se protéger contre l'action des RNases.

6.1.2 Rôle de l'extrémité 3'UTR

Une des caractéristiques des ARNm plastidiaux est la présence de séquences nucléotidiques inversées répétées (IR) au niveau de l'extrémité 3'UTR qui en s'hybridant forment des structures d'épingles à cheveux. Il a été admis que l'extrémité 3'UTR se forme suite à deux événements : un clivage endonucléolitique et une excision par une exonucléase en 3' → 5' (Stern and Kindle, 1993 ; Hayes et al., 1996).

Ces structures existent aussi dans les transcrits bactériens. Chez *E. coli*, ils jouent un rôle dans la stabilité de l'ARNm et peuvent agir comme terminateur de la transcription (pour revue voir Monde et al., 2000). Dans le chloroplaste par contre, ces séquences inversées répétées sont plutôt des éléments de processing et de stabilité des ARNm. Ils n'interviennent pas dans la terminaison de la transcription (Stern and Gruissem, 1987). D'ailleurs rien n'est vraiment connu jusqu'à aujourd'hui concernant la terminaison de la transcription dans le chloroplaste. Il est fort probable que l'ARN polymérase continue à transcrire les gènes de manière systématique d'où l'importance des événements post-transcriptionnel tels que le processing au niveau de la régulation de l'expression génique du plaste.

En effet, la région 3'UTR joue un rôle important dans le processing des transcrits plastidiaux. Plusieurs protéines appelées CSP (*Chloroplast Stem-loop binding protein*) ayant des activités endonucléolytiques interagissent avec la structure tige-boucle du 3'UTR au niveau de l'ARN pre-messenger et participent ainsi à leur maturation (cas des protéines CSP41, CSP55 et CSP29 impliqués dans la maturation du 3'UTR du transcrit *petD* d'épinard ; pour revue voir Monde et al., 2000). En plus de ces protéines impliquées dans la maturation de l'extrémité 3'UTR, d'autres facteurs protéiques ont été mis en évidence, ils pourraient jouer un rôle au niveau de la stabilité de l'ARNm et/ou de sa traduction (Memon et al., 1996).

6.1.2.1 Polyadénylation

La polyadénylation des ARNm chloroplastiques est un mécanisme connu depuis plus de 30 ans (Haff and Bogorad, 1976). Elle a lieu au niveau de l'extrémité 3' de l'ARNm suite à l'action d'une enzyme spécifique la PNPase qui a aussi une activité exonucléase (Yehudai-Resheff et al., 2001, Bollenbach et al., 2004).

Ce mécanisme est responsable de la dégradation de l'ARNm plastidial. Il a été démontré que la polyadénylation a lieu 50 fois moins au niveau du 3'UTR mature qu'au niveau des sites internes. Ceci suggère que la structure tige-boucle caractéristique de l'extrémité 3' mature de l'ARNm plastidial, en plus de son rôle dans la protection contre les exonucléases, permet de bloquer le processus de polyadénylation renforçant ainsi la stabilité du transcrit (Lisitsky et al., 1996 ; Bollenbach et al., 2004).

6.1.3 Processing intercistronique

Comme chez les bactéries, les gènes plastidiaux sont organisés en unités de transcription polycistroniques ou parfois appelés opérons. La plupart des transcrits polycistroniques sont maturés en unité mono ou dicistronique probablement par un clivage endonucléolytique spécifique (Sugita and Sugiura, 1996). L'opéron *psbE* (*psbE*, *psbF*, *psbL* et *psbJ*) compte parmi les exceptions, il est transcrit en un seul ARNm tétracistronique de 1,1 Kb qui n'est pas maturé (Carrillo et al., 1986; Willey and Gray, 1989).

La question qui se pose alors est quelle est la signification d'un tel événement dans le chloroplaste vu que chez les bactéries toutes les protéines peuvent être traduites à partir d'un long transcrit polycistronique ?

Des études faites sur la région intergènique *psaC-ndhD* en utilisant des systèmes de traduction *in vitro*, ont montré que le transcrit dicistronique ne permet pas la traduction des protéines PsaC et ndhD (Hirose and Sugiura, 1997). Les données obtenues suggèrent que le processing intercistronique inhibe la formation de certaines structures secondaires qui empêchent l'assemblage des ribosomes pour initier la traduction de l'ARNm.

D'une manière générale, le processing intercistronique est indispensable pour la traduction de l'ARNm dans le chloroplaste. Ceci a été démontré pour plusieurs transcrits : *psbH* chez *Arabidopsis* (Felder et al., 2001 ; Meierhoff et al., 2003) et *petD* chez le maïs (Barkan et al., 1994).

6.2 Régulation de la traduction

6.2.1 Rôle du 3' et 5' UTR

La régulation de l'expression des gènes plastidiaux se fait par l'intermédiaire d'une interaction (directe ou indirecte) de facteurs nucléaires avec le 5'UTR des ARNm plastidiaux. Quoique la région 3'UTR soit indispensable pour la stabilité des ARNm plastidiaux, l'efficacité de la traduction est attribuée en grande partie au 5'UTR indépendamment de la nature du 3'UTR (Barnes et al., 2005). Toutefois, il a été suggéré par Katz and Danon (2002) qu'il existe une contribution du 3'UTR au niveau de la traduction par l'augmentation de la stabilité de liaison des facteurs *trans* au 5'UTR. Les séquences situées en amont du codon initiateur semblent jouer un rôle dans la traduction de certains transcrits plastidiaux tels que (*rbcL*) mais n'a aucun effet sur d'autres tels que *atpB* (Kuroda and Maliga, 2001).

De plus les séquences nucléotidiques autour du codon initiateur ont un impact sur la traduction de certains ARNm. Tel est le cas du transcrit *petD* où un mécanisme d'interaction codon-anticodon a été mis en évidence entre une adénine située à la position -1 de l'ARNm et le nucléotide situé au -37 du 3' de l'ARNt (Met) (Esposito et al., 2003).

Plusieurs travaux sur les mécanismes de régulation de la traduction de transcrits plastidaux ont été entrepris ces dernières années pour divers transcrits plastidiaux. D'une manière générale, la traduction d'un gène plastidial peut être régulée au niveau de l'extrémité 5' par l'intermédiaire soit de facteurs nucléaires soit d'autres éléments agissant en *cis* (Marín-Navarro et al., 2007).

6.2.2 Autorégulation de la traduction

Le taux de synthèse de certaines protéines plastidiales est sous le contrôle d'un processus de régulation dépendant de leur assemblage, appelé CES « Control by Epistasy ». Ce mécanisme concerne l'assemblage de complexes protéiques formés de plusieurs sous-unités. Dans plusieurs complexes, en absence d'une sous unité les autres sont soit non synthétisées soit dégradées (Marín-Navarro et al., 2007).

7 Projet de thèse

L'expression des gènes plastidiaux met en jeu deux systèmes de transcription d'origine différentes : le système procaryotique PEP et le système phagique NEP.

La transcription réalisée par l'ARN polymérase PEP s'effectue par la suite d'une interaction des facteurs de transcription de type sigma avec le core enzyme de l'ARN polymérase PEP. Cette interaction permet la reconnaissance spécifique des promoteurs PEP des gènes plastidiaux. Chez *Arabidopsis thaliana* six facteurs sigma ont été identifiés. Plusieurs études ont été réalisées récemment visant à comprendre leur rôle au niveau de la transcription plastidiale. Néanmoins la fonction de certains d'entre eux (SIG1 et SIG3) restait largement méconnue au moment où j'ai commencé ma thèse.

Nous nous sommes intéressée à l'étude de la fonction de la protéine SIG3 *in vivo* chez *Arabidopsis* par l'intermédiaire de mutants d'insertion d'ADN-T dans le gène *SIG3*. Cette étude vise à comprendre le rôle du facteur de transcription plastidial Sigma 3 au niveau de l'expression du génome plastidial en déterminant le ou les gènes cibles du complexe PEP/SIG3.

Chapitre I

Caractérisation du mutant homozygote *sig3*

1 Caractérisation du mutant homozygote *sig3*

1.1 Obtention du mutant homozygote *sig3*

Nous avons recherché des mutants *sig3* dans la banque de mutants d'Arabidopsis, par insertion d'ADN-T, du « Salk Institute Genomic Laboratory » (<http://signal.salk.edu/>). Deux mutants ont été identifiés et commandés : l'un possédant une insertion au niveau de la bordure de l'exon 2 (mutant *sig3-2*) et l'autre dans l'exon 4 (mutant *sig3-4*) (fig 6).

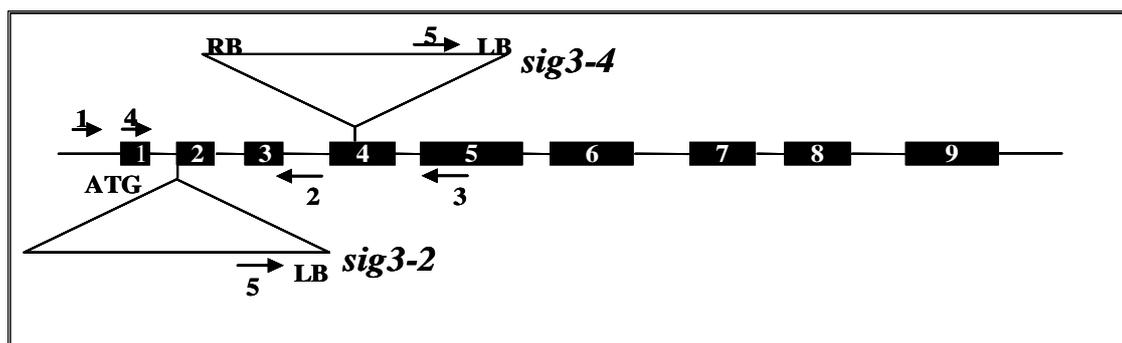


Figure 6 : Représentation schématique du gène sigma 3 d'*Arabidopsis thaliana* avec les insertions de l'ADN-T pour chacune des lignées étudiées *sig3-2* et *sig3-4*. Les carrés noirs représentent les différents exons du gène. Les amorces utilisées pour le criblage par PCR des mutants sont représentées par des flèches. RB : bordure droite ; LB : bordure gauche.

Une fois les graines obtenues, nous les avons semées pour analyser la descendance. Par construction, l'ADN-T présent dans les plantes mutantes devrait contenir un gène de résistance à la kanamycine. Cependant la première observation que nous avons faite était que les lignées mutantes sont toutes sensibles. Nous avons pu néanmoins amplifier par PCR la bordure gauche de l'ADN-T au niveau du gène *SIG3* ce qui montre bien la présence d'un ADN-T mais probablement tronqué ou présentant une mutation du gène de résistance à la kanamycine.

Le génotypage des plantes mutantes a donc été entrepris essentiellement par PCR : pour identifier les mutants hétérozygotes on a utilisé des amorces situées sur la bordure de l'ADN-T et du gène *SIG3* (amorces 2-5 pour *sig3-2* et 3-5 pour *sig3-4*) ainsi que les amorces situées sur le gène (amorces 1-2 pour *sig3-2* et 4-3 pour *sig3-4*). Nous avons ainsi isolé des mutants hétérozygotes et homozygotes (fig 7A). Nous avons confirmé l'absence d'expression du gène *SIG3* par RT-PCR chez les mutants homozygotes (fig7B). Les plantes homozygotes pour l'insertion d'ADN-T dans *SIG3* ne montrent aucun phénotype apparent. Toutefois, rien ne peut exclure la présence d'autres insertions d'ADN-T dans le génome des mutants ou bien de mutations ponctuelles résultant de la transformation dans les lignées *sig3-2* et *sig3-4*. Pour

écarter ces hypothèses, des croisements en retour ont été effectués en utilisant des plantes hétérozygotes pour l'insertion comme mâles et des plantes sauvages comme femelles. La descendance hétérozygote ou homozygote a été sélectionnée uniquement par PCR (vu l'absence de phénotype et de résistance à la kanamycine).

Après deux croisements successifs, on a pu isoler un mutant homozygote *sig3* (présentant deux allèles mutés du gène) pour chacune des lignées.

Ce travail a été réalisé pendant mon stage de Master2 sous la direction de Régis Mache et en collaboration avec Annick Cottet.

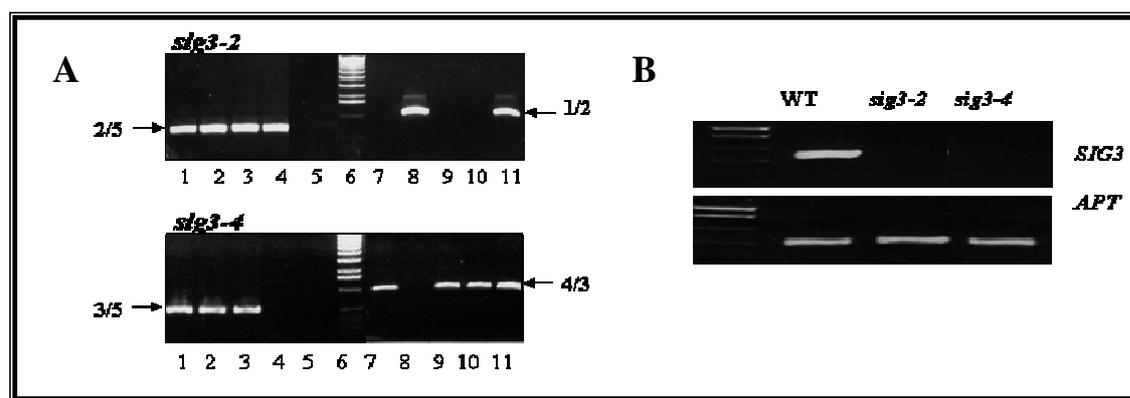


Figure 7 : Identification des mutants homozygotes *sig3*. (A) Criblage des mutants par PCR. La présence de l'ADN-T a été vérifiée en utilisant les deux paires d'amorces 2/5 pour *sig3-2* et 3/5 pour *sig3-4*. La présence d'une copie sauvage du gène *SIG3* a été vérifiée par les amorces 1/2 et 3/4, respectivement, pour les deux lignées *sig3-2* et *sig3-4*. En conclusion, concernant la lignée *sig3-2*, trois plantes homozygotes (voir pistes 1, 3 et 4 et 7,9 et 10) ont été sélectionnées tandis que pour la lignée *sig3-4* une seule plante homozygote a été sélectionnée (voir pistes 2 et 8). (B) Analyse de l'expression du gène *SIG3* chez les mutants homozygotes *sig3-2* et *sig3-4*. L'expression du gène *SIG3* a été analysée par RT-PCR chez la plante sauvage (WT) et les mutants *sig3-2* et *sig3-4* en utilisant les amorces 3/4. L'expression du gène *APT* est utilisée comme contrôle.

1.2 Phénotype du mutant *sig3*

Nous avons choisi d'analyser les mutants homozygotes obtenus de la lignée *sig3-4*. Ces mutants homozygotes ont été cultivés *in vitro* sur un milieu de culture gélosé ou directement en terre. Dans les conditions normales de culture (16h lumière/8h obscurité), aucune différence n'a été observée entre les lignées mutantes et les plantes sauvages du même âge (fig 8).

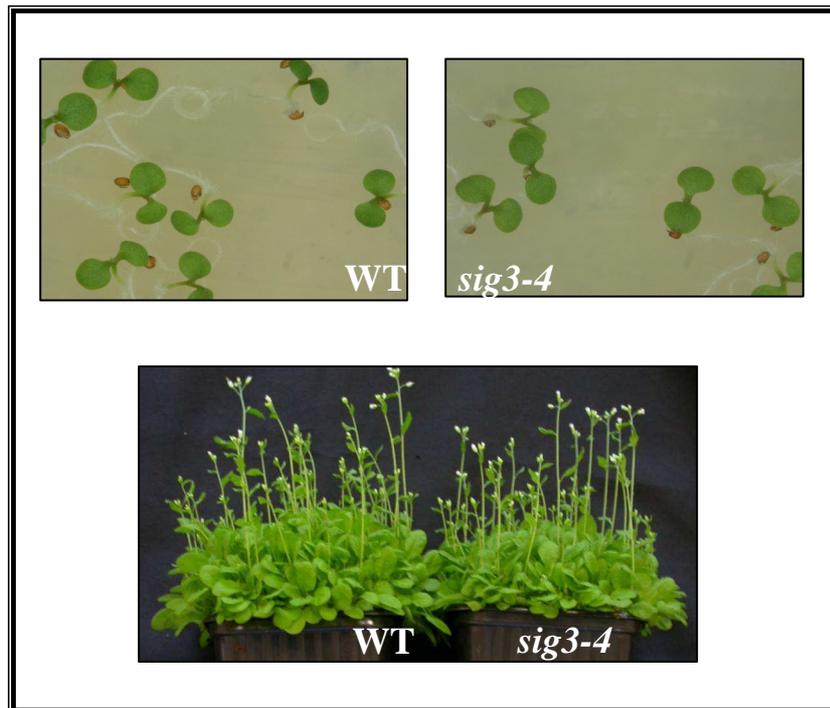


Figure 8 : Comparaison du mutant *sig3-4* et des plantes sauvages (wt Col).

(A) plantules cultivées *in vitro* âgées de 6 jours

(B) plantes âgées d'un mois obtenues à partir de graines semées en terre et cultivées sous des conditions normales (éclairage 16h/8h ; $110 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

2 Comparaison de l'accumulation des transcrits plastidiaux dans les plantes sauvages et mutantes par analyse avec une puce à ADN

En absence de phénotype apparent au niveau des mutants *sig3*, nous avons fait le choix d'adopter une approche globale nous permettant d'avoir un aperçu général de l'effet de la mutation du gène *SIG3* sur la transcription plastidiale. Cette technique consiste à analyser le profil d'accumulation des transcrits plastidiaux dans le mutant *sig3* par puce à ADN.

Plusieurs choix de puce à ADN se présentaient alors à l'époque. Les puces commerciales telles que affymetrix sont plutôt orientées pour l'étude d'expression des gènes nucléaires. Deux puces à ADN spécifiques des plastes ont été conçues dans les laboratoires du Dr. K.Tanaka (Nagashima et al., 2004 b) et du Dr. R.M Maier (Legen et al., 2002). Ces puces à ADN permettent de détecter exclusivement les transcrits plastidiaux. Leur stratégie est basée sur l'utilisation comme sondes (déposées sur la membrane), des fragments d'ADN double brin, obtenus par PCR, spécifiques des gènes plastidiaux. Cette stratégie présente néanmoins quelques inconvénients. En effet, le génome plastidial a la particularité de posséder deux brins codants. Les gènes plastidiaux sont dispersés sur ces deux brins d'ADN. Ainsi, la

transcription d'un gène situé sur un brin d'ADN et d'un autre gène voisin mais situé sur le brin opposé peut produire des ARN complémentaires ou antisens. Cette caractéristique rend difficile l'interprétation des résultats de ces puces à ADN double brin, surtout si l'ADN s'hybride avec des transcrits provenant des deux brins d'ADN plastidial. Ainsi, on ne pourra jamais distinguer entre l'accumulation d'un transcrit plastidial sens vis-à-vis de son antisens.

En tenant compte de ces observations, notre laboratoire a fait le choix de développer une puce à ADN (ou macroarray), plaste-spécifique permettant d'étudier de manière sensible et assez précise l'expression des gènes plastidiaux sens et antisens. Pour cela la stratégie suivante a été adoptée.

2.1 Stratégie adoptée

Nous avons choisi au laboratoire des oligonucléotides simple brin de 60 bases correspondant aux transcrits de 79 gènes plastidiaux codant des protéines ainsi que leur antisens. Ils ont été choisis dans les 200 nucléotides après l'ATG et ils ont un Tm similaire. Par l'intermédiaire de la société Eurogentec, nous avons obtenus des membranes de nitrocellulose sur lesquelles sont déposés ces oligonucléotides en duplicata (voir fig 9).

Le choix d'utiliser comme sonde des oligonucléotides simple brin, permet d'analyser l'expression des transcrits plastidiaux sens en même temps que leur antisens en utilisant comme cibles, des ADNc marqués radioactivement obtenus par rétro-transcription de l'ARN en utilisant un mélange d'amorces spécifiques des gènes plastidiaux.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
a	L23	PsbB	ndhB	Rpl33	Rps7	psaJ	Ycf5	petG	Rpl32	petL	L2	petA	petD	cemA	petB	Ycf4	psbH	psal	psbT	Rbcl
b	psbZ	Orf77	psbC	Rps15	psbD	ndhH	petN	ndhA	psbI	ndhI	psbK	ndhG	Rps18	ndhE	accD	psaC	Rps12	ndhD	Ycf2	ndhF
c	Ycf1	psbN	Rps19	clpP	Rpl22	Rpl20	Rps3	psbE	Rpl16	psbF	Rps14	psbL	Rps8	psbJ	Rpl36	atpB	Rps11	atpE	rpoA	ndhC
d	ndhK	rpoC2	ndhJ	Rps2	Rps4	atpI	Ycf3	atpH	psaA	atpF	psaB	atpA	Rps14	Rps16	psbM	matK	rpoB	psbA	rpoC1	
e	L23	PsbB	ndhB	Rpl33	Rps7	psaJ	Ycf5	petG	Rpl32	petL	L2	petA	petD	cemA	petB	Ycf4	psbH	psal	psbT	Rbcl
f	psbZ	Orf77	psbC	Rps15	psbD	ndhH	petN	ndhA	psbI	ndhI	psbK	ndhG	Rps18	ndhE	accD	psaC	Rps12	ndhD	Ycf2	ndhF
g	Ycf1	psbN	Rps19	clpP	Rpl22	Rpl20	Rps3	psbE	Rpl16	psbF	Rpl14	psbL	Rps8	psbJ	Rpl36	atpB	Rps11	atpE	rpoA	ndhC
h	ndhK	rpoC2	ndhJ	Rps2	Rps4	atpI	Ycf3	atpH	psaA	atpF	psaB	atpA	Rps14	Rps16	psbM	matK	rpoB	psbA	rpoC1	

Figure 9 : Plan du macroarray utilisé pour l'analyse de l'expression des gènes plastidiaux chez *Arabidopsis thaliana*.

Des oligonucléotides de 60 bases ont été déposés sur une membrane de nitrocellulose correspondant à chacun des 79 gènes plastidiaux pouvant s'hybrider à la fois avec des ADNc provenant des transcrits sens (nom du gène en bleu) ou les ADNc provenant des transcrits antisens (nom du gène en noir). Chaque dépôt est réalisé en duplicata.

2.2 Conditions expérimentales

En premier temps nous avons mis au point les différentes conditions d'hybridation du macroarray. Nous avons choisi d'utiliser comme matériel de départ de l'ARN extrait à partir de plantules âgées de 6 jours. Les plantules d'*Arabidopsis* à ce stade sont en pleine croissance et en activité photosynthétique. Ainsi, la majorité des gènes plastidiaux devrait être suffisamment exprimés. Nous avons testé deux quantités d'ARN de départ 2 μ g et 4 μ g (ces ARNs ont été préalablement traités à la DNase). Les ADNc obtenus ont été dénaturés puis hybridés avec les macroarrays à 65°C pendant 24h ou 72h. Après hybridation les membranes sont exposées pendant 15 jours sur des écrans photosensibles. Le signal radioactif est par la suite numérisé par un lecteur laser de phosphorescence (*phosphoimager*) qui permet l'obtention d'une image numérique des membranes. L'image est ensuite analysée par le logiciel *Array Gauge* qui permet de déterminer la valeur relative d'intensité du signal de chaque spot. Néanmoins, le bruit de fond des membranes constitue un facteur important qui peut facilement biaiser l'interprétation des données. Nous avons ainsi traité les différentes valeurs obtenues avec un autre logiciel *R* spécialement programmé à notre fin par Sylvain Lemeille, pour soustraire la valeur du bruit de fond entourant chaque spot de l'intensité calculée par le logiciel *Array Gauge*. L'analyse des résultats est ensuite poursuivie avec le logiciel Excel.

Nous avons constaté que 4 μ g d'ARN extraits de plantules âgées de 6 jours, traités à la DNase, rétro-transcrits en présence d'un déoxynucléotide triphosphate radioactif en utilisant comme amorces un mélange contenant des oligonucléotides spécifiques de chaque ARNm plastidial hybridés aux membranes pendant 72h à 65°C, constituent les conditions optimales d'utilisation de notre puce à ADN.

Une fois les conditions optimales d'hybridation et d'analyse des données mises au point, nous avons entrepris l'analyse du profil d'expression des gènes plastidiaux dans le mutant *sig3* en les comparant avec le sauvage (WT) du même écotype. Nous avons cultivé les plantes simultanément dans les mêmes conditions puis extrait les ARN au même stade physiologique (6 jours) pour réaliser l'hybridation sur puces. Une fois les ADNc marqués obtenus pour chaque échantillon et dans le but d'éliminer les variabilités dues aux conditions de marquage (tel que l'efficacité de la Reverse transcriptase etc.), nous avons mesuré la radioactivité incorporée dans chaque échantillon. Pour vérifier la qualité des ADNc obtenus, une fraction de chaque échantillon a été analysée par électrophorèse sur un gel dénaturant de polyacrylamide et autoradiographie (voir fig 10A). L'hybridation des puces est réalisée par la

suite en utilisant pour chaque échantillon la même quantité de radioactivité incorporée dans les ADNc.

Ces expériences ont été réalisées avec trois répétitions indépendantes. Les résultats numériques (valeurs correspondantes aux intensités des spots correspondant aux gènes plastidiaux) ont été groupés et analysés.

2.3 Analyse des résultats obtenus par puce à ADN

Comme nous l'avons indiqué précédemment, les résultats obtenus ont été présentés sous deux formes : images numériques reflétant le profil d'accumulation des transcrits plastidiaux et valeurs des intensités des différents spots.

Nous allons, tout au long de l'analyse des résultats obtenus, nous intéresser à la comparaison du taux d'accumulation des transcrits « sens » correspondant aux gènes plastidiaux étudiés (réservant l'étude des transcrits antisens pour d'autres travaux).

Déjà à l'œil nu, nous avons remarqué une nette diminution du transcrit *psbN* dans le mutant *sig3*. Le transcrit *atpH* semble aussi diminuer dans le mutant mais de manière moins forte que *psbN* (voir fig 10B, carrés bleu).

Pour affiner ces observations, les valeurs des intensités des spots des trois expériences ont été normalisées. Nous avons tout d'abord fait la moyenne des valeurs des deux spots de chaque répétition. Puis, la somme des valeurs d'intensité des signaux a été calculée pour chacune des membranes. Le rapport de la somme la plus élevée détermine un coefficient qui est ensuite appliqué à l'ensemble des spots afin de normaliser les valeurs des intensités.

Nous avons ainsi obtenu en valeur numérique les intensités correspondantes à l'expression des différents gènes plastidiaux dans le mutant *sig3* et les plantes sauvages. Pour déterminer les différences qui existent au niveau de l'accumulation des différents transcrits analysés, nous avons effectué le rapport des valeurs des intensités des transcrits du mutant *sig3* par rapport à ceux des plantes sauvages. Au final nous avons calculé l'écart type pour chacune des valeurs. Les résultats obtenus sont dressés dans le tableau suivant (tableau1).

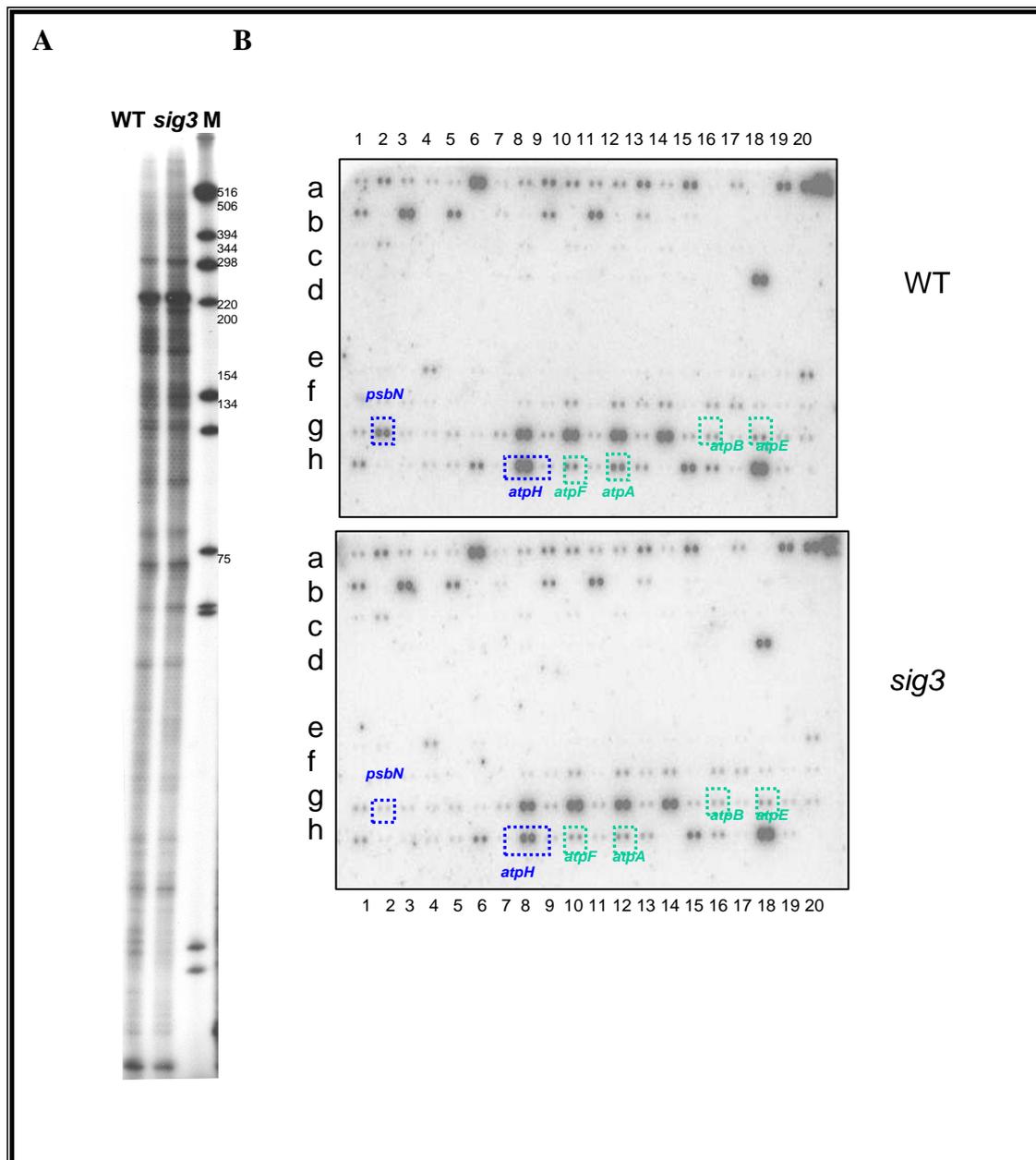


Figure 10 : Analyse des sondes ADNc radioactives et résultats de l'hybridation des macroarrays.

(A) Les ADNc radioactifs correspondant à chaque transcrite plastidial (sens et antisens) synthétisés à partir des ARN extraits du mutant *sig3* et du sauvage WT (même quantité de radioactivité) sont séparés sur un gel d'acrylamide dénaturant puis visualisés par autoradiographie.

(B) Images des membranes hybridées avec les ADNc du mutant *sig3* et du sauvage WT. La même quantité de radioactivité a été utilisée pour chaque échantillon.

<i>Gene name</i>	<i>Ratio sig3/WT</i>	<i>Gene name</i>	<i>Ratio sig3/WT</i>	<i>Gene name</i>	Ratio sig3/WT
psbN	0.49±0.46	ndhE	0.96±0.25	petN	1.08±0.21
atpH	0.64±0.20	psaJ	0.97±0.09	rps12	1.09±0.33
atpA	0.72±0.17	psbI	0.97±0.15	rpl16	1.09±0.03
atpF	0.77±0.32	petL	0.97±0.18	rpl22	1.09±0.13
atpE	0.75±0.20	psbT	0.98±0.25	ycf2	1.09±0.24
rpoC1	0.79±0.13	ndhF	0.98±0.22	rps8	1.11±0.04
rps18	0.80±0.26	rpoC2	1.00±0.45	ycf5	1.11±0.45
rpoB	0.80±0.52	psbK	1.00±0.12	ndhB	1.12±0.05
ndhH	0.85±0.28	psbB	1.02±0.36	rps4	1.12±0.26
petA	0.87±0.09	Rps7	1.02±0.30	psbM	1.12±0.43
Rpl36	0.88±0.11	clpP	1.02±0.37	ndhJ	1.13±0.41
psaC	0.91±0.17	psbJ	1.02±0.27	psaA	1.14±0.43
rps14	0.91±0.12	ndhD	1.02±0.27	ycf1	1.15±0.47
petB	0.91±0.15	matk	1.03±0.22	rps19	1.15±0.50
atpB	0.91±0.11	accD	1.03±0.17	psbZ	1.17±0.13
psbC	0.92±0.33	rps14	1.04±0.15	rpl33	1.18±0.09
petG	0.92±0.10	ndhG	1.04±0.20	ndhK	1.20±0.26
petD	0.92±0.09	rpl20	1.04±0.23	psbL	1.21±0.25
cemA	0.92±0.10	rpl23	1.04±0.04	Rps16	1.24±0.64
rps11	0.92±0.33	rps15	1.05±0.30	rps3	1.24±0.26
ndhC	0.93±0.26	rps2	1.05±0.10	psbH	1.31±0.05
psbE	0.94±0.05	ycf4	1.05±0.54	ycf3	1.33±0.31
rpl32	0.94±0.22	psaI	1.05±0.49	psbF	1.45±0.39
rpl2	0.94±0.15	psaB	1.07±0.09	psbD	1.50±0.63
rpoA	0.94±0.14	ndhA	1.07±0.27	psbA	2.07±1.03
ndhI	0.96±0.03	atpI	1.08±0.15	rbcL	2.07±1.44

Tableau 1 : Analyse des transcrits plastidiaux « sens » dans le mutant *sig3* par rapport au WT. Les valeurs ont été obtenues à partir de trois expériences indépendantes.

L'analyse des valeurs des intensités des spots représentatifs de l'expression des gènes plastidiaux dans le mutant *sig3* et les plantes sauvages a confirmé notre première observation. En effet, l'expression du gène *psbN* est très fortement diminuée dans le mutant *sig3* (c'est le rapport d'intensité *sig3/WT* le plus faible, 0.49). L'accumulation du transcrit *atpH* aussi semble être affectée dans le mutant (rapport d'intensité *sig3/WT* de 0.64).

D'après le tableau 1, au moins trois autres transcrits sont relativement diminués dans le mutant *sig3*, *i.e atpA*, *atpE* et *atpF*. Sur la membrane, on distingue aussi une faible différence d'intensité (voir fig 5B). Les gènes *atpF* et *atpA* font partie, avec le gène *atpH*, d'une même unité transcriptionnelle (*rps2/atpI/atpH/atpF/atpA*), dans ce qui suit, nous allons utiliser le terme 'opéron' pour désigner le groupe de gènes (*atpI/atpH/atpF/atpA*) qui codent les sous unités de l'ATP synthase plastidiale. Il est probable que la diminution de l'expression des gènes *atpF* et *atpA* soit corrélée avec la forte diminution de transcrit *atpH*. Le gène *atpE* quant à lui, fait partie d'un autre opéron avec le gène *atpB* (opéron *atpB/E*). Le rapport

d'intensité de l'expression du transcrit *atpB* entre le mutant et le sauvage indique que l'accumulation de *atpB* dans le mutant n'est pas affectée. On observe néanmoins une diminution faible au niveau de l'image des membranes hybridées.

D'une manière générale, l'analyse d'un transcriptome par puce à ADN constitue une approche globale permettant d'avoir un aperçu du profil d'expression et d'accumulation des transcrits. Toutefois, cette technique quoique sensible, peut présenter des variabilités dues aux différentes étapes d'élaboration de l'expérience (marquage des ADNc, hybridation, lavages etc.). Il est donc nécessaire de confirmer les résultats obtenus par d'autres techniques tels que Northern Blot ou extension d'amorce.

3 Confirmation des résultats obtenus par puce à ADN : identification des gènes transcrits par SIG3

Dans un premier temps, pour confirmer les résultats obtenus par macroarray, nous avons fait des Northern blot pour voir l'accumulation des transcrits *psbN*, *atpH*, *atpB* et *atpE* dans le mutant *sig3*.

3.1 Diminution de l'expression du gène *psbN*

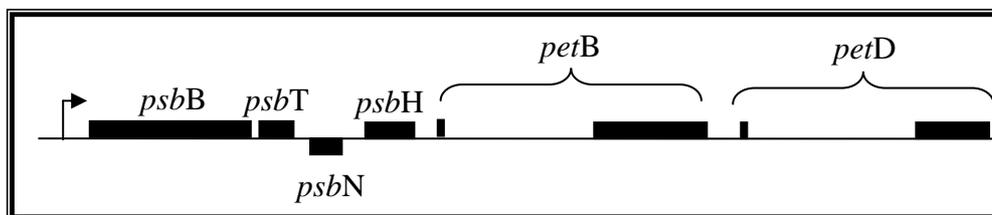


Figure 11 : Représentation schématique de l'opéron *psbB* chez *Arabidopsis thaliana*. Le symbole  désigne le promoteur situé dans la région 5'UTR de *psbB*.

Le gène *psbN* est situé dans la région intercistronique, au niveau du brin opposé de l'ADN, entre *psbT* et *psbH* de l'opéron *psbB* (voir figure 11). Cet opéron représente un exemple typique d'unités de transcription polycistronique dans le plaste. Il est composé de cinq gènes appartenant à deux complexes plastidiaux différents : le photosystème II (*psbB*, *psbH* et *psbT*) et le complexe cytochrome b6f (*petB/petD*). Les gènes *psbB*, *psbH* et *psbT* codent respectivement la protéine CP47 et les sous unités H et T du PSII. *PetB* et *petD* codent le cytochrome b6 et la sous unité IV du complexe cytochrome b6f.

Toutefois, *psbN* bien que situé entre *psbT* et *psbH*, est transcrit séparément dans la direction opposée aux autres gènes de l'opéron. Le transcrite *psbN* fait environ 350 nucléotides (Felder et al., 2001). *PsbN* est supposé faire partie du photosystème II (la sous unité N) mais sa localisation dans le complexe du photosystème II ainsi que sa fonction demeure inconnue jusqu'à présent. D'une manière générale, on ne considère pas *psbN* comme un composant de l'opéron *psbB*.

D'après les résultats obtenus par puce à ADN, pour le mutant *sig3*, le transcrite *psbN* diminue fortement. Nous avons donc analysé son expression de manière spécifique par l'intermédiaire de la technique du Northern blot.

Le Northern blot réalisé avec une sonde ADN marquée correspondant au transcrite *psbN*, montre une très forte diminution de l'ARNm *psbN* dans le mutant *sig3*. Ceci permet de confirmer les résultats obtenus par puce à ADN (fig. 12).

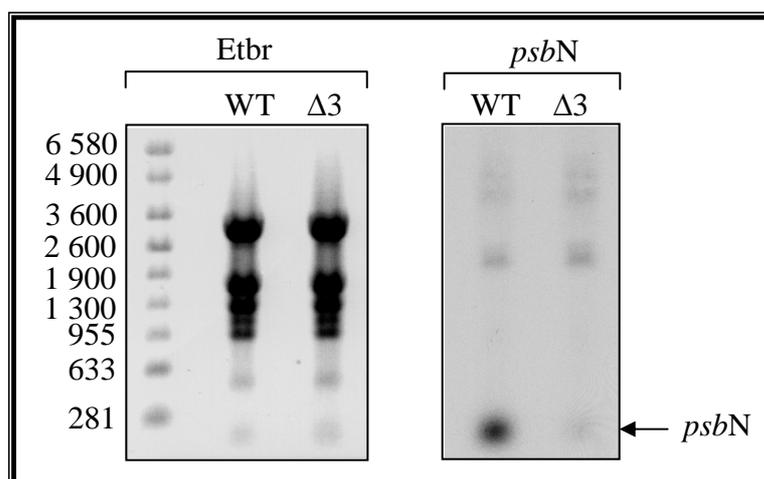


Figure 12 : Analyse de l'expression du gène *psbN* par Northern blot.

Les ARN totaux extraits de plantules âgées de 6 jours ont été séparés sur un gel d'agarose dénaturant puis visualisés sous UV (grâce au colorant bromure d'éthidium). Ils sont par la suite transférés sur une membrane de nitrocellulose puis hybridés avec une sonde spécifique de *psbN* marquée avec du ^{32}P .

Un des gènes soumis au contrôle du facteur de transcription plastidial SIG3 serait donc *psbN*, un composant supposé faire partie du photosystème II mais dont la fonction est inconnue jusqu'à présent. Il reste à déterminer le rôle de SIG3 au niveau de sa transcription en recherchant par la technique d'extension d'amorce, le ou les promoteurs spécifiques dans la région 5'UTR du gène *psbN*. Cette technique permet d'analyser le profil d'expression des gènes étudiés tout en déterminant la localisation de l'extrémité 5' des transcrits correspondants. Cette extrémité peut provenir soit d'un site d'initiation de la transcription soit

d'une étape de maturation post-transcriptionnelle impliquant le clivage d'un transcrit précurseur. Les techniques de capping *in vitro* et de l'amplification par 5'RACE couplée au traitement des ARNm par la phosphatase (TAP), permettra de déterminer l'origine des transcrits observés (voir Chapitre II).

3.2 Diminution de l'accumulation du transcrit *atpH*

Le gène *atpH* fait partie de l'unité transcriptionnelle *rps2/atpI/atpH/atpF/atpA* (fig 13). Cette unité code la protéine ribosomale S2 et les quatre sous unités de l'ATP synthase : CF₀-IV (*atpI*), CF₀-III (*atpH*), CF₀-I (*atpF*), et CF₁- α (*atpA*) (Hennig and Herrmann, 1986).

La transcription de cette unité transcriptionnelle donne lieu à une vingtaine de transcrits différents (polycistroniques et monocistroniques) allant de 0,5 à 6 Kb, le transcrit monocistronique *atpH* fait de 700 à 800nt selon les espèces (Stahl et al., 1993 ; Miyagi et al., 1998).

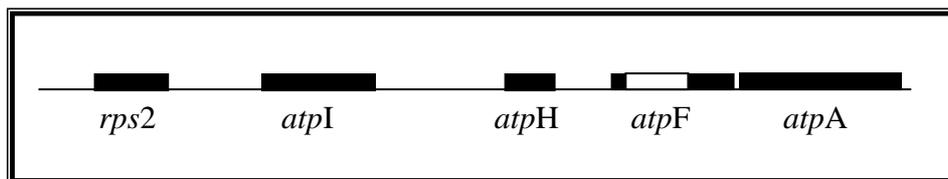


Figure 13 : Représentation schématique de l'unité transcriptionnelle *rps2/ atpI/atpH/atpF/atpA*.

Nous avons réalisé un Northern blot avec une sonde ADN correspondante au gène *atpH*. Nous avons observé chez le sauvage, ainsi que le mutant *sig3*, plusieurs transcrits *atpH* de tailles différentes (entre 400 et 1200 kb environ, fig 14). La taille des transcrits observés est plus courte par rapport aux transcrits polycistroniques de l'opéron. Tous ces transcrits sont fortement diminués dans le mutant *sig3*. Nous en déduisons, d'après ce résultat que le gène *atpH* est transcrit d'une façon découplée des autres gènes de l'opéron d'une manière dépendante du facteur Sigma 3.

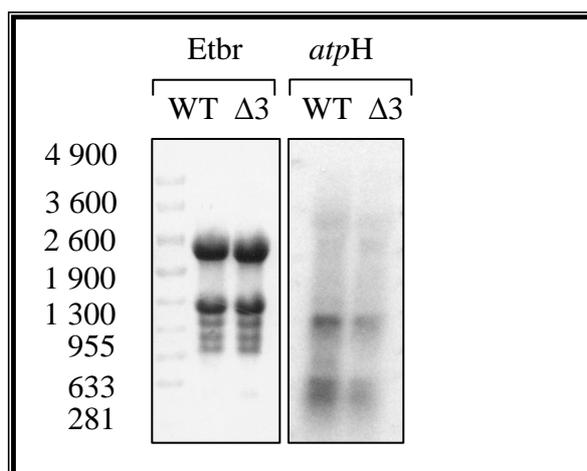


Figure 14 : Analyse de l'expression du gène *atpH* par Northern blot.

Les ARN totaux extraits de plantules mutantes *sig3* ($\Delta 3$) et sauvages (WT) âgées de 6 jours ont été séparés sur un gel d'agarose dénaturant en présence de bromure d'éthidium puis visualisés sous UV (partie gauche). Ils sont par la suite transférés sur une membrane de nitrocellulose puis hybridés avec une sonde ADN spécifique du gène *atpH* marquée avec du ^{32}P (partie droite).

A ce stade, nous pouvons conclure que l'accumulation du transcrit *atpH* est affectée dans le mutant *sig3* ce qui confirme les résultats obtenus par macroarray.

Toutefois, il est nécessaire d'étudier de manière plus détaillée l'accumulation des transcrits *atpH* par d'autres techniques plus sensibles (l'extension d'amorce et 5'RACE +/- TAP) dans le but d'identifier le ou les promoteurs reconnus par l'holoenzyme PEP/SIG3 (voir Chapitre II).

3.3 Diminution des transcrits *atpB* et *atpE*

Le gène *atpB* fait partie avec *atpE* d'une unité de transcription dicistronique connue sous le nom de l'opéron *atpB/atpE* (Zurawski et al., 1982). Il code pour les deux sous unités de l'ATP synthase : $\text{CF}_1\text{-}\beta$ (*atpB*) et $\text{CF}_1\text{-}\epsilon$ (*atpE*) (Hennig and Herrmann 1986).

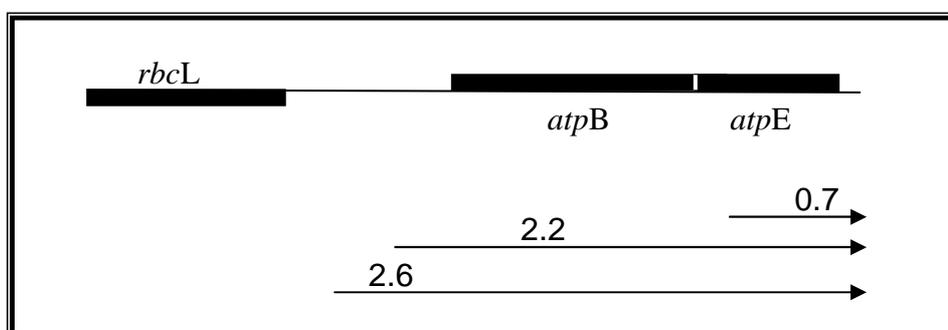


Figure 15 : Représentation schématique de l'opéron *atpB/E* ainsi que de ces différents transcrits chez *Arabidopsis thaliana*.

Chez *Arabidopsis thaliana*, les gènes *atpB* et *atpE* sont co-transcrits en deux grands ARNm de 2,6 kb et 2,2 kb à partir de promoteurs situés dans la région 5'UTR du gène *atpB* (Swiatecka-Hagenbruch et al., 2007). De plus, il existe un transcrit *atpE*, plus court, faisant environ 700 b. L'analyse de l'accumulation des transcrits *atpB* et *atpE* (en utilisant des sondes spécifiques pour chaque gène) a montré une diminution d'un des deux co-transcrits *atpB/atpE*, *i.e* le transcrit faisant 2 Kb (fig 16). L'accumulation du transcrit monocistronique *atpE* n'est pas affectée dans le mutant *sig3*. La diminution observée dans la puce semblerait provenir de la diminution du co-transcrit *atpB-atpE* dans le mutant. Dans ce cas, l'expression du gène *atpB* devrait être affectée de la même manière. Cependant, la puce à ADN ne montre pas un changement au niveau de l'accumulation du transcrit *atpB* dans le mutant. La technique du Northern blot étant plus sensible, nous pensons alors que le facteur Sigma 3 est impliqué dans l'expression de l'opéron *atpB/atpE*, probablement dans la transcription du gène *atpB*.

Il reste alors à chercher le rôle de SIG3 dans la transcription de l'opéron *atpB/atpE* en utilisant d'autres techniques plus sensibles, nous permettant d'identifier de manière précise les sites d'initiation de la transcription d'un gène donné (technique d'extension d'amorce). Ceci devra permettre d'identifier le promoteur reconnu par SIG3 au niveau de l'opéron *atpB/E* (voir chapitre III).

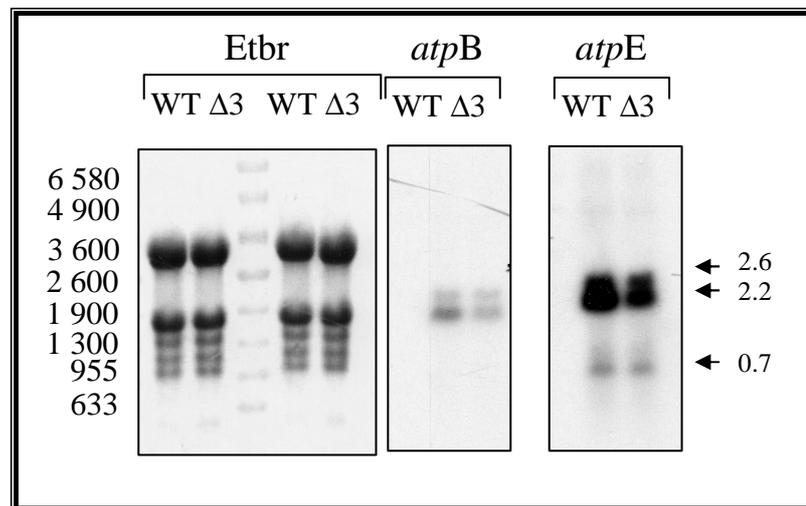


Figure 16 : Analyse de l'expression des gènes *atpB* et *atpE* par Northern blot. Les ARN totaux extraits de plantules âgées de 6 jours ont été séparés sur un gel d'agarose dénaturant puis visualisés sous UV (pour vérifier leur intégrité ainsi que leur dosage). Ils sont par la suite transférés sur une membrane de nitrocellulose puis hybridés avec des sondes spécifiques ADN doubles brin (fragments PCR marqués avec du ^{32}P) correspondant aux transcrits *atpB* et *atpE*.

3.4 Augmentation de l'accumulation de l'ARNm *rbcL* ?

Nous avons observé dans les résultats obtenus par la puce une augmentation de la valeur d'intensité correspondant au transcrit *rbcL*. L'image des membranes hybridées ne permet pas d'avoir une réponse précise due à la présence d'un bruit de fond élevé autour du spot *rbcL* (voir fig 10B, position 20, a). De ce fait, la valeur de l'écart type correspondante à l'intensité du spot *rbcL* est très élevée. Face à ces différentes observations non concluantes, nous avons décidé d'analyser de manière plus sensible (par Northern blot) l'accumulation des transcrits *rbcL* chez le mutant *sig3*.

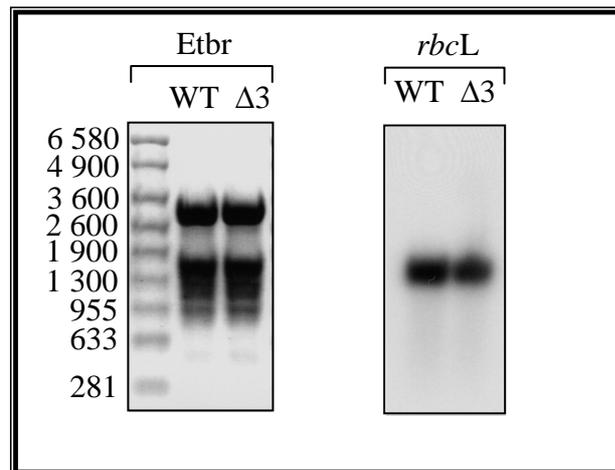


Figure 17 : Analyse du transcrit *rbcL* dans le mutant *sig3*. Un Northern blot a été réalisé avec des ARN totaux extraits de plantules âgées de 6 jours en utilisant comme sonde un fragment d'ADN double brin obtenu par PCR marqués avec du ^{32}P correspondant au transcrit *rbcL*.

L'analyse par Northern blot montre que l'accumulation du transcrit *rbcL* n'est pas affectée dans le mutant *sig3* (fig17). L'augmentation observée par la puce à ADN peut être due à la position de la sonde correspondante au transcrit *rbcL* au niveau de la membrane de nitrocellulose : elle a été déposée dans le coin droit de la membrane qui est généralement utilisé lors de la manipulation d'où le bruit de fond élevé.

4 Conclusion

Nous avons isolé un mutant homozygote par insertion d'ADN-T dans le gène *SIG3* d'*Arabidopsis thaliana*. Le mutant *sig3* ne présente pas de phénotype apparent dans les conditions normales de cultures.

Dans le but d'étudier le rôle de SIG 3, nous avons fait le choix d'analyser simultanément l'expression des différents gènes plastidiaux dans le mutant *sig3* et dans les plantes sauvages

par puce à ADN. Cette approche nous a permis d'identifier trois gènes susceptibles d'être sous le contrôle du facteur de transcription SIG3. Il s'agit des gènes *psbN*, *atpH* et *atpB*.

La diminution de l'expression de ces gènes dans le mutant a été vérifiée par la technique de Northern blot.

Le taux d'accumulation des transcrits *psbN*, *atpH* et *atpB* dans le mutant *sig3*, bien que faible par rapport au sauvage, est très variable. Ainsi, l'expression de *psbN* est la plus affectée dans le mutant *sig3* suivie de celle du transcrit *atpH* puis *atpB*. Ceci suggère fortement que le facteur SIG3 intervient de manière différente au niveau de la transcription des gènes.

Quel est le rôle du facteur SIG3 au niveau de la transcription des gènes *psbN*, *atpH*, et *atpB* ?

L'identification des sites d'initiation de la transcription et la caractérisation des promoteurs de ces gènes sont nécessaires pour pouvoir répondre à ces questions et de comprendre le rôle du facteur SIG3 dans la transcription plastidiale chez *Arabidopsis thaliana*.

Rappelons que le gène *psbN* se situe dans le brin opposé à l'opéron *psbB*, (entre *psbT* et *psbH*), et que les gènes *atpH* et *atpB* font partie respectivement de l'opéron *atpI/atpH/atpF/atpA* et l'opéron *atpB/atpE*. Nous avons étudié l'expression de l'opéron *psbB*, *atpI/atpH/atpF/atpA* et *atpB/atpE* dans le mutant *sig3* ainsi que la plante sauvage afin d'avoir un aperçu plus général sur le rôle de SIG3 comme facteur de transcription plastidial chez *Arabidopsis thaliana*.

Chapitre II

Rôle du facteur sigma 3 au niveau de
l'expression de l'opéron *psbB*

1 Rôle du facteur sigma 3 au niveau de l'expression de l'opéron *psbB*

Nous avons montré précédemment, suite à l'analyse du transcriptome plastidial par puce à ADN et par Northern blot, une forte diminution du transcrit *psbN* dans le mutant *sig3*. Le gène *psbN* code une protéine de fonction inconnue. De même, sa localisation au niveau du photosystème II n'a jamais été prouvée de manière directe c'est-à-dire après séquençage des composants du PSII purifié (Zouni et al., 2001 ; Ferreira et al., 2004). Au contraire, il a été suggéré que *psbN* ne fait pas partie du PSII chez *T.vulcanus* (Kashino et al., 2002). Quel serait donc le rôle du gène *psbN* ? Une des hypothèses probables est que l'absence du transcrit *psbN*, situé dans le brin opposé de l'opéron *psbB*, affecte l'expression de l'opéron. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons étudié l'accumulation des transcrits et des protéines de l'opéron *psbB* dans le mutant *sig3*.

1.1 Identification du promoteur *psbN*

Nous avons tout d'abord, cherché à identifier le promoteur du gène *psbN* reconnu par le complexe ARN polymérase PEP-SIG3. Pour cela, nous avons analysé par extension d'amorce les transcrits du gène *psbN* en utilisant une amorce située en aval de l'ATG (fig 18A). D'après les résultats obtenus par la technique d'extension d'amorce, il existe un seul transcrit correspondant à *psbN*. L'extrémité 5' de ce transcrit est située à 32 nucléotides de l'ATG, le codon initiateur de la traduction. Ce transcrit peut être issu directement d'une initiation de la transcription à partir d'un promoteur situé en amont (transcrit primaire) ou bien issu du clivage d'un transcrit précurseur. Dans le but de déterminer précisément l'origine du transcrit *psbN* -32, nous avons utilisé la technique de *capping in vitro* (voir matériel et méthodes). Nous avons ainsi montré que le transcrit *psbN* est issu d'une initiation de la transcription à partir d'un promoteur situé en amont de la position -32. Il est fortement réduit dans le mutant *sig3* (fig 18A).

Nous avons analysé par extension d'amorce, en guise de contrôle, les ARNm du gène *clpP*, connu comme étant transcrit principalement à partir d'un promoteur NEP situé en amont de la position -53 de l'ATG (Hajdukiewicz et al. , 1997). Son expression n'est pas affectée dans le mutant *sig3* (voir Chapitre I, tableau 1). En effet, le transcrit -53 du gène *clpP* s'accumule de la même manière dans le mutant *sig3* et la plante sauvage (WT) (fig 18B).

En conclusion, d'après nos résultats, la transcription de *psbN* est contrôlée spécifiquement par le facteur de transcription plastidial SIG3.

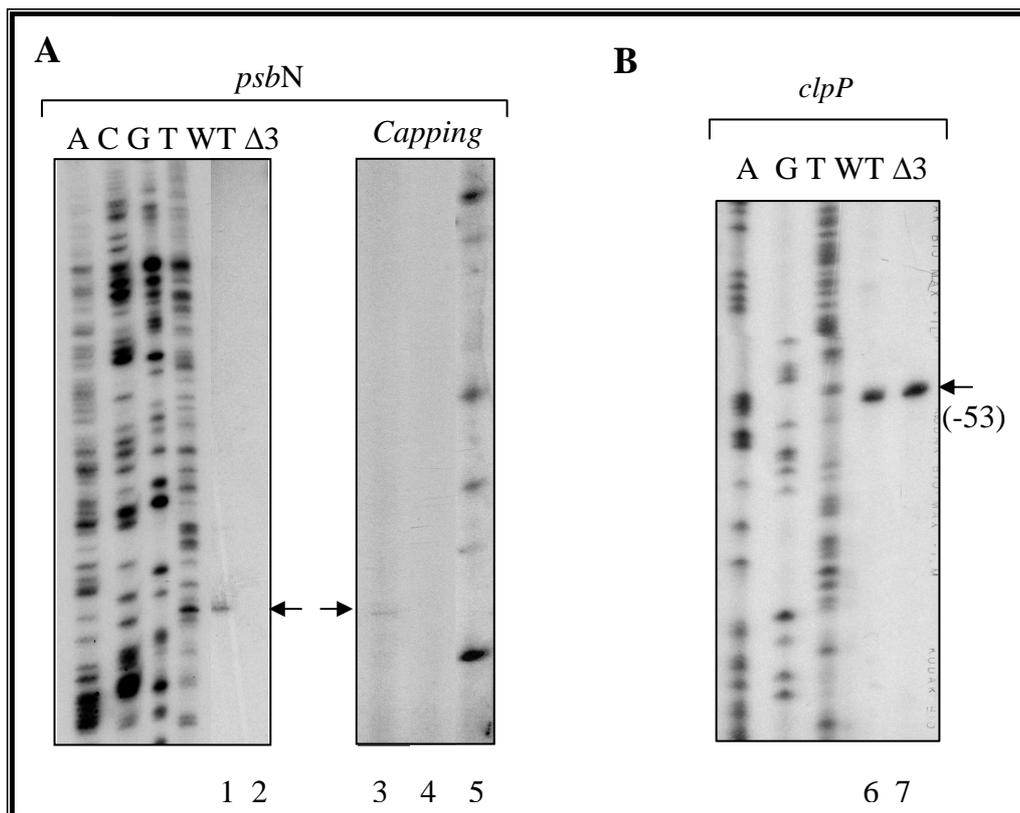


Figure 18 : Caractérisation des transcrits *psbN*.

(A) Les ARNs correspondants aux WT ainsi que le mutant $\Delta 3$ sont d'abord analysés par extension d'amorce (lignes 1 et 2). Le transcrit *psbN* situé à -32 de l'ATG est ensuite analysé par la technique de *Capping in vitro* (lignes 3-5). Les ARNs coiffés sont déposés directement sur le gel de séquence (ligne 5), après digestion à la RNase (ligne 4) et après hybridation avec l'ARN complémentaire à *psbN* suivie d'une digestion à la RNase (ligne 3).

(B) Analyse par extension d'amorce des transcrits *clpP* chez le mutant *sig3* ($\Delta 3$, ligne 7) et la plante sauvage (WT, ligne 6).

Nos résultats exposés jusqu'à présent ont été obtenus avec le mutant *sig3-4*. Dans le but de confirmer la corrélation entre la diminution du transcrit *psbN* et l'absence du facteur SIG3, nous avons analysé par extension d'amorce l'expression de *psbN* dans le deuxième mutant homozygotes *sig3-2* obtenu indépendamment du premier (voir Chapitre I). Le transcrit *psbN* est aussi diminué dans le mutant *sig3-2* (fig 19). Ce résultat montre bien que le phénotype observé (diminution de l'ARNm *psbN*) est dû uniquement à la mutation dans le gène *SIG3* et non pas à d'autres mutations additionnelles non détectées.

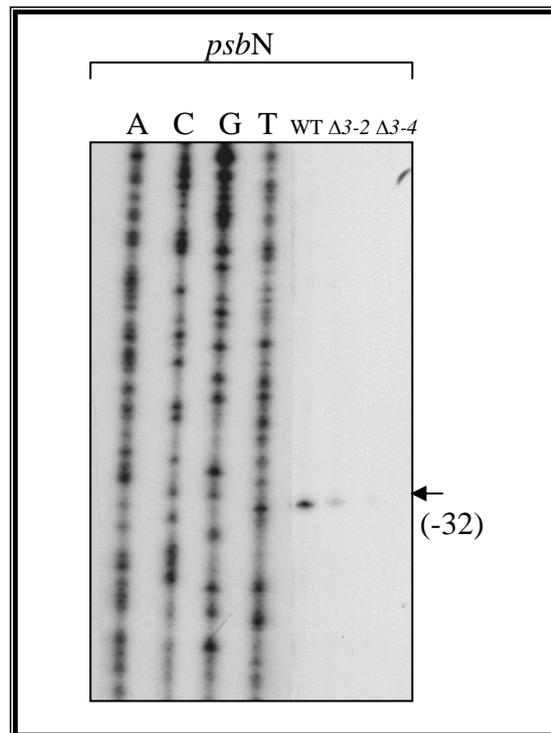


Figure 19: Analyse des transcrits *psbN* dans le deuxième mutant *sig3-2* ($\Delta 3-2$) par extension d'amorce.

En conclusion, nous avons montré que chez *Arabidopsis thaliana*, *psbN* est transcrit à partir d'un promoteur PEP unique, sous le contrôle du facteur de transcription plastidial SIG3. Comme nous l'avons indiqué précédemment, *psbN* est situé dans la région intergénique de l'opéron *psbB*, entre *psbT* et *psbH*. La transcription de *psbN* pourrait alors produire des ARNm antisens des gènes *psbT* et *psbB*.

Est ce que des ARNs antisens de *psbB* et *psbT* existent vraiment *in vivo* ? Si c'est le cas, quel est leur rôle ? Sont-ils impliqués au niveau de la transcription, du processing ou de la traduction de l'opéron *psbB* ?

Pour répondre à ces différentes questions, nous avons analysé l'expression de l'opéron *psbB* dans le mutant *sig3* où la transcription de *psbN* est très fortement affectée.

1.2 Rôle de SIG3 au niveau de l'accumulation et processing des transcrits de l'opéron *psbB*

L'opéron a été étudié chez plusieurs espèces (Westhoff and Hermann, 1988 ; Kohchi et al., 1988). Il a été démontré que tout l'opéron est transcrit à partir d'une seule région promotrice située dans la région 5'UTR de *psbB* produisant ainsi des longs transcrits polycistroniques qui subissent des séries d'événement de clivage (processing) libérant des transcrits mono et dicistroniques (fig 20) (Westhoff and Hermann, 1988 ; Meurer et al., 1996).

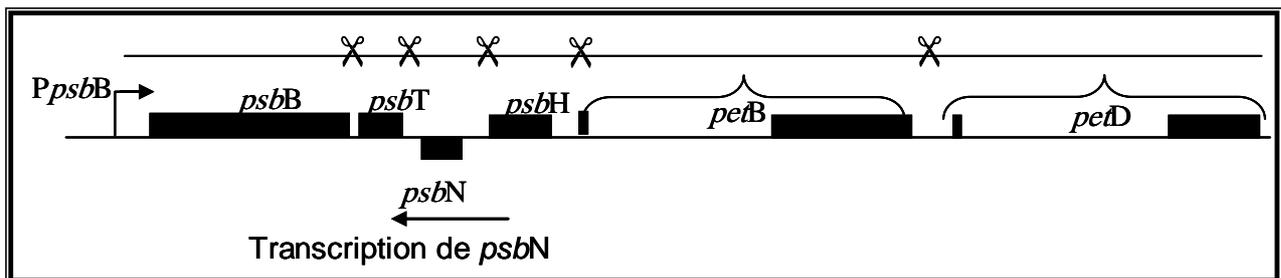


Figure 20: Représentation schématique de l'opéron *psbB*. Cet opéron est transcrit à partir d'un promoteur situé dans la région 5'UTR de *psbB* produisant ainsi un long transcrit (qui comprend les cinq transcrits de l'opéron). Ce large ARNm précurseur est clivé au niveau de plusieurs sites libérant ainsi plusieurs transcrits se chevauchant les uns les autres faisant entre 400 et 5600 nucléotides (Westhoff and Hermann, 1988).

Le promoteur de *psbN* situé à -32 de l'ATG chevauche avec une des extrémités 5' des transcrits *psbH* (voir fig 21A) (Felder et al., 2001). Le chevauchement entre ces deux transcrits pourrait résulter de la formation d'une molécule d'ADN double brin (*psbH/psbN*) ou bien d'une modification de la structure secondaire du transcrit *psbH* modifiant ainsi le processing de l'ARN polycistronique dans la région intergénique *psbT-psbH*.

Dans ce cas, le transcrit *psbN* pourrait jouer un rôle au niveau du processing de l'ARNm contenant *psbH*. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons analysé l'accumulation ainsi que le profil de processing des co-transcrits de l'opéron *psbB* dans le mutant *sig3* et la plante sauvage (WT) par Northern blot en utilisant des sondes correspondantes aux gènes *psbB*, *psbT* et *psbH*.

D'après les résultats obtenus, nous n'avons pas détecté de différences au niveau de l'accumulation des co-transcrits de l'opéron *psbB*. Nous pouvons conclure qu'il n'y a pas de défaut de processing dans le mutant *sig3* dû à l'absence de l'ARNm *psbN* (fig 21).

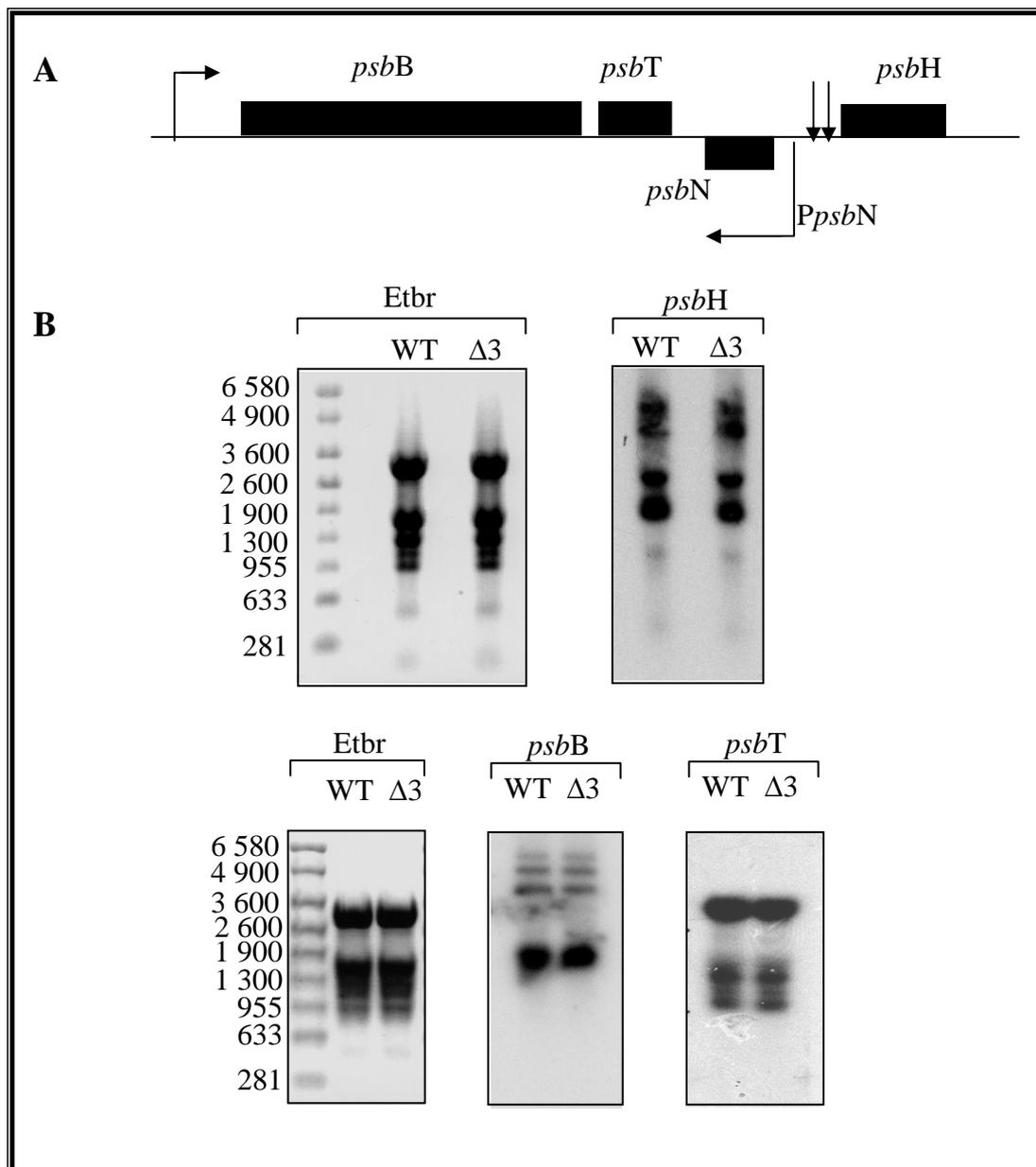


Figure 21: Analyse de l'accumulation et du processing des différents transcrits de l'opéron *psbB*.

(A) Représentation schématique de l'opéron *psbB* ainsi que le promoteur de *psbN* (P_{psbN}). Les deux flèches situées sur la région intergénique entre *psbT* et *psbH* correspondent aux deux extrémités 5' des transcrits *psbH* issus d'un processing (Felder et al., 2001), l'un de ces transcrits se chevauche avec le promoteur du gène *psbN*. Le symbole \blacktriangleright désigne les promoteurs, la flèche \blacktriangledown désigne le site du clivage des transcrits.

(B) Northern blot réalisé avec des sondes spécifiques *psbB*, *psbH* et *psbT*. Des ARN extraits de plantules (WT et $\Delta 3$) âgées de 6 jours sont séparés sur un gel d'agarose dénaturant en présence de bromure d'éthidium puis transférés sur membranes de nitrocellulose et hybridés avec les sondes radioactives des différents transcrits analysés.

1.3 Rôle de SIG3 au niveau de l'accumulation des protéines de l'opéron *psbB*

Nous avons vu que l'absence du transcrit *psbN* dans le mutant *sig3* n'affecte ni l'accumulation des transcrits de l'opéron *psbB* ni leur processing (fig 21). Une des fonctions probables de *psbN* pourrait alors être corrélée avec la traduction des différents transcrits de l'opéron.

Pour cela, nous avons analysé par Western blot l'accumulation des protéines CP47 (codée par *psbB*) PsbH et PsbT grâce à des anticorps spécifiques. La protéine ribosomale L4 a été choisie comme contrôle de charge. Pour les protéines CP47 et PsbH nous avons utilisé des anticorps peptidiques commerciaux fournis par la société Agrisera. En ce qui concerne la protéine PsbT aucun anticorps n'étant disponible, des anticorps anti-peptidiques ont été alors produits par Eurogentec.

1.3.1 Caractérisation de l'anticorps anti-PsbT

Nous avons mis au point les différentes conditions de Western Blot nous permettant de détecter les protéines de petits poids moléculaires tels que PsbT. Pour cela nous avons utilisé le système de migration de Schagger and Van Jagow (1972). Nous avons tout d'abord testé les anticorps contre des protéines totales extraites de plantes sauvages (WT). Les anticorps que nous possédons reconnaissent de manière spécifique une protéine d'environ 4kDa (poids moléculaire calculé est de 3,8 kDa). Le sérum pré-immun ne réagit pas avec cette protéine (fig 22A). Nous avons aussi confirmé la localisation de la protéine PsbT au niveau des thylacoïdes chez *Arabidopsis thaliana* (Monod et al., 1994) (fig 22B).

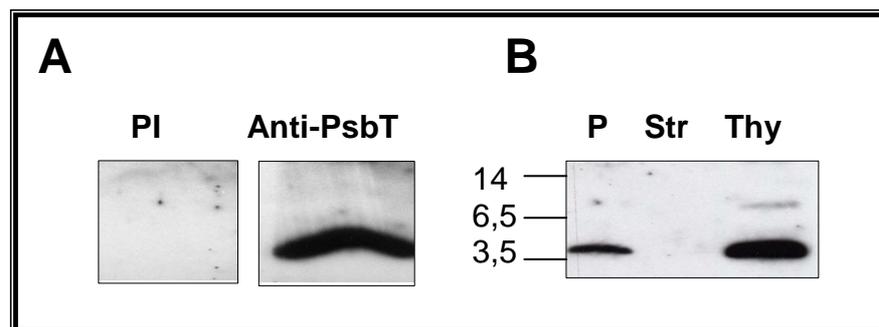


Figure 22: Caractérisation de l'anticorps dirigé contre des peptides de la protéine PsbT.

(A) Immunodétection de la protéine PsbT d'*Arabidopsis* du sérum pré-immun (PI) et du sérum anti-PsbT avec des extraits totaux de plantules âgées de 6 jours.

(B) Immunoréaction de l'anticorps anti-PsbT. 30µg de protéines des plastes purifiés (P), de stroma (Str) et de thylacoïdes (Thy) extraits de feuilles matures d'*Arabidopsis* (âgées de 21 jours) ont été séparés par SDS-PAGE, transférés sur membrane de nitrocellulose et analysés avec un anticorps peptidique dressé contre PsbT.

Nous avons analysé l'accumulation des protéines codées par l'opéron *psbB* dans le mutant *sig3* et la plante sauvage par Western Blot. D'après le résultat obtenu avec les anticorps anti-PsbB et anti-PsbH, il n'y a pas de différence au niveau de l'accumulation des protéines PsbB et PsbH chez le mutant (fig 23). En revanche, la protéine PsbT est sur-exprimée dans le mutant *sig3*.

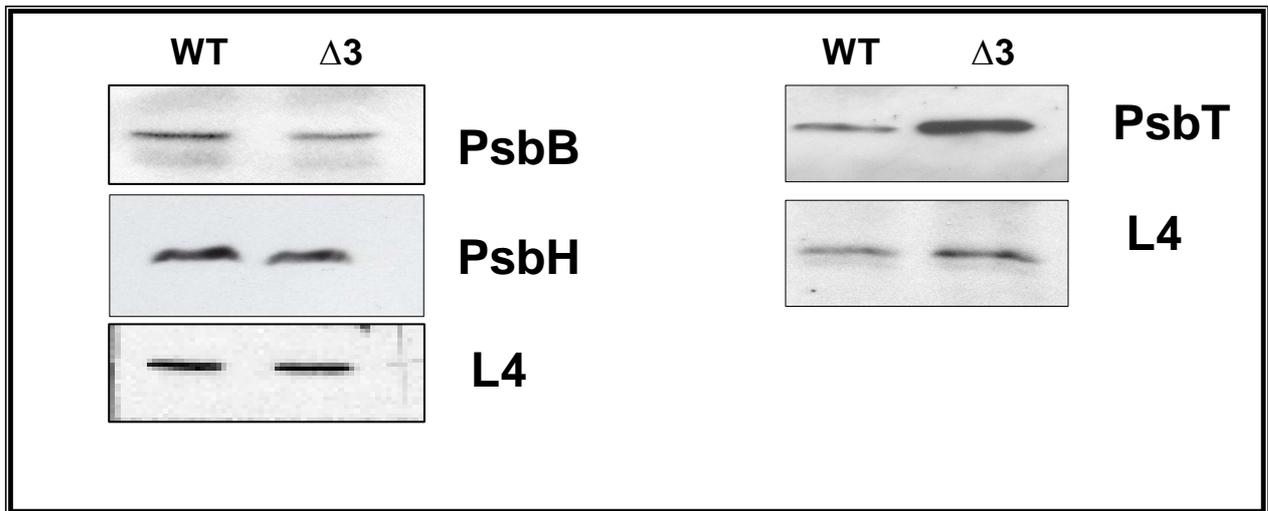


Figure 23: Immunodétection des protéines de l'opéron *psbB* chez le sauvage (WT) et chez le mutant *sig3* ($\Delta 3$). 25 μ g protéines totales extraites de plantules âgées de 6 jours sauvages (WT) et mutantes *sig3* ($\Delta 3$) ont été séparés par SDS-PAGE, transférés sur membrane de nitrocellulose et analysés avec des anticorps anti-PsbB, PsbH, PsbT et L4.

Ce résultat montre l'effet de la diminution du transcrite *psbN* dans le mutant *sig3* sur le taux d'accumulation de la protéine PsbT.

Quelle est donc la relation entre la transcription de *psbN* et la traduction de l'ARNm *psbT* ? La transcription de *psbN*, situé sur le brin opposé de *psbT*, pourrait engendrer un transcrite antisens de *psbT* qui serait tout comme *psbN* sous le contrôle de SIG3. Ainsi, en contrôlant la production d'un ARN antisens *psbT*, SIG3 pourrait contrôler la traduction de l'ARNm *psbT*. Pour tester cette hypothèse, nous avons analysé l'accumulation des transcrits sens et antisens de *psbT* par extension d'amorce.

1.4 Étude de l'accumulation des transcrits *psbT*

1.4.1 Caractérisation des transcrits antisens de *psbT*

1.4.1.1 Détermination de l'extrémité 5' du transcrit *psbT* antisens

Pour déterminer les différents transcrits antisens de *psbT*, nous avons choisi comme amorce un oligonucléotide commençant à l'ATG du gène *psbT* (voir fig 24A). Les résultats obtenus par extension d'amorce montrent l'existence de deux transcrits antisens de *psbT* faisant 330 et 140 bases. Ces transcrits sont absents dans le mutant *sig3*. Nous pouvons alors conclure que ces transcrits sont sous le contrôle du facteur de transcription SIG3.

Dans le but de déterminer si ces transcrits sont issus d'une initiation de la transcription ou par clivage d'un transcrit précurseur, nous avons réalisé la technique de 5'RACE couplée au traitement avec la TAP (voir matériel et méthodes, fig 24B partie droite).

Le transcrit long correspondant au co-transcrit *psbN/psbT*-antisens est détecté par PCR uniquement à partir d'ARN traités à la phosphatase (TAP), c'est donc un transcrit primaire initié à partir du promoteur du gène *psbN* situé en amont de la position -32 de l'ATG. Le transcrit de 140 bases est détecté par PCR à partir d'ARN traités et non traités à la phosphatase ce qui montre bien qu'il provient d'un clivage d'un transcrit précurseur, *i.e* du co-transcrit *psbN/psbT*-antisens. Le transcrit de 140 bases correspond à l'antisens de la séquence codante de *psbT*. Son extrémité 5' se situe au niveau de la région intergénique, entre *psbN* et *psbT* (voir fig 24 A).

Nous montrons ainsi que la transcription de *psbN* produit un long ARNm qui couvre l'antisens de la séquence codante de *psbT*. Suite à un processing, ce transcrit est coupé libérant ainsi d'une part le transcrit *psbN* (sens) et d'autre part le transcrit *psbT* antisens.

Jusqu'où s'étend l'antisens de *psbT* ? Est-il limité à la séquence codante de *psbT* ? Ou bien à sa région 5'UTR ?

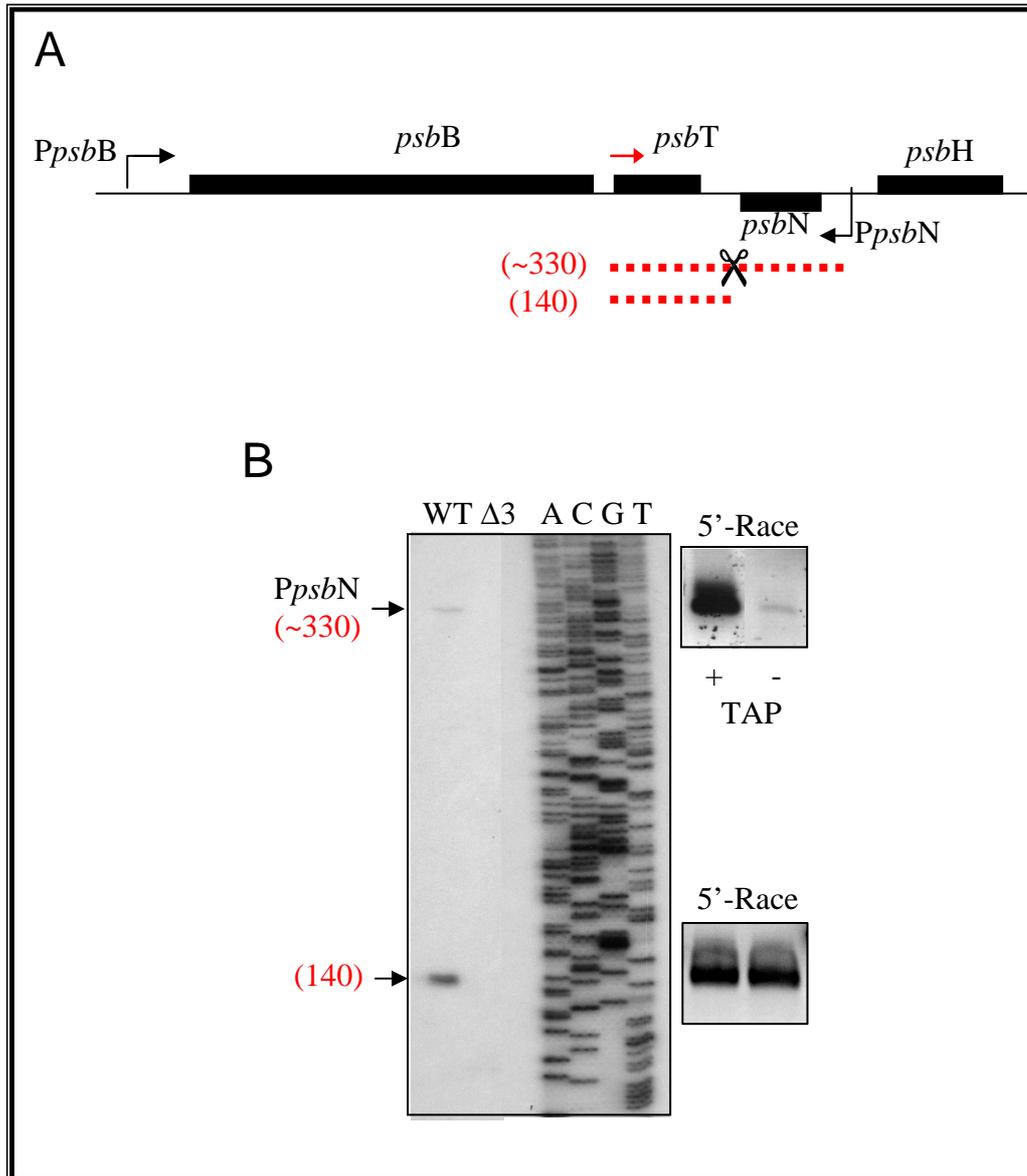


Figure 24 : Détermination de l'extrémité 5' des transcrits antisens de *psbT*.

(A) Représentation schématique des gènes *psbB*, *psbT*, *PsbN* et *psbH*. *psbN* est transcrit par le brin opposé à partir du promoteur situé à -32. La transcription de *psbN* produit un long transcrit (en rouge) contenant l'antisens de *psbT*. Ce transcrit est coupé pour libérer le transcrit antisens de *psbT* (couvrant toute la région codante de *psbT*).

(B) Détermination des transcrits antisens de *psbT* par extension d'amorce. Des ARN totaux du WT et du mutant ($\Delta 3$) sont rétrotranscrits en utilisant une amorce (en rouge) située au niveau de l'ATG du gène *psbT*. Les ADNc correspondant aux transcrits antisens de *psbT* sont par la suite analysés sur un gel d'acrylamide dénaturant. La migration des ADNc est effectuée en même temps que la séquence du gène *psbT* faite avec la même amorce. Les deux transcrits antisens de *psbT* sont analysés par 5' RACE avec (+) ou (-) traitement à la TAP.

1.4.1.2 Détermination de l'extrémité 3'

Pour déterminer l'extrémité 3' du transcrit antisens de *psbT*, nous avons réalisé la technique de RT-PCR sur des ARNs auto-liés par la T4-ligase (Circular RT-PCR, Zanduetta-Criado and Bock, 2004).

Le but de cette technique est de circulariser les ARNs de manière à ce que les deux extrémités 3'UTR et 5'UTR soient liées. En utilisant des amorces proches des régions 3' et 5' UTR du transcrit antisens (voir fig25 A), nous avons réalisé une reverse transcription suivie d'amplification par PCR. Nous avons détecté deux bandes majeures (fig 25 B). Elles ont été clonées, plusieurs clones ont été obtenus et séquencés.

D'après ces résultats, nous pouvons constater qu'il existe deux transcrits antisens de *psbT* de différentes tailles. Ils ont la même extrémité 5'UTR (issu du processing du long transcrit *psbN*). Par contre, ils diffèrent au niveau de leur extrémité 3'UTR : l'un s'arrête au niveau de la région intergénique entre *psbB* et *psbT* et l'autre s'arrête au niveau de l'extrémité 3' du gène *psbB* (voir fig 25 C).

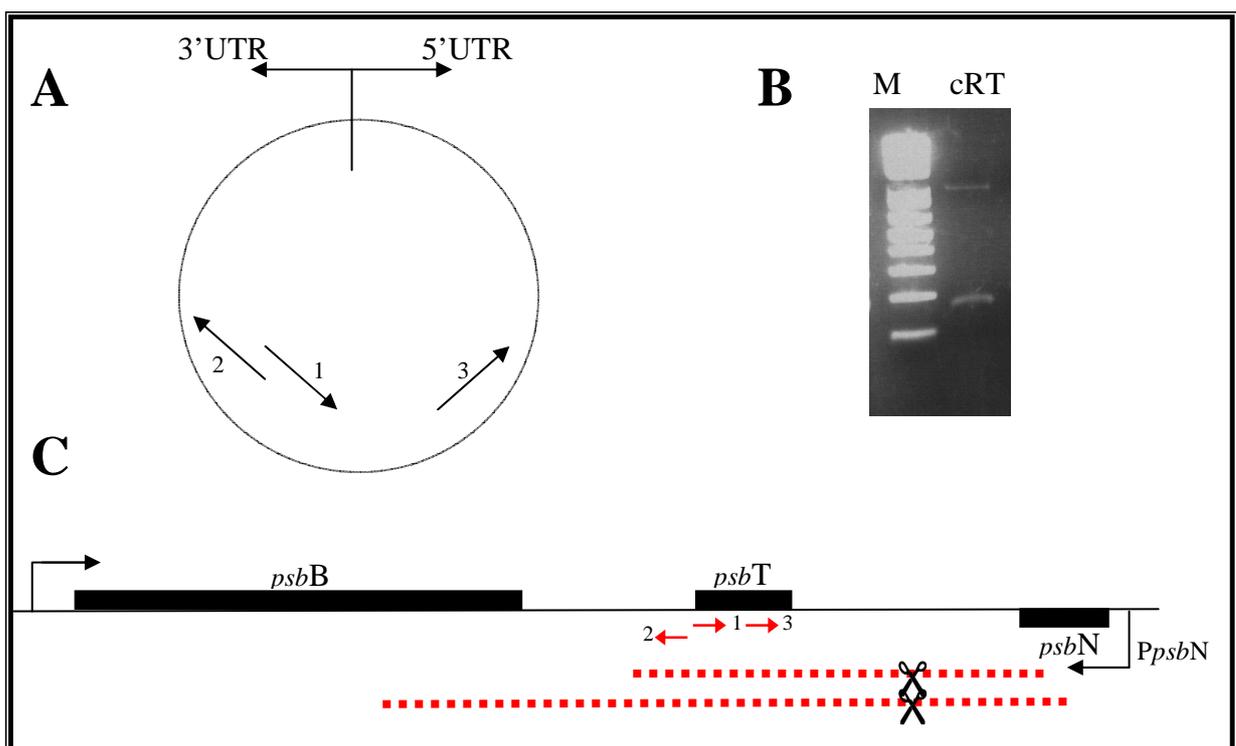


Figure 25: caractérisation de l'extrémité 3' du transcrit antisens de *psbT*

(A) Représentation schématique de l'ARN auto-lié par la T4 ligase par leurs deux extrémités 3' et 5'. La RT a été faite avec l'amorce 1 suivie par une PCR avec les amorces 2 et 3.

(B) Détermination de l'extrémité 3' du transcrit antisens par cRT-PCR (RT-PCR circulaire). 2µg d'ARN sont auto-liés avec la T4 ligase, puis rétrotranscrit avec l'amorce 1. Les ADNc obtenus sont amplifiés par PCR avec les amorces 2 et 3, puis déposés sur gel d'agarose. Un aliquot a été cloné, plusieurs clones ont été par la suite séquencés pour déterminer la région 3' du transcrit antisens de *psbT*.

(C) Représentation schématique des transcrits antisens de *psbT* d'après les séquences obtenues après clonage (en pointillés rouges)

D'après ces résultats, nous pouvons conclure que la transcription de *psbN* produit un ARNm antisens couvrant toute la séquence codante de *psbT* ainsi que sa région 5'UTR. L'accumulation de *psbN* ainsi que de *psbT* antisens est entièrement sous le contrôle de SIG3.

Quel serait donc le rôle de ce transcrit antisens ?

Nous avons déjà montré que l'absence du transcrit *psbT* antisens dans le mutant *sig3* se traduit par une augmentation de la protéine PsbT (fig 23). Ce résultat peut être interprété de deux manières : 1) la formation d'un ARN double brin entre les transcrits sens et antisens de *psbT* empêche la traduction de l'ARNm *psbT* ou 2) la formation d'un ARN double brin sens/antisens *psbT* induit la dégradation du transcrit *psbT* par un mécanisme similaire à celui des RNAi. Dans ce cas, il est probable que l'absence du transcrit antisens *psbT* chez le mutant *sig3* affecte l'accumulation des transcrits sens de *psbT*. Pour distinguer entre ces deux hypothèses, nous avons alors analysé l'accumulation des différents transcrits sens de *psbT* dans le mutant *sig3* et la plante sauvage (WT).

1.5 Caractérisation des extrémités 5' des transcrits sens de *psbT*

Nous avons mis en évidence par extension d'amorce la présence de deux transcrits sens de *psbT* ayant des extrémités 5' différentes : l'un (-28, fig 26A) est situé au niveau de la région intergénique entre *psbB* et *psbT* (faisant 154 bases, fig 26B) et l'autre (-206, fig 26A) est situé dans la région 3' du gène *psbB* (faisant ~345 bases, fig 26B) (voir fig 26A). L'accumulation de ces transcrits n'est pas affectée dans le mutant *sig3* par rapport à la plante sauvage (WT). Nous pouvons alors à ce stade exclure l'hypothèse de dégradation du transcrit sens *psbT* induite par la formation d'un ARN double brin (hypothèse 2).

Le transcrit situé entre *psbB* et *psbT* est issu directement d'une initiation de la transcription (voir fig 26 B, 5'RACE +/-TAP). Le clonage de l'extrémité 5' du transcrit *psbT* obtenu par 5'RACE montre une différence de quelques nucléotides avec l'extrémité identifiée par l'extension d'amorce (voir fig 26 C). L'initiation de la transcription se fait à la position -28 de l'ATG du gène *psbT* mais le transcrit détecté par l'extension d'amorce est plus court d'environ 12 nucléotides. D'après la structure secondaire du transcrit *psbT* -28 (fig 26D), il est possible que cette différence est due à une activité exonucléase qui s'effectue rapidement après la synthèse de l'ARN et qui s'arrête au niveau d'une boucle. En effet, les trois adénosines (aaa) correspondant à l'extrémité 5' du transcrit *psbT* déterminé par extension d'amorce est situé au niveau d'une tige (structure en double brin), ce qui probablement la protège de la digestion par les nucléases (fig 26D).

L'identification d'un promoteur interne situé en amont de 28 nucléotides de l'ATG de *psbT*, montre pour la première fois l'existence d'un découplage de la transcription du gène *psbT* au niveau de l'opéron *psbB*. Il est possible que sous certaines conditions (physiologiques ou environnementales) la plante ait besoin d'assurer la transcription de *psbT* indépendamment des autres transcrits de l'opéron d'où l'existence de ce promoteur interne (*PpsbT*-28).

En résumé, il existe deux transcrits *psbN* de différentes tailles *in vivo*. Après clivage, le long transcrit libère un ARN antisens de *psbT*. L'absence de ce transcrit dans le mutant *sig3* n'affecte pas l'accumulation des transcrits sens *psbT*. En revanche, la protéine *PsbT* est sur-exprimée dans le mutant *sig3*. Ceci suggère une régulation de la traduction de l'ARNm *psbT* par son antisens.

Par quel moyen l'antisens de *psbT* agit au niveau de la traduction de la protéine *PsbT* ?

Est-ce que l'ARN double brin (sens et antisens) de *psbT* existe *in vivo* ? Quelle est sa structure exacte ?

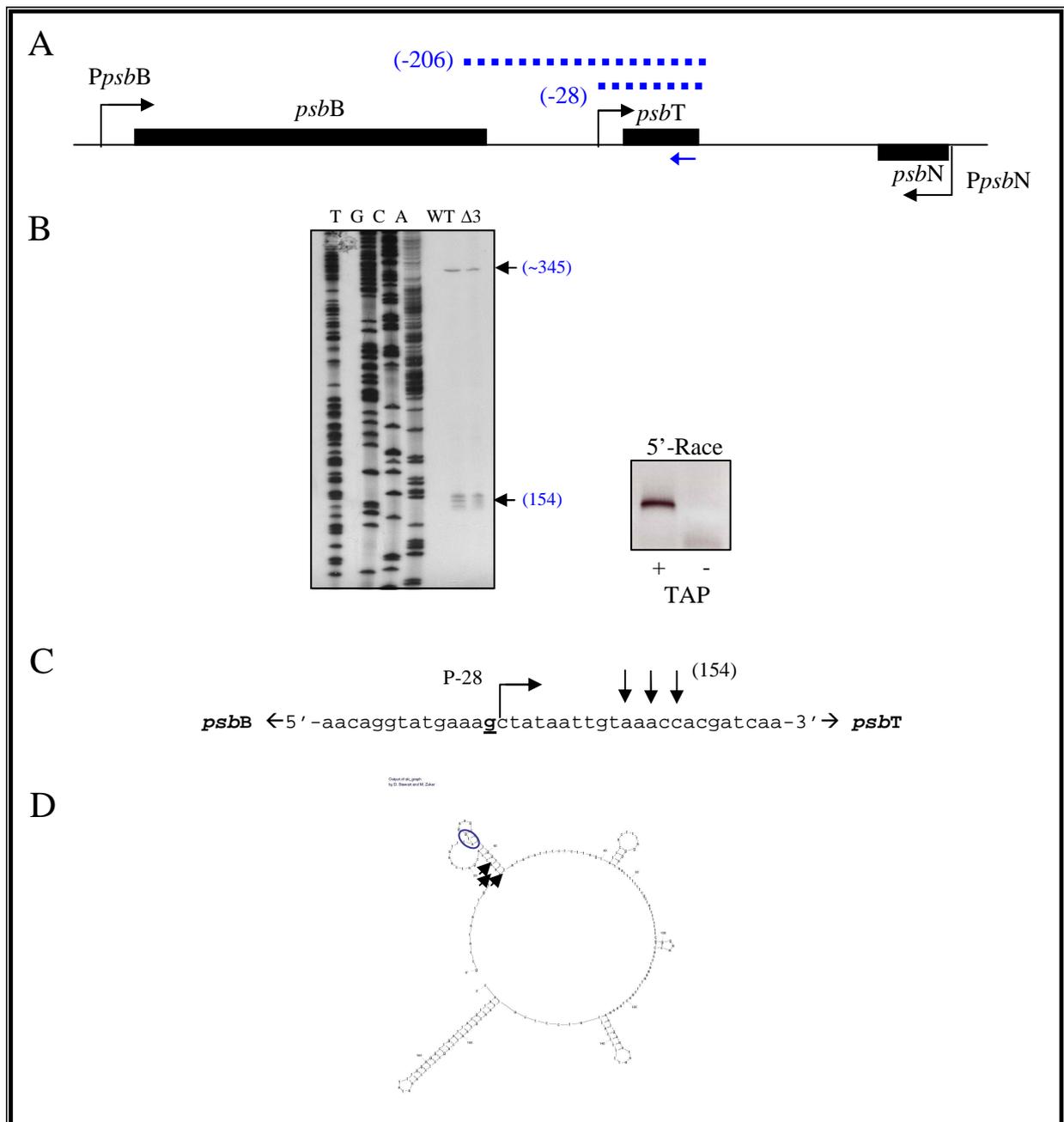


Figure 26 : Détermination des extrémités 5' des transcrits sens de *psbT* et modèle de leur structure

(A) Représentation schématique des gènes *psbB*, *psbT* et *PsbN*. Le transcrit sens de *psbT* (en bleu) possède deux extrémités 5' : un promoteur situé à -28 de l'ATG et un transcrit plus long (-206) situé dans la région 3' de *psbB*. (B) Analyse des transcrits sens de *psbT* par extension d'amorce. Des ARN totaux du WT et mutant ($\Delta 3$) sont rétrotranscrit en utilisant l'amorce 1 (en bleu) située dans le 3' de *psbT*. La séquence contenant le gène *psbT* et une partie de la région 3' de *psbB* a été réalisée manuellement avec la même amorce. Le transcrit *psbT* -28 est identifié comme un transcrit primaire par 5'RACE avec (+) ou sans (-) traitement à la TAP.

(C) Séquence de la région promotrice du gène *psbT*, le site d'initiation de la transcription à la position -28 de l'ATG est illustré par le symbole \lrcorner , les flèches indiquent l'extrémité 5' du transcrit *psbT* déterminée par extension d'amorce.

(D) Structure secondaire du transcrit *psbT* initié à -28 de l'ATG (obtenu par le logiciel *RNA fold* <http://frontend.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/cgi-bin/rna-form1.cgi>). Le cercle bleu indique l'ATG du gène, les flèches montrent l'extrémité 5' du transcrit *psbT* déterminée par extension d'amorce.

1.6 Caractérisation de l'ARN double brin sens et antisens de *psbT* *in vivo*

Nous avons confirmé l'existence des transcrits *psbT* sous forme d'ARN double brin *in vivo* grâce à une technique qui permet de détecter spécifiquement des ARNs double brin par RT-PCR en utilisant des nucléases spécifiques. Toutes les expériences visant à mettre en évidence l'existence de l'ARN double brin *psbT* *in vivo* ont été réalisées à partir d'ARN totaux extraits de graines de plantes sauvages (WT) au stade 1 jour après imbibition. Le choix de ce stade de développement est justifié par l'expression du transcrit *psbT* antisens. En effet, une analyse du transcriptome plastidial au cours de la germination effectuée au sein de notre laboratoire par Demarsy et al. (Résultats non publiés) a montré un taux élevé d'accumulation de l'ARN antisens de *psbT* à ce stade de développement.

Les ARNs doubles brin peuvent résister à des traitements par de faibles concentrations de RNases A et RNases T1. Des ARN totaux extraits de graines sauvages (WT) germées à 1 jour après imbibition, traités à la DNase, ont été digérés avec un mélange des RNases A et T1 afin d'analyser la présence des transcrits sens et antisens de *psbT* comme molécule d'ARN double brin.

Nous avons détecté par RT-PCR le transcrit *psbT* (correspondant à la séquence codante) dans les ARNs traités ainsi que dans les ARNs non traités aux RNases A et T1. Le transcrit contrôle utilisé ici est le messenger nucléaire *APT1* (Adenosyl Phosphoryl Transferase 1) (Cowling et al. 1998). Aucune amplification du transcrit APT n'a été détectée à partir des ARNs traités aux RNases (fig 27). D'après ces résultats, il ressort que les transcrits sens et antisens de *psbT* forment *in vivo* une molécule d'ARN double brin stable.

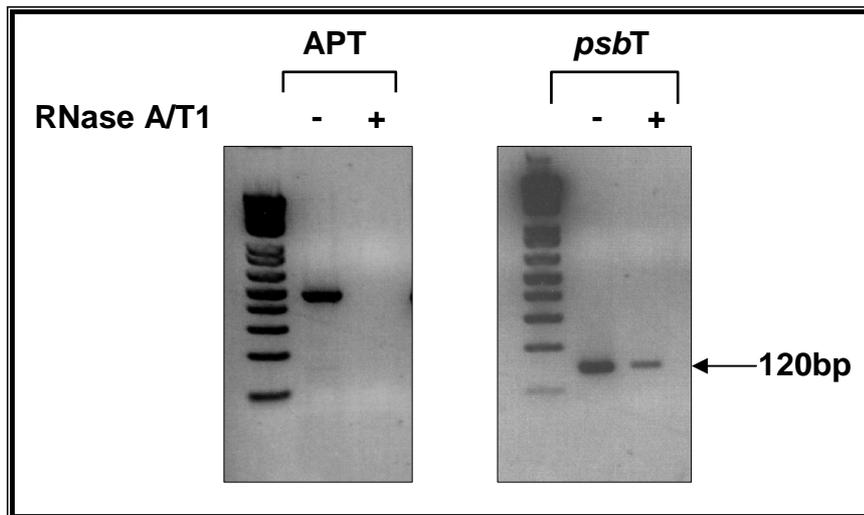


Figure 27 : Détection d'un ARN *psbT* double brin.

2 μ g d'ARN totaux extraits de graines sauvages (WT) germées au stade 1 jour, ont été traités à la DNase puis avec un mélange de RNases A/T1. Une RT-PCR a été réalisée à partir des ARN traités (+) ou non traités (-) aux RNases, en utilisant des amorces spécifiques de *psbT* et d'APT (un transcrite nucléaire utilisé comme contrôle de l'efficacité du traitement aux RNases).

Quelle est la séquence exacte de l'ARN double brin *psbT*.

A priori, vu les séquences des différents transcrits sens et antisens de *psbT* (représentés schématiquement dans la fig 28A), différents types d'ARN doubles brin sens et antisens de *psbT*, pourraient se former dans lesquels, soit l'ARN sens soit l'ARN antisens est plus long que la partie 'double brin' (fig 28 B). Il en ressort ainsi que chez une plante sauvage (WT), au moins une partie des transcrits sens de *psbT* existe sous forme d'ARN double brin, ce qui a probablement des conséquences au niveau de la traduction de l'ARNm *psbT*. Les différents types d'ARN double brin *psbT*, peuvent avoir des comportements différents vis-à-vis de la traduction. Néanmoins, la formation du double brin diminue probablement la traduction de l'ARNm *psbT* vu que la quantité de la protéine PsbT augmente dans le mutant *sig3*, en absence de l'antisens *psbT* (fig 23 et 29).

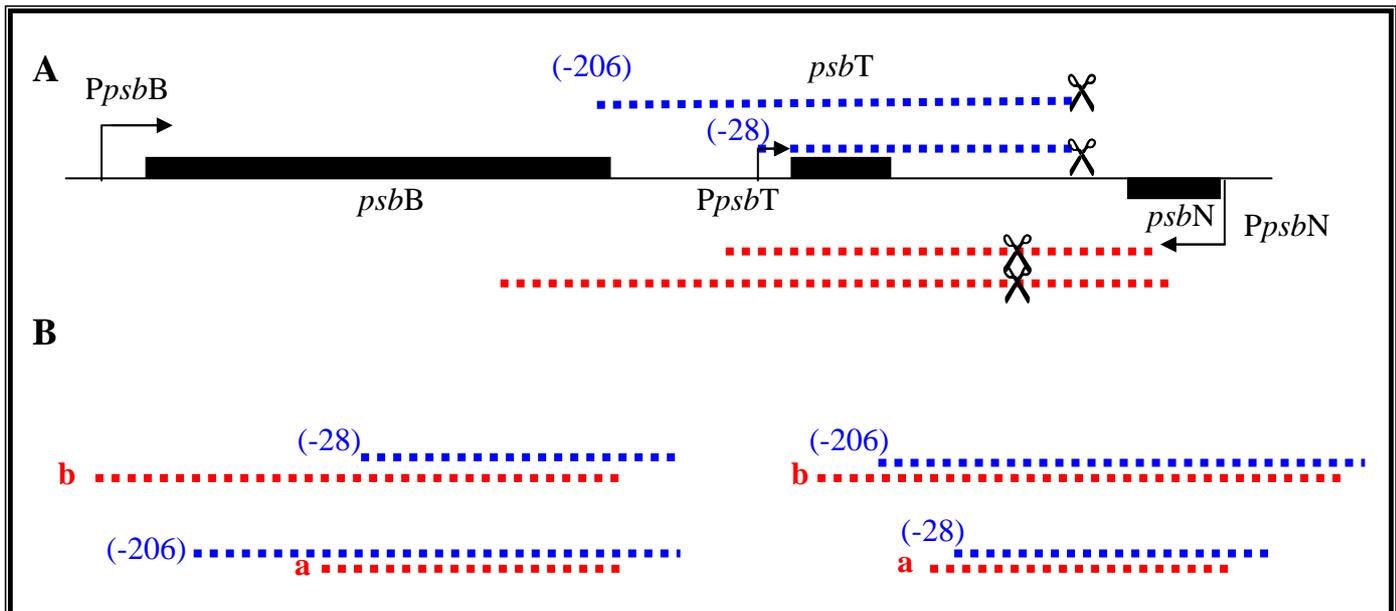


Figure 28: Représentation schématique des différents transcrits de *psbT*.

(A) Le gène *psbT* possède deux types de transcrits : les transcrits sens (en bleu) et des transcrits antisens (en rouge) ayant des origines différents. (B) Ces transcrits peuvent exister sous différentes formes d'ARN double brin.

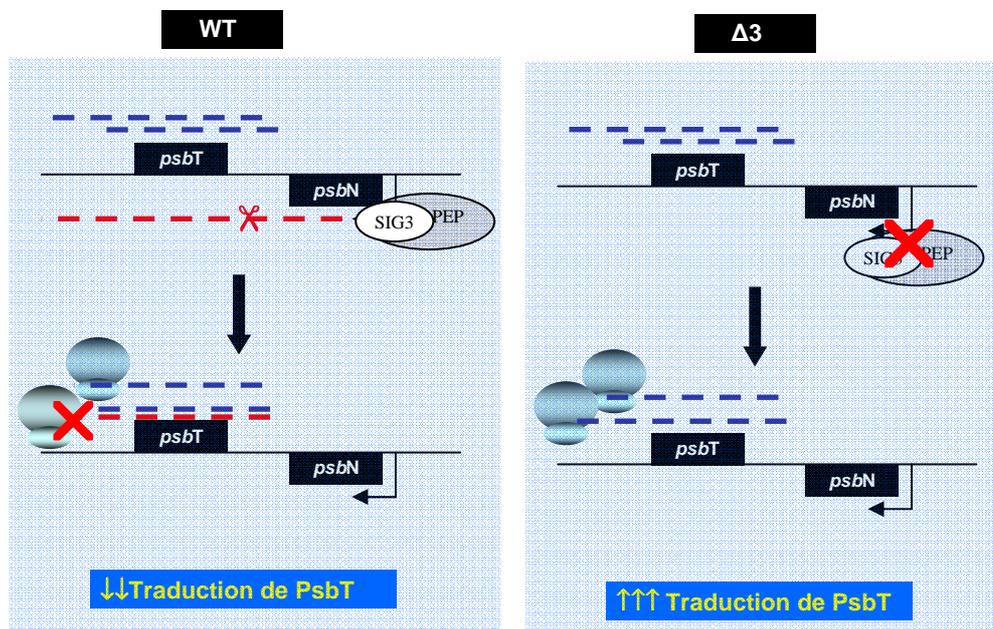


Figure 29 : Hypothèse sur la régulation de la synthèse de la protéine PsbT.

Chez la plante sauvage (WT) une partie des transcrits sens est sous forme d'ARN double brin. L'ARN double brin 'protège' la région 5'UTR du gène *psbT*, ce qui empêche la fixation des ribosomes et par conséquent la traduction de PsbT. Chez le mutant *sig3*, le gène *psbN* n'est pas transcrit et par conséquent les transcrits *psbT* antisens sont absents. Dans ce cas, tous les transcrits sens de *psbT* sont susceptibles d'être traduits, ce qui explique le taux d'accumulation élevé de la protéine PsbT.

1.7 Régulation de l'expression de *psbT* via l'ARN antisens : hypothèses

Nous avons montré que le facteur SIG3 est nécessaire pour la transcription du gène *psbN*. La transcription à partir du promoteur de *psbN* produit des ARNs antisens de *psbT*. L'absence de ces ARN antisens dans le mutant *sig3* est corrélée avec une plus forte expression de la protéine PsbT par rapport à la plante sauvage. De plus, nous avons montré chez la plante sauvage, l'existence de transcrits antisens de *psbT* sous forme d'un ARN double brin couvrant la majorité de la région 5'UTR du transcrit *psbT*. Ainsi, en bloquant l'accès des ribosomes à la région 5'UTR, l'ARN double brin *psbT* inhibe probablement la traduction et ainsi l'accumulation de la protéine *PsbT*.

Ceci suggère l'existence d'une régulation fine de l'expression de *psbT* par l'intermédiaire de son antisens.

Sous quelles conditions se fait cette régulation ? Pourquoi est-il nécessaire de réguler le taux d'accumulation de la protéine *psbT* de manière spécifique ? Pour pouvoir émettre des hypothèses concernant ce mécanisme de régulation, il est nécessaire de connaître la fonction de la protéine PsbT.

Aucune étude n'a été entreprise concernant la fonction de PsbT chez *Arabidopsis thaliana*. Par contre chez *Chlamydomonas*, PsbT joue un rôle important au niveau de la réparation du photosystème II endommagé suite à un stress photo-oxydatif (Ohnishi et al., 2001, 2007). De plus elle joue un rôle important au niveau de la dimérisation du photosystème II chez la cyanobactérie *Thermosynechococcus elongatus* (Iwai et al., 2004). Chez l'épinard, PsbT est une composante du PSII associée au complexe CP47-RC (CP47 Reaction-Center) du PSII (Zheleva et al., 1998).

Ces différentes études suggèrent que la protéine PsbT constitue un composant du photosystème II et qu'elle joue un rôle important lors d'un stress photo-oxydatif des plantes.

La survenue d'un stress photo-oxydatif chez la plante due à une forte illumination (intensité lumineuse d'environ $1000 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ chez *Arabidopsis thaliana*) provoque une déstabilisation du centre réactionnel du photosystème II qui se manifeste par une dégradation des protéines D1 et D2. Dans ce cas, si la protéine PsbT est impliquée dans la réparation du centre réactionnel du photosystème II, elle devrait être synthétisée surtout après un stress. D'une manière générale la plante a besoin de réagir de manière rapide lors d'un stress.

Comment une forte synthèse de la protéine PsbT peut être envisagée après un stress si l'ARNm *psbT* est nécessaire pour une traduction efficace ? Ceci suggère soit une libération de l'ARNm *psbT* du double brin après stress photo-oxydatif, soit une synthèse *de novo* de l'ARNm *psbT*, en absence de la transcription de *psbN*. L'élucidation d'une telle régulation représente un défi pour le futur.

2 Conclusion du chapitre II

Nous avons montré au cours de cette étude que le facteur de transcription SIG3 est nécessaire pour la transcription du gène *psbN*. La transcription de *psbN* produit un ARNm antisens de *psbT*. C'est le premier exemple de la caractérisation d'un ARN antisens endogène dans le chloroplaste.

L'absence de l'ARN antisens de *psbT* dans le mutant *sig3* provoque une augmentation de l'accumulation de la protéine PsbT par rapport à la plante sauvage (WT).

Nous avons montré que l'ARN antisens de *psbT* est présent sous forme d'ARN double brin *in vivo*. Cette structure s'étend jusqu'à la région 5'UTR du gène *psbT*. Il est probable qu'une régulation de la traduction de l'ARNm *psbT* s'effectue par la formation d'un ARN double brin qui bloque probablement l'accès aux ribosomes.

Chapitre III

Régulation de l'expression des sous-unités
plastidiales de l'ATP synthase par le facteur
SIG3

1 Régulation de l'expression des sous-unités plastidiales de l'ATP synthase par le facteur SIG3

L'ATP synthase est un complexe multiprotéique plastidial localisé au niveau des membranes thylacoïdiennes. Il permet la synthèse d'ATP à partir d'adénosine di-phosphate (ADP) et du phosphate inorganique (Pi) en utilisant le gradient électrochimique des protons (provenant du flux d'électrons dépendant de la lumière).

L'ATP synthase est composée de deux sous-complexes : CF1 et CF0. Le complexe CF0 est formé de trois sous unités (CF₀-IV, CF₀-I et CF₀-III) présentant un degré de stœchiométrie différent les unes par rapport aux autres : CF₀-IV₁, CF₀-I₁, CF₀-III₅₋₁₅. Le complexe CF1 contient cinq sous unités (α , β , ϵ , γ et δ) avec une stœchiométrie de 3 :3 :1 :1 :1.

Parmi les différentes sous-unités formant l'ATP synthase, six sont codées par le génome plastidial. Ces gènes sont organisés en deux unités transcriptionnelles différentes: l'une contenant les gènes *rps2*, *atpI*, *atpH*, *atpF* et *atpA*, codant la protéine ribosomale S2 (*rps2*) ainsi que les quatre sous unités de l'ATP synthase : CF₀-IV (*atpI*), CF₀-III (*atpH*), CF₀-I (*atpF*), et CF₁- α (*atpA*) (Hennig and Herrmann, 1986) et l'autre formant l'opéron *atpB/E*, codant respectivement les deux sous unités CF₁- β et CF₁- ϵ (Zurawski et al., 1982).

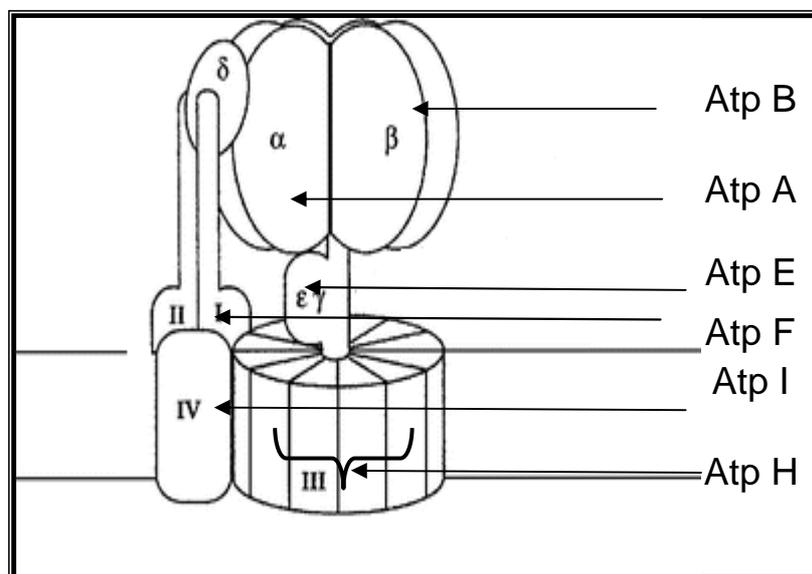


Figure 30 : Représentation schématique de l'ATP synthase plastidiale. Les flèches indiquent le nom du gène codant pour chacune des sous-unités.

Une étude basée sur la quantification de l'intensité des différents co-transcrits de l'unité de transcription *rps2/atpI/atpH/atpF/atpA* chez le maïs a suggéré que la régulation de la synthèse des différents composants du complexe ATP synthase pourrait se faire au niveau transcriptionnel (Stahl et al., 1993). En revanche, d'autres études réalisées chez l'épinard, suggèrent que la régulation se fait principalement au niveau post-transcriptionnel (i.e au niveau de la traduction (Stollar et al., 1994) ou de la stabilité des transcrits (Hotchkiss and Hollingsworth, 1997). Cela suggère que la régulation de l'expression des gènes codant pour l'ATP synthase varie selon les espèces. Nous avons procédé à une analyse de l'expression des gènes plastidiaux codant l'ATP synthase chez *Arabidopsis thaliana* d'une manière générale chez la plante sauvage et de façon plus particulière chez le mutant *sig3*.

En effet, l'analyse du profil d'expression des gènes plastidiaux dans le mutant *sig3* par puce à ADN, a montré une diminution des ARNm *atpH* et *atpB* (voir chapitre I).

De plus, nous avons observé chez la plante sauvage que l'ARNm *atpH* s'accumule de manière plus importante que les autres transcrits codants les sous unités de l'ATP synthase (5 à 12 fois, les valeurs étant variables entre les expériences) (voir fig 31).

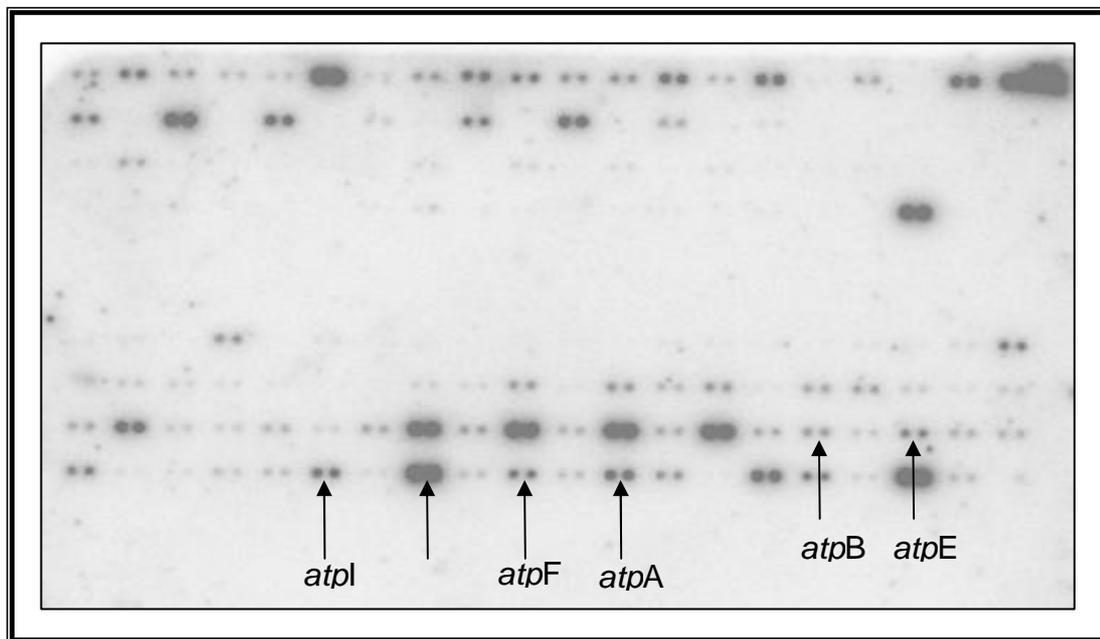


Figure 31 : Profil d'accumulation des gènes plastidiaux chez la plante sauvage obtenus par puce à ADN, ceux codant pour l'ATP synthase plastidiale sont indiqués par des flèches.

Quel rôle joue le facteur SIG3 au niveau de la transcription des gènes *atpH* et *atpB* ?

Est ce que la synthèse des sous-unités de l'ATP synthase peut être régulée de manière différentielle grâce au facteur SIG3, notamment pour les gènes *atpH* et *atpB* ?

Pour répondre à cette question, nous avons analysé, par extension d'amorce et 5'-RACE, les différents transcrits des gènes codant pour les sous-unités de l'ATP synthase (l'opéron *atpI/H/F/A* et l'opéron *atpB/E*) dans le mutant *sig3* et la plante sauvage (WT).

Cette partie du travail a été réalisée en collaboration avec Livia Merendino et Mustapha Malik-Ghulam.

1.1 Analyse de l'expression des gènes de l'opéron *atpI/atpH/atpF/atpA* à l'aide du mutant *sig3*

1.1.1 Identification du promoteur du gène *atpH*

L'analyse de l'accumulation de l'ARNm *atpH* dans les plantes sauvages et le mutant *sig3* par Northern blot, montre une diminution de plusieurs transcrits de tailles différentes (entre 400 et 1200 kb, voir fig 14, Chapitre I). D'après leur taille, on peut conclure que ces transcrits pourraient provenir uniquement de la transcription du gène *atpH* (ils sont plus petits que les co-transcrits de l'opéron). Ceci suggère fortement que le gène *atpH* soit transcrit d'une façon découplé de l'opéron *atpI/atpH/atpF/atpA* sous le contrôle du facteur SIG3.

Pour confirmer cette hypothèse, nous avons analysé l'expression du transcrit *atpH* chez les plantes sauvages et le mutant *sig3* par la technique d'extension d'amorce en utilisant deux amorces (a et b ; voir fig 32A). L'amorce a nous a permis d'identifier un transcrit *atpH* situé à la position -45 par rapport à l'ATG (voir fig 32B, lignes 1 et 2). Grâce à l'amorce b nous avons pu identifier l'extrémité 5' du deuxième transcrit *atpH* situé à 413 nucléotides en amont de l'ATG (voir fig 32B, lignes 3 et 4).

Le transcrit *atpH* (-45) correspond à un produit de clivage d'un transcrit précurseur qui provient probablement d'un promoteur situé en amont (voir fig 32B, 5'Race, lignes 5 et 6). Ce transcrit ne varie pas dans le mutant *sig3* par rapport au sauvage (WT) (voir fig 32 B, lignes 1 et 2). En revanche, le transcrit *atpH* (-413) disparaît complètement dans le mutant *sig3* (voir fig32B, lignes 3 et 4). Il peut être amplifié par 5'RACE PCR uniquement à partir d'ARN traités à la phosphatase TAP (voir fig32B, 5'Race, lignes 7 et 8) : c'est donc un transcrit primaire spécifique du facteur SIG3.

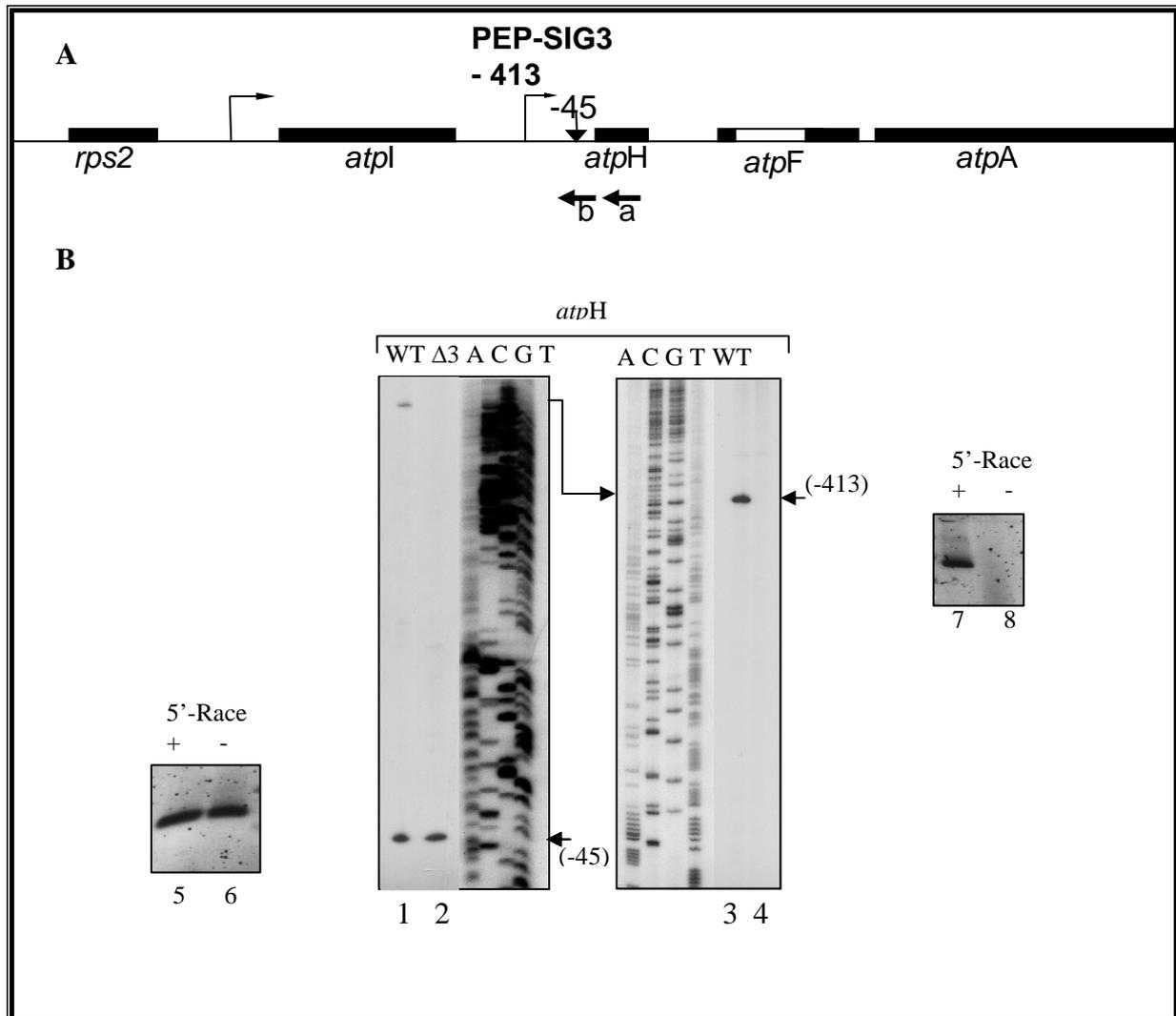


Figure 32 : Analyse des ARNs précurseurs *atpH*.

(A) Représentation schématique de l'opéron *atpI/atpH/atpF/atpA*.

(B) Les ARN totaux utilisés ont été extraits à partir de plantules sauvages (WT) et mutantes *sig3* ($\Delta 3$) âgées de 6 jours. Après transcription inverse avec un oligonucléotide marqué, les ADNc obtenus ainsi que les séquences (faites manuellement avec le même oligo, voir matériel et méthodes) correspondantes à la région promotrice du gène *atpH* ont été séparés sur un gel de polyacrylamide dénaturant. La première extension d'amorce, réalisée avec un oligonucléotide situé dans la région codante d'*atpH* (amorce a, lignes 1 et 2), a pu mettre en évidence deux transcrits différents pour *atpH*. Pour mieux préciser l'extrémité du second transcrit du gène *atpH*, nous avons effectué une deuxième extension d'amorce en utilisant un oligonucléotide situé dans la région 5'UTR d'*atpH* (amorce b, lignes 3 et 4). La caractérisation des deux transcrits *atpH* identifiés a été réalisée avec la technique 5'RACE avec (+) ou (-) traitement à la TAP : le transcrit *atpH* (-45) provient du clivage d'un transcrit précurseur (lignes 5 et 6) tandis que le transcrit *atpH* (-413) correspond à un site d'initiation de la transcription (lignes 7 et 8).

Il existe ainsi deux transcrits différents pour le gène *atpH* situés respectivement à -413 et -45 de l'ATG. Le facteur SIG3 est responsable de la transcription du long transcrit *atpH* (-413) par l'intermédiaire d'un promoteur spécifique situé en amont de la position -413.

Ainsi, en absence de SIG3, le transcrit provenant du promoteur situé à la position -413 est absent. Dans ce cas, l'ARNm *atpH* provient uniquement d'un co-transcrit *atpI/atpH* qui est clivé à la position -45 du transcrit *atpH*. La diminution de l'expression du gène *atpH* observée chez le mutant *sig3* est due à l'absence du transcrit *atpH* initié à la position -413.

Le gène *atpH* code la sous unité la plus abondante au niveau du complexe protéique ATP synthase. Nous avons montré que l'unique promoteur du gène *atpH* est exclusivement contrôlé par le facteur SIG3. Néanmoins, nous avons mis en évidence l'existence d'un autre transcrit *atpH* issu du clivage d'un transcrit précurseur probablement initié à partir d'un promoteur situé en amont du gène *atpI*.

Bien que le gène *atpH* soit également co-transcrit (probablement avec *atpI*), son expression est fortement dépendante d'un promoteur spécifique du facteur SIG3. Nos résultats suggèrent ainsi que la synthèse de la protéine CF0-III soit en grande partie régulée de manière transcriptionnelle.

Dans ce cas, comment est régulée l'expression du gène *atpH* ?

Quel est le rôle du promoteur *PatpH* -413, spécifique du facteur SIG3 ?

1.1.2 Expression du gène *atpH* au cours de la germination

Afin d'étudier la régulation de l'expression des différents transcrits *atpH* (-413) et *atpH* (-45), nous avons analysé par extension d'amorce, l'expression du gène *atpH* au cours de la germination et du développement de la jeune plantule c'est-à-dire lors de la transformation des proplastides, présents dans les graines sèches en chloroplastes. Nous avons choisi, d'analyser les stades graines sèches (0), graines imbibées (0+) et des plantules à 2,4 et 6 jours après germination (fig 33 A).

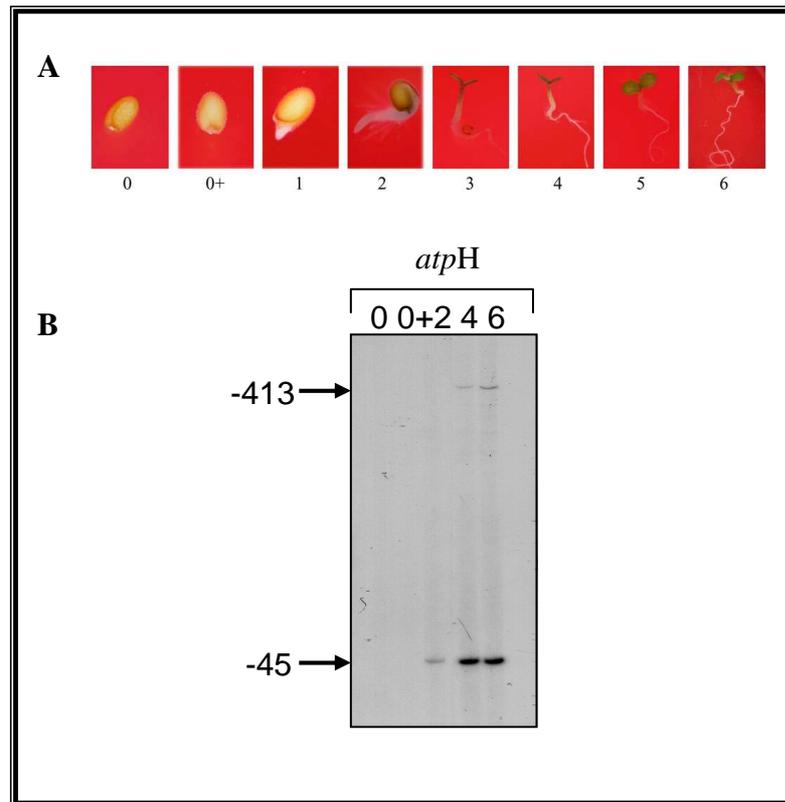


Figure 33 : Analyse de l'expression du gène *atpH* au cours de la germination.

(A) Stades de développement d'Arabidopsis. Les graines de plantes sauvage ont été imbibées pendant 72h à 4°C à l'obscurité (stade 0+) puis transférées en chambre de culture à 23°C en 16h lumière/8h obscurité (image tirée de Demarsy et al., 2006).

(B) Des extensions d'amorces ont été réalisées pour le gène *atpH* à partir d'ARN extraits de graines sèches (stade 0), après 72h d'imbibition (stade 0+) et à partir de jeunes plantules à 2, 4 et 6 jours après la germination.

Nous pouvons conclure suite à cette analyse, que le gène *atpH* s'exprime dès le 2^{ème} jour après imbibition qui correspond à l'élongation de la radicule (voir fig 33A). Toutefois, à ce stade (2 jours), l'ARNm *atpH* provient uniquement du co-transcrit *atpI-atpH* et correspond au transcrit libéré par processing, *atpH* (-45). Le promoteur *PatpH* -413 spécifique de SIG3 s'active plus tard (au cours du 4^{ème} jour, voir fig 33B).

D'après ces résultats, nous pouvons conclure que l'expression du gène *atpH* est fortement régulée au niveau transcriptionnel au cours de la germination. Cette régulation s'effectue par l'activation différentielle des promoteurs : le promoteur responsable de l'apparition du transcrit (-45) du gène *atpH* est utilisé plus tôt que le promoteur *PatpH* -413.

L'analyse de l'expression du gène *atpH* dans le mutant *sig3* au 2^{ème} jour après la germination, montre que le transcrit *atpH* (-45) s'accumule de manière plus importante dans le mutant *sig3* par rapport à la plante sauvage (fig 34). Ceci peut être dû soit à une stabilisation plus élevée du transcrit *atpH* (-45) dans le mutant *sig3* soit à une augmentation de la quantité du co-transcrit *atpI/atpH* pour compenser l'absence du transcrit monocistronique *atpH* (-413).

Afin de vérifier ces hypothèses, nous avons analysé le co-transcrit *atpI/atpH* i.e l'ARNm précurseur transcrit à partir d'un promoteur situé en amont du gène *atpI*.

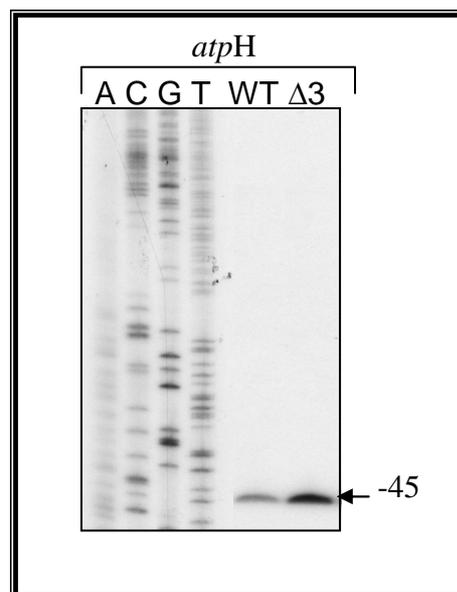


Figure 34 : Analyse de l'expression du gène *atpH* chez le mutant *sig3* au stade 2 jours après germination.

Des extensions d'amorces ont été réalisées pour le gène *atpH* à partir d'ARN extraits de plantules sauvages (WT) et mutantes ($\Delta 3$) au stade 2 jours après la germination.

1.1.3 Analyse des transcrits *atpI*

Nous avons analysé les transcrits *atpI* dans les plantes sauvages et le mutant *sig3* à 2 et 6 jours après la germination. Chez *Arabidopsis*, le gène *atpI* est transcrit à partir d'un promoteur situé en amont de la position -229 de l'ATG (Swiatecka-Hagenbruch et al., 2007).

Pour déterminer le type d'ARN polymérase impliquée dans la transcription du gène *atpI*, nous avons effectué une extension d'amorce sur des ARNs de plantes sauvages cultivées *in vitro* en présence de spectinomycine, un antibiotique qui inhibe la traduction plastidiale (Moazed and Noller, 1987). Les plantes cultivées en présence de spectinomycine sont déficientes en PEP (ARN polymérase plastidiale). Le transcrit *atpI* (-229) est absent chez les plantes traitées à la spectinomycine, ce qui montre qu'il est transcrit par l'ARN polymérase PEP. En revanche, le transcrit *atpI* s'accumule de la même manière aussi bien chez le mutant *sig3* que chez le sauvage quelque soit le stade de développement (2 jours ou 6 jours) (voir fig 35). L'holoenzyme SIG3/PEP ne reconnaît donc pas le promoteur *PatpI* -229.

Il est probable à ce stade que le transcrit *atpH* (-45) provient du clivage du co-transcrit *atpI/atpH* initié à partir du promoteur *PatpI* -229. Néanmoins, au stade 2 jours l'expression du transcrit *atpI* ne varie pas dans le mutant *sig3* par rapport à la plante sauvage (WT). Dans ce cas, l'augmentation de l'accumulation du transcrit *atpH* (-45) observée dans le mutant *sig3* au stade 2 jours (fig 35) ne provient pas de l'activation du promoteur *PatpI*-229 mais plutôt d'une plus grande stabilité des transcrits *atpH* (-45).

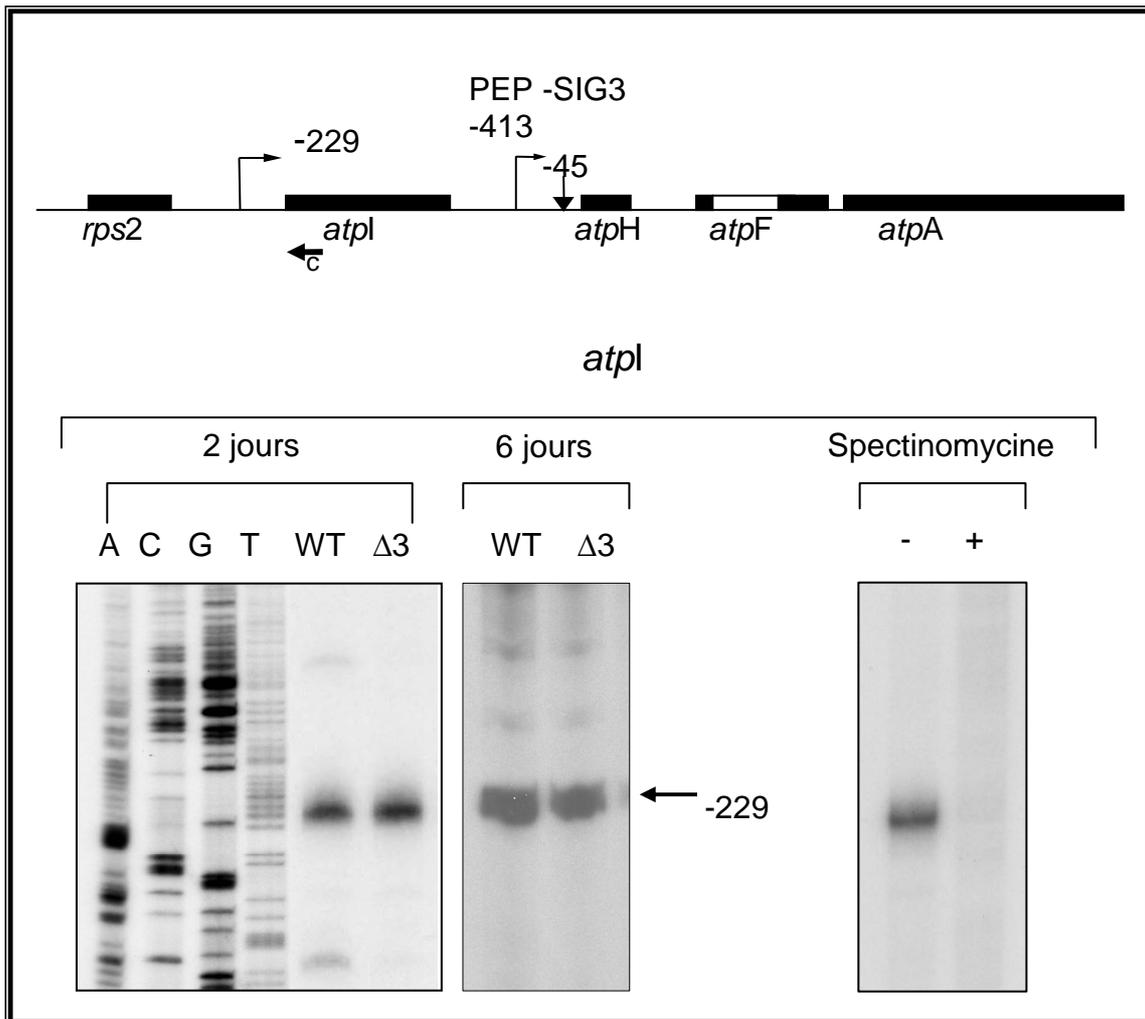


Figure 35 : Analyse des ARNs précurseurs *atpI*.

Les ARN totaux utilisés ont été extraits à partir de plantules sauvages (WT) et mutantes *sig3* ($\Delta 3$) âgées de 2 et 6 jours ainsi que de plantes sauvages (WT) cultivées *in vitro* en présence (+) ou en absence (-) de spectinomycine ont été rétro-transcrits en présence d'un oligonucléotide marqué en 5' par du P^{32} (amorce c).

En résumé, chez *Arabidopsis*, le gène *atpI* est transcrit à partir d'un seul promoteur PEP situé à 229 nucléotides en amont du site d'initiation de la traduction (ATG). Ce promoteur n'est pas sous le contrôle du facteur de transcription SIG3. Il est probablement à l'origine du transcrit *atpH* (-45), par clivage du co-transcrit *atpI/atpH*.

Pourtant, du fait que les deux gènes *atpF* et *atpA* sont situés en aval du gène *atpH*, nous avons analysé l'expression du gène *atpF* afin d'étudier l'influence de l'absence du transcrit *atpH* (-413) sur l'accumulation des transcrits *atpF*.

1.1.4 Analyse des transcrits *atpF*

Nous avons analysé par extension d'amorce les transcrits du gène *atpF* dans le mutant *sig3* ainsi que dans la plante sauvage. En utilisant pour la reverse transcription, une amorce située au niveau de la région codante du gène *atpF* (amorce d, voir fig 36A), nous avons détecté la présence des deux transcrits très longs correspondants à *atpH* (-413) et *atpH* (-45) (fig 36B). En utilisant des ARN de plantes sauvages cultivées en présence (+, fig 36B, ligne 3) et en absence (-, fig 36B, ligne 4) de spectinomycine, nous avons confirmé que les deux transcrits *atpH* (-45) et (-413) proviennent d'une transcription par l'ARN polymérase plastidiale, PEP. Le transcrit (-413) est issu d'une initiation de la transcription tandis que le transcrit (-45) provient du clivage du co-transcrit *atpI/atpH* (voir fig 36B, 5'RACE lignes 5 et 6).

D'après ces résultats nous concluons que le gène *atpF* est co-transcrit avec les gènes *atpI* et *atpH* et qu'il ne possède pas de promoteurs spécifiques. L'absence de SIG3, affecte ainsi de manière indirecte l'expression du gène *atpF*. Ce résultat est en accord avec celui obtenu lors de l'analyse du profil d'accumulation des transcrits plastidiaux chez le mutant par puce à ADN (voir tableau I, Chapitre I).

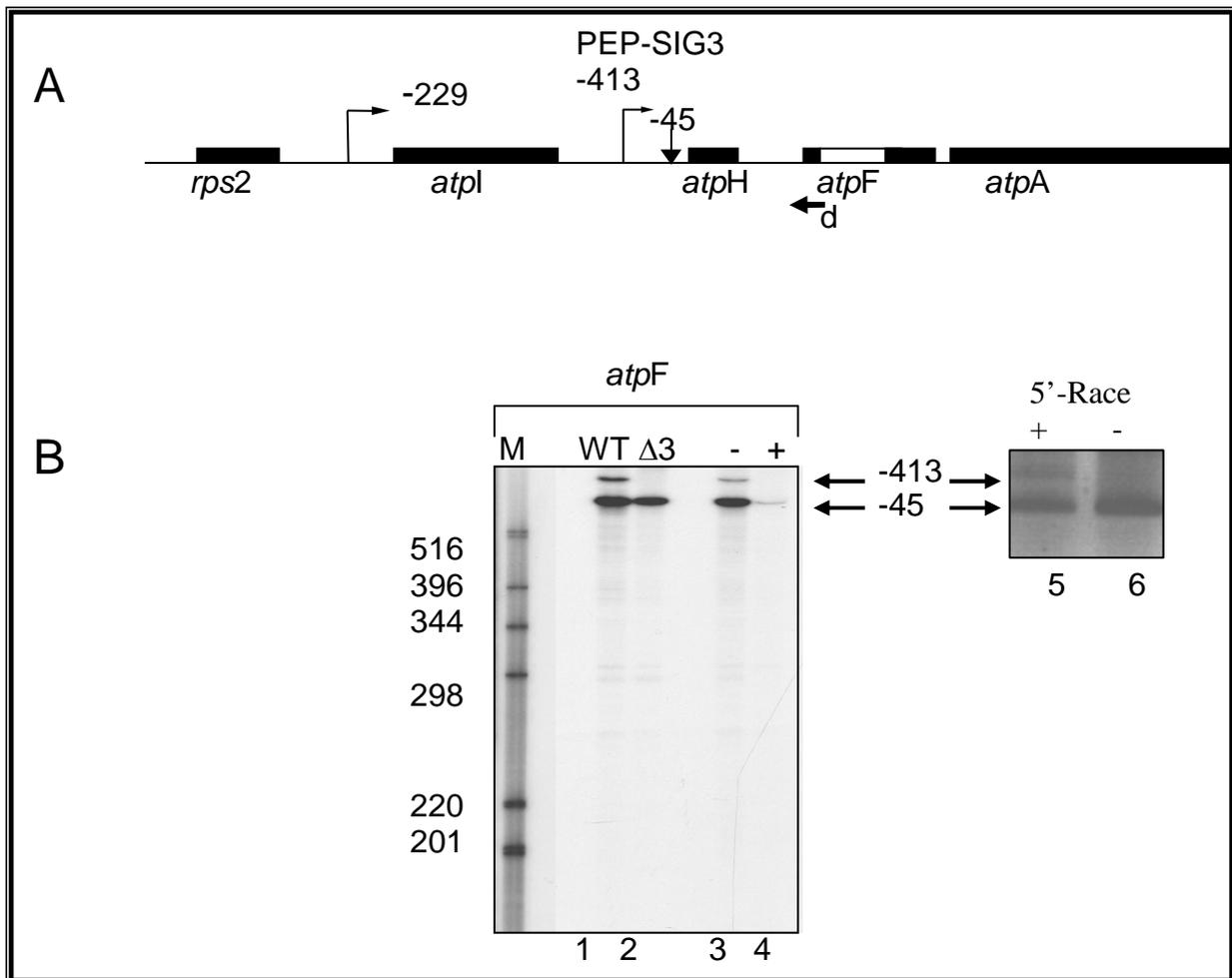


Figure 36: Analyse des ARNs précurseurs *atpF*.

(A) Représentation schématique de l'unité de transcription *rps2/atpI/H/FA*.

(B) Les ARN totaux utilisés ont été extraits à partir de plantules sauvages (WT) et mutantes *sig3* ($\Delta 3$) âgées de 6 jours ainsi que de plantes sauvages (WT) cultivées *in vitro* en présence (+) ou en absence (-) de spectinomycine. Ils ont été rétro-transcrit en présence d'un oligonucléotide marqué en 5' par du P^{32} (amorce d). M : marqueur de taille d'ADN marqué en 5' avec du ^{32}P .

En conclusion, nous avons pu montrer l'existence d'un promoteur spécifique du facteur SIG3 pour le gène *atpH*. Dans le mutant *sig3* l'accumulation des ARNm *atpH* est réduite par rapport au sauvage. Est-ce que la transcription d'*atpH* à partir du promoteur spécifique du facteur SIG3 joue un rôle au niveau de la régulation de la synthèse de la sous unité CF0-III en assurant un taux important de transcrits *atpH* ?

Nous suggérons néanmoins que le complexe PEP- SIG3, en reconnaissant spécifiquement le promoteur *PatpH-413*, produit un transcrit monocistronique pour le gène *atpH* augmentant ainsi spécifiquement l'expression du gène *atpH* par rapport aux autres composants de l'opéron et participe ainsi à l'établissement de la stoechiométrie des sous unités du complexe

CF0 de l'ATP synthase. Si c'est le cas, il faudrait supposer qu'une grande partie des transcrits initiés au niveau du promoteur *PatpH*-413 par le complexe PEP- SIG3 s'arrêtent à la fin du gène *atpH* et ne donne pas de co-transcrits *atpH*- *atpF*/ *atpA* (autrement, les ARNm *atpF*/ *atpA* devraient avoir le même taux d'accumulation).

Nous avons analysé, à l'aide de logiciel d'analyse de séquence (*RNA fold*) la région intergénique entre les gènes *atpH* et *atpF* à la recherche d'éléments nous permettant de valider notre hypothèse à savoir, des terminateurs potentiels de la transcription. La structure secondaire obtenue, montre l'existence d'un terminateur de la transcription situé juste à la fin de la région codante d'*atpH* (voir fig 37). Si ce site de terminaison de la transcription est effectivement reconnu par le complexe PEP-SIG3 *in vivo*, cela pourrait expliquer le mécanisme de régulation de la synthèse de la sous unité CF0-III codée par le gène *atpH*.

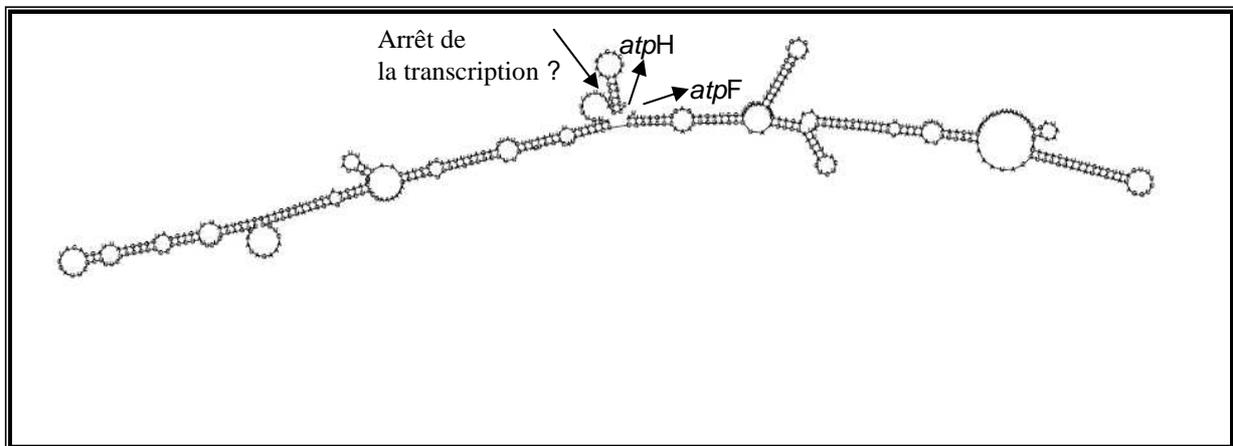


Figure 37 : Structure secondaire de la région intergénique entre les gènes *atpH* et *atpF*.

La séquence de la région intergénique entre les gènes *atpH* et *atpF* a été soumise au logiciel *RNA fold* (<http://mobylye.pasteur.fr/cgi-bin/MobylyePortal/portal.py?form=rnafold>) pour obtenir la structure secondaire.

Pour valider cette hypothèse, il serait nécessaire de déterminer en premier lieu, l'extrémité 3'UTR du transcrit *atpH* -413 chez la plante sauvage par la technique de circular RT-PCR (cRT-PCR).

1.2 Analyse de l'expression des gènes de l'opéron *atpB/E*

1.2.1 Détermination des transcrits *atpB*

Chez *Arabidopsis thaliana*, l'opéron *atpB/E* est co-transcrit à partir de deux promoteurs (*PatpB* -520 et *PatpB* -319) situés au niveau de la région promotrice du gène *atpB* (Swiatecka-Hagenbruch et al., 2007).

Nous avons observé par Northern blot (Chapitre I) une baisse du co-transcrit *atpB/E* de la taille de 2.6 KB, ce qui permet de supposer que la transcription du gène *atpB* est aussi sous le contrôle du facteur Sigma 3. Pour déterminer le promoteur du gène *atpB* contrôlé par le facteur SIG3, nous avons caractérisé par extension d'amorce chez le mutant *sig3* et chez la plante sauvage, l'accumulation des différents transcrits du gène *atpB* (fig 38).

Trois différents transcrits *atpB* sont alors observés : le transcrit -520 (initié à partir d'un promoteur PEP situé en amont, identifié préalablement par Swiatecka-Hagenbruch et al., 2007), le transcrit -467 et le transcrit -84 (fig 38, lignes 3,4 et 8,9). Ces deux derniers n'ont pas été déterminés auparavant chez *Arabidopsis*.

Le transcrit *atpB* - 467 diminue fortement dans le mutant *sig3*. Ce transcrit disparaît chez les plantes cultivées en présence de spectinomycine (voir fig 38 B, lignes 1 et 2), de plus il ne peut être détecté par 5' RACE à partir d'ARN non traités à la TAP (voir fig 38 B 5'RACE, lignes 10 et 11) : c'est donc un transcrit issu d'un promoteur PEP spécifique du facteur SIG3. L'accumulation du transcrit *atpB* -84 n'est pas affectée dans le mutant *sig3*. Ce transcrit provient probablement du clivage du transcrit précurseur PEP, *atpB* -520 comme le suggèrent fortement les résultats d'extension d'amorce et du capping par 5'RACE (voir fig 38 B, lignes 1-6).

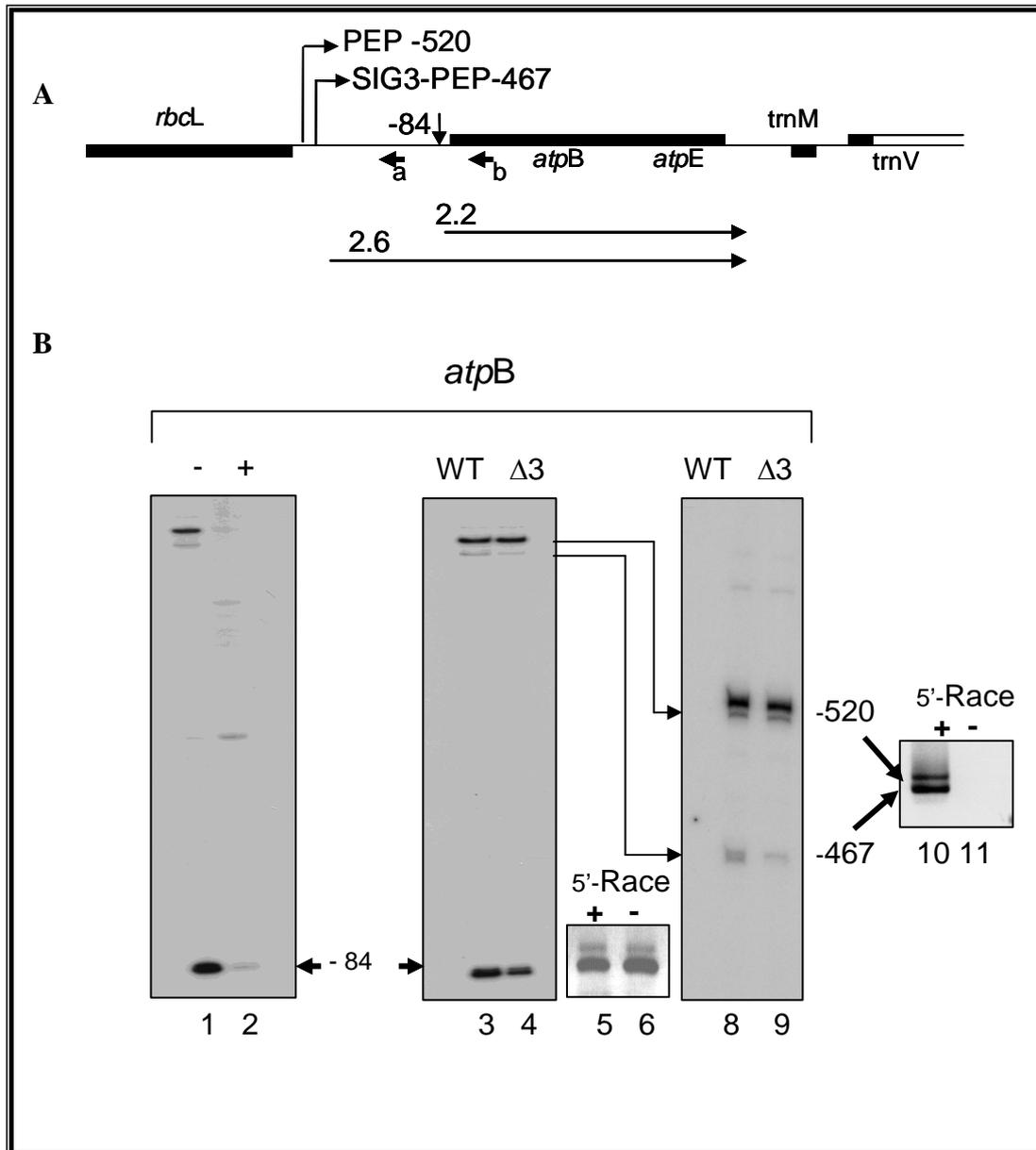


Figure 38 : Analyse des ARNs précurseurs *atpB*.

(A) Représentation schématique de l'opéron *atpB/E* d'*Arabidopsis thaliana*.

(B) Les ARN totaux ont été extraits à partir de plantules sauvages (WT) et mutantes *sig3* ($\Delta 3$) âgées de 6 jours. Nous avons réalisé deux extensions d'amorce pour le gène *atpB*. La première réalisée avec un oligonucléotide situé dans la région codante d'*atpB* (amorce b, lignes 3 et 4), a pu mettre en évidence trois transcrits différents pour *atpB*. Pour mieux préciser l'extrémité des deux transcrits du gène *atpB* qui sont plus longs, nous avons effectué une deuxième extension d'amorce en utilisant un oligonucléotide situé dans la région 5'UTR d'*atpB* (amorce a, lignes 8 et 9). La caractérisation des transcrits *atpB* identifiés a été réalisée avec la technique 5'RACE avec (+) ou (-) traitement à la TAP : le transcrit *atpB* (-84) provient du clivage d'un transcrit précurseur (lignes 5 et 6) tandis que les transcrits *atpB* (-520) et (-467) sont des transcrits primaires (lignes 10 et 11). Ces différents transcrits proviennent de la transcription par l'ARN polymérase plastidiale PEP comme l'indique l'extension d'amorce réalisée avec l'amorce b sur des ARN obtenus de plantes cultivés en présence (+) ou en absence (-) de spectinomycine (lignes 1 et 2).

Le gène *atpB* est donc transcrit à partir de deux promoteurs reconnus spécifiquement par l'ARN polymérase plastidiale PEP : le promoteur *PatpB* -520 et le promoteur *PatpB* -467. Seul le promoteur *PatpB* -467 est sous le contrôle du facteur SIG3. Les deux transcrits *atpB* (-520) et *atpB* (-467) seraient à l'origine d'un co-transcrit *atpB/E* de taille 2.6 Kb. Celui-ci subit un clivage à la position -84 par rapport à l'ATG et libère un co-transcrit de taille 2.2 kb. Le co-transcrit *atpB/E* de taille 2.2 Kb diminue dans le mutant *sig3*, voir Northern blot fig 16, Chapitre I. Par rapport aux résultats obtenus par Northern blot et extension d'amorce, le promoteur *PatpB* -467, reconnu par SIG3, présente un taux d'expression faible comparé au promoteur *PatpB* -520. Ceci peut être dû aux conditions de culture des plantes utilisées dans nos cas. L'influence du facteur environnemental sur l'expression du promoteur *PatpB* -467 spécifique de SIG3, devrait être analysée de manière plus détaillée.

En conclusion, le facteur SIG3, régule de manière modérée, l'expression du gène *atpB*.

Les gènes codant pour les sous unités CF₁-β (*atpB*) et CF₁-ε (*atpE*) sont co-transcrits. Le site de terminaison de la traduction du gène *atpB* se chevauche avec le site d'initiation de la traduction du gène *atpE*. L'étude de l'expression de l'opéron *atpB/E* a montré l'existence d'un couplage de la traduction des deux gènes *atpB* et *atpE* (Gatenby et al., 1989) ainsi que l'existence, chez le tabac, d'un promoteur interne spécifique du gène *atpE* localisé au niveau de la région codante du gène *atpB* (Kapoor et al., 1994).

Est-ce qu'il existe également un promoteur interne pour le gène *atpE* chez *Arabidopsis thaliana* ? Serait-il dépendant du facteur SIG3 ?

1.2.2 Détermination des transcrits *atpE*

Nous avons déterminé les transcrits *atpE* en choisissant une amorce située au niveau de l'extrémité 5' du gène. Nous avons pu mettre en évidence l'existence d'un transcrit *atpE* situé à 431 nucléotides de l'ATG (fig 39, lignes 1 et 2). L'analyse par 5'RACE après traitement des ARNs par la phosphatase (TAP) montre que le transcrit *atpE* (-431) provient d'une initiation de la transcription (voir fig 39, lignes 5 et 6). Le promoteur correspondant est reconnu par l'ARN polymérase plastidiale, PEP (il disparaît complètement chez les plantes traitées avec la spectinomycine, voir fig 39, lignes 3 et 4). En revanche, le promoteur *atpE*-431 n'est pas spécifique du facteur SIG3 *i.e* l'accumulation du transcrit *atpE* (-431) n'est pas affectée dans le mutant *sig3* (voir fig 39, lignes 1 et 2).

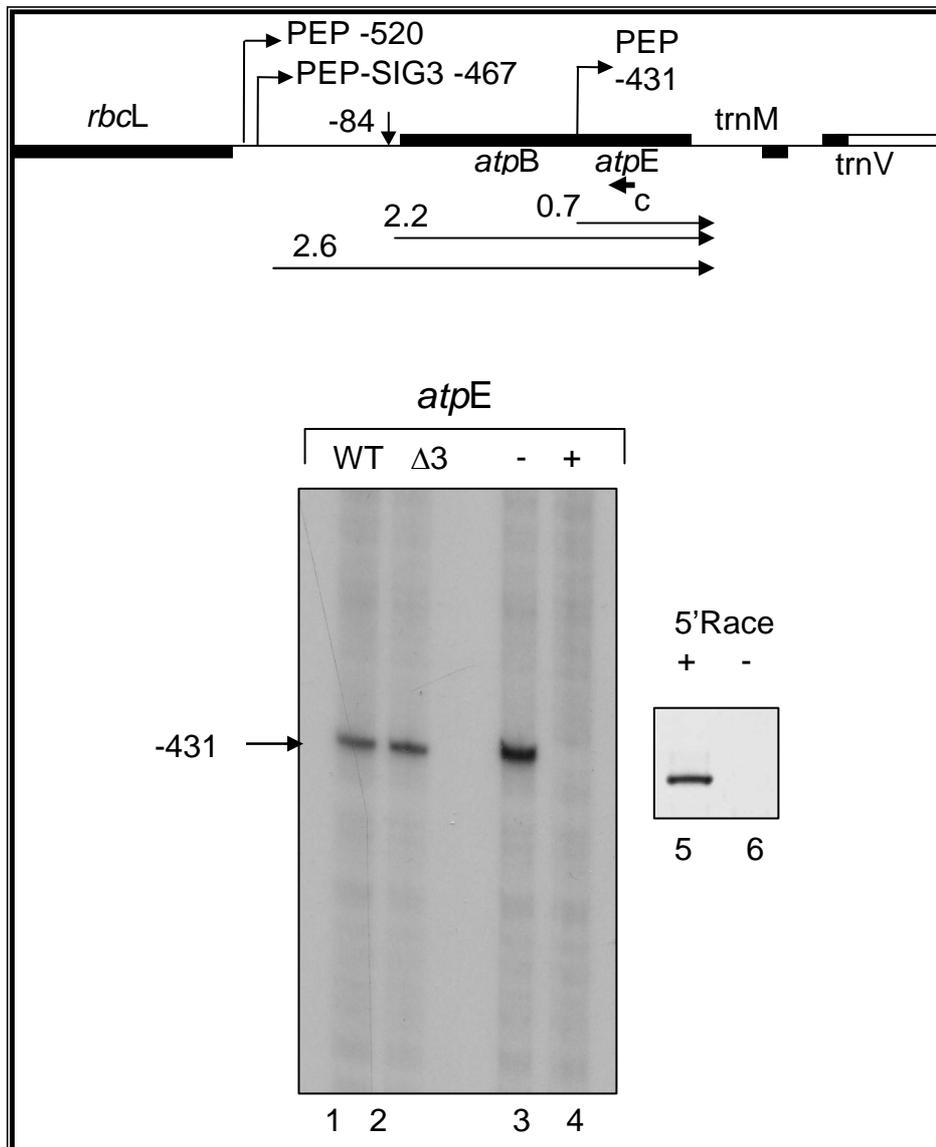


Figure 39 : Caractérisation des transcrits *atpE*.

Les ARN totaux ont été extraits à partir de plantules sauvages (WT) et mutantes *sig3* ($\Delta 3$) âgées de 6 jours. L'extension d'amorce qui a été réalisée avec un oligonucléotide situé dans la région codante du gène *atpE* (amorce c, ligne 1 et 2) montre un transcrit *atpE* situé à 431 nucléotides en amont de l'ATG. La caractérisation de ce transcrit a été réalisée avec la technique 5'RACE avec (+) ou (-) traitement à la TAP (lignes 5 et 6) et par extension d'amorce réalisée avec l'amorce c sur des ARN des plantes cultivées en présence (+) ou en absence (-) de spectinomycine (lignes 3 et 4).

D'une manière générale, l'expression de l'opéron *atpB/E* est affectée dans le mutant *sig3* (au niveau du promoteur *PatpB* -467). En revanche, le gène *atpE*, bien que co-transcrit avec *atpB*, possède un promoteur PEP spécifique qui ne dépend pas du facteur SIG3.

2 Conclusion

Nous avons pu identifier deux promoteurs spécifiques du facteur SIG3 : le promoteur *PatpH*-413 et *PatpB* -467. Nous avons montré que l'expression des différents gènes codant pour les sous unités de l'ATP synthase plastidiale est exclusivement contrôlée par l'ARN polymérase plastidiale, PEP. Le facteur SIG3 participe par la transcription spécifique du gène *atpH* à partir du promoteur *PatpH*-413 à la synthèse de la sous unité CF0-III et ainsi à l'établissement de la stœchiométrie 1 :5-12 :1 du complexe CF0 de l'ATP synthase plastidiale. De plus, il régule de manière plus modérée l'expression du gène *atpB*.

Discussion

Nous avons étudié au cours de ce travail un mutant d'*Arabidopsis* présentant une insertion d'ADN-T au niveau du gène codant le facteur de transcription plastidial SIG3. Le mutant obtenu ne présentait pas de phénotype apparent dans nos conditions de cultures. Nous avons alors choisis d'analyser le rôle du facteur SIG3 en adoptant une approche globale qui nous permet d'analyser de manière simultanée l'expression des gènes plastidiaux dans le mutant *sig3* et de les comparer avec ceux d'une plante sauvage, en utilisant une puce à ADN spécifique du plaste.

L'analyse de l'expression génique par la puce à ADN nous a permis d'identifier des gènes « cibles » du facteur SIG3. Il s'agit de *psbN*, *atpH*, *atpB* et *atpF*.

Les résultats obtenus par puce à ADN ont été confirmés par les techniques d'extension d'amorces et de Northern blot.

L'expression de ces gènes est affectée dans le mutant *sig3* mais à des niveaux différents. L'expression du gène *psbN* est la plus diminuée dans le mutant.

Spécificité de psbN

Le gène *psbN* est situé dans la région intercistronique, entre *psbT* et *psbH* de l'opéron *psbB*, mais sur le brin opposé de l'ADN. Nous avons montré que *psbN* est transcrit à partir d'un seul promoteur (*PpsbN-32*) spécifique du facteur *SIG3*.

La protéine PsbN fait partie des protéines à petit poids moléculaire (LMM pour *Low Molecular Mass*). Elle a été considérée comme faisant partie du PSII, néanmoins, sa localisation ainsi que sa fonction demeurent inconnues (pour revue voir Thornton et al., 2005).

Une protéine a été identifiée comme étant PsbN par Ikeuchi et coll. (1989), en se basant sur un séquençage en N-terminal d'un polypeptide de 4.7 kDa isolé à partir du PSII de *Thermosynechococcus vulcanus*. La protéine PsbN est présente chez les cyanobactéries ainsi que dans le génome plastidial de plusieurs algues et plantes supérieures. En revanche, sa localisation au niveau du photosystème II n'est pas confirmée lors du séquençage des sous unités du photosystème II. Au contraire, Kashino et al., (2002) ont montré que la protéine de 4.7 kDa nommée à l'origine PsbN, n'est que la protéine PsbTc (c pour chloroplastique) chez *T. vulcanus*. Ainsi, la réponse à la question de la localisation de la protéine PsbN au niveau du photosystème II et même de l'existence de la protéine au sein du chloroplaste reste suspendue.

Pourquoi existe-il alors un facteur de transcription plastidial (SIG3) spécifique pour la transcription du gène *psbN* ?

Nous avons montré que le complexe PEP- SIG3, transcrit spécifiquement le gène *psbN*. La transcription du gène *psbN* produit un ARNm précurseur qui subit un clivage post-transcriptionnel, libérant ainsi en plus du transcrit *psbN*, un transcrit antisens de *psbT*. L'absence du transcrit antisens de *psbT* chez le mutant *sig3* est corrélée avec une augmentation de l'accumulation de la protéine PsbT.

Ainsi, nous pouvons conclure que la transcription de *psbN* régule d'une manière indirecte le taux d'expression de la protéine PsbT.

Est-ce que le gène *psbN* code réellement une composante du photosystème II ?

Pour répondre à ces questions, il serait intéressant d'étudier plus en détail le rôle de la protéine PsbN. Le mutant *sig3* constitue un outil important pour l'étude de sa localisation au niveau du photosystème II et par conséquent de sa fonction.

Nous avons produit un anticorps dirigé contre des peptides de la protéine PsbN. Grâce à cet outil, il serait possible d'analyser par Western blot la localisation de la protéine PsbN au niveau du chloroplaste. La spécificité de l'anticorps peut être confirmée en montrant l'absence de la protéine PsbN chez le mutant *sig3*.

Au cas où aucune protéine PsbN n'est détectable par Western blot, la question qui se pose alors est : si l'ARNm *psbN* n'est pas traduit en protéine, pourquoi le gène *psbN* est-il transcrit spécifiquement par le facteur de transcription SIG3 ?

Le rôle du gène *psbN* serait-il alors réduit à la production d'un ARN antisens régulateur de l'expression de PsbT ?

Régulation de l'expression génique par des ARNs antisens chez les eucaryotes et les procaryotes

Chez les eucaryotes et procaryotes, plusieurs mécanismes de régulation de l'expression génique par des ARNs antisens non codant ou ncRNAs ont été découverts. Chez les eucaryotes, les ncRNAs sont de plusieurs types :

Les micro RNAs (miRNAs) long de 20-22 nucléotides, ils sont partiellement complémentaires à un ou plusieurs ARNm dont ils régulent négativement l'expression en se liant à leur extrémité 3'UTR.

Les short interfering RNAs (siRNAs) font 20-25 nucléotides, engendrent la dégradation de leur cible (ARNm) de manière spécifique et sont impliqués dans le mécanisme de silençage post-transcriptionnel des gènes.

Les transcrits antisens naturels (NATs), ils font partie des siRNAs. Ils sont issus de la transcription de deux gènes situés sur des brins opposés de l'ADN.

D'une manière générale, les ARNnc sont issus soit d'un clivage d'un ARNm précurseur (miRNA et siRNA) soit d'un transcrit antisens (NATs). Ils jouent un rôle important au niveau de l'inhibition de la transcription (inactivation des promoteurs etc).

Les ncRNAs font partie intégrante de complexes ribonucléoprotéiques (RISC) qui régulent l'expression des gènes (Yazgan and Krebs, 2007).

Chez les bactéries aussi, plusieurs ARN non codants ont été découverts. Ils diffèrent cependant de ceux présents chez les eucaryotes. Ils sont plus longs (80-100 nts) par rapport aux ncRNA eucaryotiques (21-23 nts). Ce sont généralement des transcrits primaires (non pas des produits de clivages d'un ARN précurseur comme chez les eucaryotes) (Gottesman, 2005). Ces ARN régulent l'expression des gènes en s'hybridant à l'ARNm cible par complémentarité de bases. Ils jouent un rôle important dans la régulation de la réplication, le maintien des éléments extrachromosomiques (tels que les plasmides) ainsi que l'adaptation aux conditions environnementales (température, stress oxydatif etc.). Ces ARN antisens jouent un rôle au niveau de la traduction des transcrits en interagissant avec les régions 5' UTR et/ou 3' UTR de l'ARNm (Wagner et al., 2002).

Récemment des exemples de régulation de l'expression des gènes par des ncRNAs ont été découverts chez les cyanobactéries (Dühring et al., 2006; Hernandez et al., 2006).

De plus, chez un mutant transplastomique de *chlamydomonas*, l'expression d'un ARN plastidial antisens artificiel *in vivo* permet la protection du transcrit sens des attaques par les

nucléases (Nishimura et al., 2004). Néanmoins, jusqu'à présent, rien n'est encore connu sur l'existence et la fonction des ARNs antisens naturellement présents dans le plaste. De plus, aucun ncRNAs impliqués dans la régulation de l'expression génique n'a été mis en évidence dans les organelles (plastides et mitochondries).

En revanche, récemment, Lung et al., (2006) ont réussi à cloner 18 ncRNAs dans le plaste. Par contre, aucune fonction ne leur a été attribuée.

Cas de l'ARN antisens *psbT* : le premier exemple d'ARN antisens naturel dans le plaste

Nous avons montré au cours de ce travail que le facteur SIG3 transcrit spécifiquement le gène *psbN* par l'intermédiaire d'un promoteur unique (*PpsbN-32*). La transcription de *psbN* produit un long ARN précurseur qui suite à un clivage libère un transcrit antisens de *psbT*.

L'existence de la protéine PsbN est largement controversée (Kashino et al., 2002), par contre le gène est transcrit spécifiquement par un facteur de transcription plastidial, SIG3 : le transcrit *psbN* pourrait représenter ainsi un ARN non codant ou ncARN.

De ce fait, le complexe PEP-Sig3, en reconnaissant spécifiquement le promoteur *PpsbN-32*, produit un ARN antisens du gène *psbT*. Cet ARN antisens couvre toute la séquence codante du gène *psbT* ainsi que sa région 5'UTR.

En réalisant des RT-PCR sur des ARNs préalablement traités aux mélanges de RNases (A/T1) (dans ce cas, uniquement les ARN en double brin résistent à la dégradation par les nucléases), nous avons montré que les transcrits sens et antisens de *psbT* forment un ARN double brin stable *in vivo*.

Nous avons analysé le rôle de cet ARN antisens au niveau de la stabilité et la traduction du transcrit sens de *psbT*. Nous avons montré par Northern blot et extension d'amorce réalisés chez les plantes *sig3* et WT, que l'accumulation des transcrits *psbT* sens n'est pas affectée par l'absence du transcrit antisens de *psbT*. En revanche, l'accumulation de la protéine PsbT augmente en absence du transcrit antisens de PsbT (résultats obtenus par Western blot).

Ces résultats suggèrent que l'ARN antisens de *psbT* pourrait altérer la traduction du transcrit *psbT* sens probablement par la formation d'un ARN *psbT* double brin qui empêche l'interaction entre la région 5'UTR et les ribosomes.

L'existence d'un ARN *psbT* antisens représente le premier exemple d'ARN antisens présent de manière naturelle dans le plaste. Son rôle au niveau de la régulation de la synthèse de la protéine PsbT représente un mode de régulation de l'expression génique jusqu'à présent inconnu dans le chloroplaste.

Il serait intéressant d'analyser plus en détail le mécanisme de la régulation de l'expression de la protéine PsbT par un ARN antisens au niveau de plusieurs aspects :

- Confirmation du rôle de l'ARN antisens au niveau de la traduction du transcrit *psbT* par l'analyse de l'association du transcrit *psbT* sens aux polysomes en absence du transcrit antisens *psbT* (dans le mutant *sig3*) et en sa présence (dans la plante sauvage).
- Etude de la corrélation entre l'absence du transcrit antisens *psbT* et l'augmentation de l'accumulation de la protéine PsbT par un système de transcription/traduction *in vitro*.
- Etude du mécanisme de l'inhibition de la traduction de la protéine PsbT par l'ARN antisens *psbT* par la technique de toe-printing (analyse par extension d'amorce des ARNm en cours de la phase d'initiation de la traduction).

Rôle physiologique de l'ARN *psbT* antisens in vivo

Nous avons montré au cours de cette étude que la traduction de la protéine PsbT est régulée par l'intermédiaire d'un ARN antisens produit à partir de la transcription spécifique du gène *psbN* par le facteur SIG3.

Pourquoi une telle régulation ? Quelle serait la fonction de cette protéine chez *Arabidopsis* ?

Nous pouvons imaginer que PsbT joue un rôle tout comme chez *Chlamydomonas*, au niveau de la réparation du photosystème II lors d'un stress photo-oxydatif. Dans ce cas, sachant qu'il y a une accumulation de PsbT par rapport à la plante sauvage, le mutant *sig3* pourrait résister plus à une exposition à de fortes intensités lumineuses. Dans le but d'analyser cette hypothèse, nous avons exposés des plantes sauvages (WT) et mutantes *sig3* ($\Delta 3$) âgées d'un mois à de fortes intensités lumineuses ($1000 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) pendant trois jours en lumière continue. Les plantes avaient le même phénotype au cours du stress lumineux (apparition des anthocyanes au niveau des feuilles). En mettant les plantes après stress, sous lumière faible (environ $60 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) nous avons observé un retard de croissance

de la plante sauvage (WT) par rapport au mutant *sig3* (fig 40). Ceci pourrait être dû à une plus grande capacité du mutant *sig3* à « récupérer » après un stress lumineux. Ce résultat étant préliminaire, il nécessite d'être confirmé.



Figure 40 : Phénotype des plantes mutantes *sig3* ($\Delta 3$) après un stress photo-oxydatif.

Des plantes sauvages (WT) et mutantes *sig3* ($\Delta 3$) âgées d'un mois, sont exposées en continu à la lumière forte ($1000 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) pendant trois jours, puis sous lumière faible ($60 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 16h lumière /8h obscurité).

En résumé, l'apparition de phénotype chez le mutant *sig3* après un stress lumineux, suggère fortement l'importance du rôle de la protéine PsbT au niveau de la réparation du photosystème II endommagé lors d'un stress photo-oxydatif.

Ainsi, la synthèse de la protéine PsbT devrait être modulée selon les conditions de culture éventuellement par un mécanisme de régulation mettant en œuvre l'ARN *psbT* antisens. Dans le but de tester cette hypothèse, il serait intéressant d'analyser l'accumulation du transcrit *psbT* sens et antisens ainsi que l'accumulation de la protéine PsbT chez des plantes soumises à des différentes conditions de stress lumineux. Nous supposons dans ce cas que la synthèse de la protéine PsbT augmente tandis que l'accumulation du transcrit *psbT* antisens (et par conséquent le transcrit *psbN*) diminue fortement. Au contraire, sous des conditions normales de culture (lumière modérée), l'accumulation de la protéine PsbT diminue alors que l'expression des transcrits *psbN* et *psbT* antisens augmente.

D'une manière générale, la combinaison de ces différentes études *in vivo* et *in vitro* devraient nous aider à élucider le mécanisme de régulation de l'expression de la protéine PsbT par l'intermédiaire du transcrit antisens *psbT*.

Rôle de SIG3 au niveau de la régulation de l'expression de l'ATP synthase

Nous avons montré que l'holoenzyme PEP/SIG3 transcrit les gènes *atpH* et *atpB*, faisant partie des deux sous-complexes formant l'ATP synthase CF0 et CF1, à partir de promoteurs spécifiques : *PatpH-431* et *PatpB-467*. Le promoteur *PatpH-431* est utilisé exclusivement par l'holoenzyme PEP/SIG3 car il disparaît complètement dans le mutant *sig3*. En revanche, le promoteur *PatpB-467*, bien qu'il soit transcrit spécifiquement par SIG3, est reconnu probablement par d'autres facteurs sigma. En effet, l'absence d'un facteur sigma peut être compensée par la sur-expression d'un autre facteur sigma qui peut reconnaître de manière moins efficace les mêmes promoteurs.

Quel rôle joue le facteur SIG3 au niveau de la formation du complexe de l'ATP synthase plastidiale ?

Rôle de SIG3 dans la formation du complexe CF0

SIG3 étant spécifique pour le promoteur *PatpH-431* contribue à la transcription du gène *atpH*, et *atpF/ atpA*. Le gène *atpH* code la sous unité CF0-III, une composante importante du complexe CF0 de l'ATP synthase présentant une stœchiométrie de 5-12 fois plus que les sous unités CF0-IV et CF0-I.

L'étude de l'expression des sous unités de l'ATP synthase a fait l'objet de différents travaux visant à comprendre le mode de régulation de la stœchiométrie du complexe CF0 (chez le maïs, Stahl et al. 1993) ; l'épinard, Stollar et al., 1994 ; Hotchkiss and Hollingsworth, 1997). Différents modes de régulation ont été proposés. Chez le maïs, une régulation principalement transcriptionnelle a été suggérée (Stahl et al. 1993). Chez l'épinard, l'unité transcriptionnelle *rps2/atpI/atpH/atpF/atpA* est transcrite à partir de deux promoteurs situés en amont du gène *rps2* et *atpI*. Les différents transcrits codant la sous unité CF0 de l'ATP synthase présentent un taux d'accumulation de X : 1 :1 (*atpI* : *atpH* : *atpF*), la valeur X, étant dépendante de l'intensité du promoteur *PatpI* (Hotchkiss and Hollingsworth, 1997). Ainsi, il a été suggéré que l'établissement de la stœchiométrie finale (1 :5-12 :1) des sous unités du complexe CF0 de l'ATP synthase n'est pas régulé de manière transcriptionnelle. Stollar et al., (1994), ont analysé les sites d'arrêt des ribosomes au niveau des transcrits de l'opéron *atpI/H/F/A*. Ils ont montré l'existence d'une corrélation générale entre le taux d'arrêt des ribosomes au niveau des transcrits et la stœchiométrie des sous unités correspondantes. De plus, il a été démontré

que les transcrits de l'opéron *atpI/atpH/atpF/atpA* ont des stabilités différentes, ce qui se traduit par une accumulation différente des ARNm reflétant ainsi la différence de stœchiométrie des sous unités du complexe CF0 de l'ATP synthase (Hotchkiss and Hollingsworth, 1997).

Chez *Arabidopsis thaliana*, nous avons étudié l'expression de l'opéron *atpI/atpH/atpF/atpA* à l'aide du mutant *sig3*. D'une manière générale, cet opéron est transcrit à partir de deux promoteurs PEP l'un situé en amont du gène *atpI* (*PatpI*-229) et l'autre en amont du gène *atpH* (*PatpH*-431). L'un de ces deux promoteurs, *PatpH*-431, est exclusivement sous le contrôle du facteur SIG3.

Pourquoi une telle spécificité ?

Nous suggérons que le complexe PEP-SIG3, à partir du promoteur *PatpH*-431, produit des ARNm *atpH* qui s'arrêtent en grande partie au niveau d'un site de terminaison de la transcription situé au 3'UTR du gène *atpH* (fig.37), fournissant ainsi un transcrit monocistronique pour le gène *atpH*. Ainsi, le facteur SIG3 pourrait participer à l'établissement de la stœchiométrie de la sous unité CF0-III de l'ATP synthase.

Une telle hypothèse nécessite d'être confirmée à plusieurs niveaux :

- En établissant la séquence exacte du transcrit *atpH* (-431) au niveau de son extrémité 3'UTR à l'aide de la technique de Circular RT-PCR.
- En analysant, grâce à des anticorps spécifiques, l'accumulation de la protéine AtpH, chez le mutant *sig3* et la plante sauvage.

En bref, l'existence d'un promoteur spécifique de SIG3 en amont du gène *atpH* suggère fortement une régulation transcriptionnelle chez *Arabidopsis* pour établir la stœchiométrie du complexe CF0. Par contre, vu la variabilité des mécanismes de régulation proposés, l'expression de l'opéron *atpI/atpH/atpF/atpA* la régulation de la stœchiométrie finale des sous unités du complexe CF0 se fait probablement à plusieurs niveaux : transcriptionnel, post-transcriptionnel et traductionnel.

Rôle de SIG3 dans la formation du complexe CF1

Le gène *atpB* est transcrit majoritairement par le promoteur PEP : *PatpB*-520. SIG3 peut moduler l'expression du gène *atpB* à partir du promoteur *PatpB*-467. Le gène *atpB* code la sous unité β , faisant partie du sous complexe CF1 de l'ATP synthase. Cette dernière est composée de cinq sous unités (α , β , ϵ , γ et δ) avec une stœchiométrie de 3 :3 :1 :1 :1. Le facteur SIG3 pourrait donc aider à augmenter la quantité de la sous unité β . Cependant, la quantité des transcrits *atpB*-467 observé au niveau des extensions d'amorce (fig 38) ne suffit pas à l'établissement de la stœchiométrie de 3 :1. Comment pourrait se faire la régulation de la synthèse de la sous unité β du complexe CF1 ?

Chez les plantes supérieures aucune étude n'a été réalisée concernant le mode d'établissement de la stœchiométrie des sous unités du complexe CF1. En revanche, une étude réalisée récemment chez *Chlamydomonas*, montre que l'assemblage du complexe CF1 s'effectue par le processus de régulation CES « Control by Epistasy » : la sous unité β agit en *trans* en activant la traduction de la sous unité α ce qui favorise la formation d'oligomères entre α et β . Ces derniers s'associent avec la sous unité γ . En cas d'excès des oligomères α/β , la traduction de la sous unité β est inhibée par le biais d'un rétrocontrôle négatif (Drapier et al., 2007). Il est probable qu'un tel mécanisme de régulation existe également chez les plantes supérieures. Néanmoins, il est nécessaire d'étudier de manière plus approfondie le rôle du facteur SIG3 au niveau de l'expression des gènes *atpB*, *atpE* et *atpA* et par conséquent au niveau de l'établissement de la stœchiométrie du complexe CF1. Pour cela, nous réaliserons une analyse de l'expression (au niveau transcriptionnel et traductionnel) de ces gènes sous différentes conditions physiologiques.

Conclusion générale

Les promoteurs dépendants du facteur SIG3

Nous avons caractérisé au cours de ce travail un mutant d'*Arabidopsis thaliana*, présentant une insertion d'ADN-T au niveau du gène SIG3, codant l'un des six facteurs de transcription plastidiaux de type sigma dans le plaste. Nous avons analysé par puce à ADN spécifique des gènes plastidiaux, le profil d'expression des différents transcrits plastidiaux dans le mutant *sig3*. Nous avons mis en évidence une diminution de certains transcrits plastidiaux dans le mutant *sig3* en comparaison à la plante sauvage. Ces transcrits sont : *psbN*, *atpH*, *atpB* et *atpF*.

Nous avons caractérisé plus en détail chaque transcrit au niveau de leur extrémité 5' *i.e* localisation et provenance (issu d'une initiation de transcription ou d'un clivage de transcrit précurseur). En résumé, nous avons pu mettre en évidence trois promoteurs spécifiques du facteur SIG3 d'*Arabidopsis* : *PpsbN-32* ; *PatpH-431* et *PatpB-467*.

Le facteur SIG3 transcrit spécifiquement *psbN* par le promoteur *PpsbN-32*. En revanche, il contribue à la transcription des gènes *atpH*, *atpF*, et *atpB* par l'intermédiaire des promoteurs *PatpH-431* et *PatpB-467*.

Les promoteurs reconnus par SIG3 présentent néanmoins des caractéristiques différentes. Les promoteurs *PpsbN-32* et *PatpB-467* diminuent fortement dans le mutant *sig3*. Ceci suggère que même en absence du facteur SIG3, il y a une activité résiduelle de transcription effectuée probablement par un autre facteur Sigma. En revanche, le *PatpH-431* est l'unique promoteur identifié dans notre étude comme promoteur exclusivement contrôlé par le facteur SIG3. En effet, dans le mutant *sig3*, le transcrit *atpH-431* est complètement absent.

Quelle est la spécificité de ces promoteurs ?

Chacun de ces promoteurs, présente un élément -10 et -35 caractéristique des promoteurs de type PEP (fig 41). La comparaison des séquences des différents promoteurs montre une homologie au niveau de l'élément -35, par contre l'élément -10 est moins conservé.

Nous avons observé au niveau de la région située entre les deux éléments -10 et -35, l'existence d'un motif conservé de quelques nucléotides (gttgta) situé juste en amont de l'élément -10. Ce motif pourrait déterminer la spécificité de reconnaissance des séquences promotrices par le complexe PEP- SIG3. Néanmoins, une telle hypothèse nécessite d'être étudiée plus en détail avec un système de transcription *in vitro* par exemple.

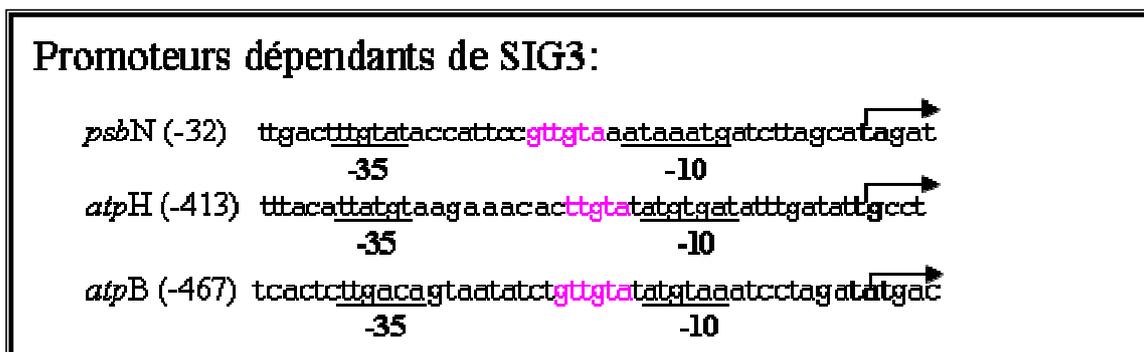


Figure 41 : Séquences des trois promoteurs dépendants du facteur *Sig3*.

Alignement des séquences promotrices reconnues par le facteur SIG3. Les boîtes -10 et -35 sont soulignées, les sites d'initiation de la transcription sont représentés par des flèches. Le motif (gttga) est conservé au niveau des trois promoteurs.

Rôle du facteur *Sig3*

L'absence de phénotype chez le mutant *sig3* dans nos conditions de culture, laisse à suggérer que le facteur SIG3 n'est pas considéré comme ayant un rôle essentiel pour le développement des plastes (tels que les facteurs SIG2 et SIG6). Néanmoins, l'analyse des gènes cibles transcrits par SIG3 montre l'importance de son rôle au niveau :

- De la transcription spécifique du gène *psbN* et par conséquent de la production d'un ARN antisens de *psbT*. Cet ARN antisens est impliqué dans la régulation de la traduction de la protéine PsbT.
- De la transcription des gènes *atpH* et *atpB* codant les sous unités de l'ATP synthase plastidiale.

Nous ne pouvons pas exclure qu'il existe d'autres promoteurs spécifiques du facteur SIG3 situés au niveau de certaines régions promotrices des unités de transcription plastidiales qui ne peuvent être révélés que sous des conditions environnementales et/ou physiologiques différentes de celles utilisées au cours de notre étude.

D'une manière générale, nous pouvons conclure que le facteur de transcription plastidial SIG3 joue un rôle spécifique au niveau de la transcription de *psbN* et probablement un rôle plus général, en contribuant avec d'autres facteurs sigma, à la transcription des gènes codant les sous unités de l'ATP synthase plastidiale.

Matériel et Méthodes

1 Matériel végétal et conditions de culture

1.1 Stérilisation en surface des graines d'Arabidopsis

500µl de graines d'Arabidopsis écotype Columbia, sont stérilisées en surface par immersion dans 50 mL d'une solution de 0,75% d'hypochlorite de sodium (p/v) 80% Ethanol (v/v). Après 5 min d'agitation, la solution de stérilisation est éliminée et les graines lavées 2 fois à l'éthanol absolu puis séchées pour au moins 2 heures sous hotte à flux laminaire.

1.2 Culture *in vitro* d'Arabidopsis

Les graines stérilisées sont semées en boîtes de Pétri contenant 25 ml de milieu MS gélosé (4,3 g de sels MS (SIGMA); 0,5 g de MES pH 5,7 (KOH) ; 8 à 10 g de Bacto Agar pour un litre). Les boîtes sont ensuite placées à 4°C et à l'obscurité pendant 72 h afin de lever la dormance des graines et obtenir une germination synchronisée. Elles sont alors cultivées en chambre de culture à 24°C, 70 µmol. m⁻² .s⁻¹ sous une photopériode de 16h/24h.

1.3 Culture en terre d'Arabidopsis

Les graines sont semées directement en terre puis mis en salle de culture (25°C, 16h lumière/ 8h obscurité). Les pots ou bacs de plantation sont recouverts d'un film en plastique pendant 7 à 10 jours afin de maintenir une atmosphère saturée en eau. Une fois les premières paires de feuilles sorties, la terre sera recouverte de copeaux de liège pour prévenir le développement de moisissures.

2 Méthodes d'analyse des acides nucléiques

2.1 Extraction rapide d'ADN génomique à partir de feuilles d'Arabidopsis

Cette technique a été réalisée dans le cadre de criblage de mutants par PCR (protocole adapté de Sambrook et al., 1989). De 25 à 50 mg de feuilles d'Arabidopsis sont broyées à température ambiante dans un tube Eppendorf contenant 200 µL de tampon d'extraction (Tris HCl pH 8 ; 0,2M ; NaCl, 0,25 M ; EDTA 0,025 M ; SDS 0,5 % p/v). Après centrifugation 5 min à 13 000 rpm, à température ambiante, les acides nucléiques contenus dans le surnageant sont alors précipités en ajoutant 200 µL d'isopropanol. Le culot est obtenu par une centrifugation à 13000 rpm pendant 5 min à 4°C, est rincé à l'éthanol 70 %, séché et remis en suspension dans 30 µL d'eau stérile. 2 µL de cette suspension sont alors utilisés pour effectuer un criblage par PCR.

2.2 Amplification par PCR

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

La réaction se fait dans un volume final de 25 μL . 2 μL d'ADN sont ajoutés à 23 μL du mélange suivant : 2,5 μL de tampon de la Taq ADN polymérase 10X (Bioline); 0,75 μL de MgCl_2 50 mM ; 0,5 μL d'un mélange de dNTP (10 mM chacun) ; 1 μL pour chaque amorce utilisée (5' et 3') (10 μM) et 0,1 μL de l'enzyme Taq ADN polymérase (Bioline).

Après dénaturation du double brin d'ADN à 94°C, pendant 5 min, n cycles d'amplification sont réalisés (1 min à 94°C, 30 sec à $T_a=(T_m - 4)^\circ\text{C}$, 1 min à 72°C). La réaction s'achève par une élongation finale de 10 min à 72°C.

2.3 Séparation de fragments ADN sur gel d'agarose

La séparation des fragments d'ADN (en présence de 3% glycérol (v/v) et 0,025 % bleu de bromophénol (p/v)) est obtenue par migration électrophorétique sur gel d'agarose (0,8 à 2% d'agarose (p/v), Tris 50mM, acide borique 50mM, EDTA 1,25 mM, 2% de bromure d'étidium) dans du tampon TBE 0,5X. Le gel d'agarose est préparé dans le même tampon. La migration est réalisée sous voltage constant (20 V/cm de gel). L'ADN est visualisé sous UV à 320 nm, grâce au BET, agent intercalant des acides nucléiques.

2.4 Séquençage des ADN

Les fragments d'ADN amplifiés par PCR ou clonés dans un plasmide sont séquencés grâce à l'utilisation du séquenceur automatique de type « ABI 373 XL stretched » (Applied Biosystems). Les séquences sont réalisées avec le kit « BigDye terminator » (Perkin-Elmer) de la plateforme de séquençage du pôle Biologie Campus.

2.5 Clonage de fragment d'ADN

Les ADN amplifiés par PCR sont clonés directement dans le vecteur PCR2.1-TOPO et transformés par un choc thermique dans des bactéries compétantes (procédure de transformation TOPO-TA cloning, Invitrogen). Ce vecteur confère aux bactéries la résistance à l'ampiciline. Il possède au niveau du site d'insertion le gène lac Z codant la β -galactosidase. Ainsi, l'insertion du fragment d'ADN étranger aboutit à l'inactivation du gène. Pour vérifier la présence ou l'absence de l'insert, il suffit d'étaler les bactéries transformées dans un milieu

de culture contenant l'ampicilline (50µg/mL) et le X-gal (substrat de la β -galactosidase) dont la couleur passe de l'incolore au bleu quand il est clivé par la β -galactosidase.

Les bactéries transformées sont mises en culture en boîte de pétri sur un milieu LB gélosé (Luria Broth : 1% Tryptophane (p/v) ; 0,5% yeast extract (p/v), 0,5% NaCl, 15g/l bacto-agar) à 37°C pendant la nuit. Les bactéries ayant intégré le plasmide recombinant se présentent sous forme de colonies de couleur blanchâtre, celles ayant un plasmide vide sont de couleur bleue. Les bactéries ayant intégré le plasmide recombinant sont cultivées à 37°C en milieu LB liquide (avec ampicilline, 50µg/mL) sous une agitation de 170 à 200 rpm.

Extraction d'ADN plasmidique

L'extraction des plasmides est effectuée selon la méthode de lyse alcaline (Sambrook, 1989). Les bactéries mises en culture la nuit à 37°C sont collectées avec une courte centrifugation (3 min à 9000 rpm). Le culot est resuspendu dans 100 µL de solution I froide (glucose 50 mM ; EDTA 10 mM ; Tris.HCl pH8, 25 mM). Ensuite les bactéries sont lysées et les ADN sont dénaturés par un traitement alcalin (200 µL de la solution II : 1% SDS ; 0,2N NaOH), et incubés 5 min à température ambiante. La renaturation de l'ADN plasmidique est obtenue en ajoutant 150 µL de la solution III froide (acétate de sodium 5M ; acide acétique glacial, pH 5,2). Le mélange est agité et incubé 10 min à 4°C afin de précipiter l'ADN chromosomique bactérien. Une centrifugation de 15 min à 14000 rpm permet de récupérer les acides nucléiques plasmidiques dans le surnageant. Ces derniers sont précipités par l'ajout de 2 volumes d'éthanol absolu froid, et sédimentés par une centrifugation (15min, 14000 rpm). Le culot est lavé à l'éthanol 70%, séché et repris dans 20 µL d'eau stérile.

2.6 Extraction d'ARN

2.6.1 A partir de plantules d'Arabidopsis

Le matériel végétal, plantules d'Arabidopsis de 6 jours, est broyé dans l'azote liquide jusqu'à obtention d'une fine poudre. Les ARN totaux sont extraits à partir d'environ 500 µL de poudre (protocole adapté de Sambrook et al., 1989). 550 µL de tampon d'extraction (Tris.HCl 0,2M pH 9 ; LiCl 0,4 M ; EDTA 25 mM, SDS 1 %) sont alors ajoutés et le mélange vortexé jusqu'à homogénéisation. Un volume équivalent de phénol/chloroforme est ajouté afin d'éliminer les protéines, l'échantillon est ensuite vortexé et centrifugé pendant 10 min à 13 000 rpm, à température ambiante. La phase aqueuse est récupérée. L'extraction au phénol/chloroforme est répétée 2 fois, puis suivie d'une extraction au chloroforme. Les acides

nucléiques sont précipités en premier par l'ajout à la phase aqueuse de LiCl (2M au final), toute la nuit à 4°C. Après une centrifugation de 15 min à 13 000 rpm, à 4°C, le surnageant est éliminé. Le culot est resuspendu dans l'eau stérile, les ARNs sont ensuite précipités une deuxième fois en ajoutant 1/10 V TNE 10X et 2V d'éthanol absolu froid, pendant la nuit à – 20°C ou 15 à 30 min à – 80°C.

Les ARN sont alors sédimentés par une centrifugation de 15 min à 13 000 rpm, à 4°C. Le culot est lavé à l'éthanol 70 % froid, séché puis repris dans l'eau stérile. Les ARN peuvent être stockés à – 80°C. Les ARN sont dilués et dosés au spectrophotomètre à 260 nm. La qualité ainsi que la quantité de l'ARN est visualisée par séparation d'une fraction sur un gel d'agarose 1% (p/v).

2.6.2 A partir de graines d'Arabidopsis (différents stades de germination)

Les ARN sont purifiés d'après la méthode employée par Demarsy et al., (2006) adapté au jeunes stades de germination d'Arabidopsis où les tissus sont riches en polyphénols. 100 mg de MF est broyé dans l'azote liquide, pendant le broyage, le tampon d'extraction (Tris/HCl, pH9.5 ; 10mM EDTA, pH8 ; 2% lithiumdodecyl sulfate (w/v) ; 0.6 M NaCl ; 0.5 M Trisodium Citrate ; et 5% b-mercaptoethanol) est ajouté. L'homogénéisation est alors poursuivie jusqu'à retour à température ambiante du tampon. La suspension est alors récupérée dans un tube de 2 ml puis centrifugée à 14000 rpm pendant 5min à température ambiante pour éliminer les débris cellulaires. Un volume de chloroforme est ajouté à la phase aqueuse récupérée, le tout est vortexé puis centrifugé à 14000 rpm pendant 25min à température ambiante. La phase aqueuse est ensuite prélevée et un volume d'un mélange phénolique est ajouté. Ce mélange phénolique contient du phénol saturé acide, 3.5% (w/v) de guanidine isothiocyanate (Sigma) et 0.2 M sodium acetate, pH 4. Après une incubation de 5 min à température ambiante, 0,5 volume de chloroforme est ajouté, le mélange est ensuite vortexé et centrifugé 5 min à 14000 rpm. La phase aqueuse est récupérée et les ARN sont précipités par addition de 0,6 volume d'isopropanol, 10 min à température ambiante et centrifugées à 14000 rpm pendant 15min. les culots obtenus sont lavés à l'éthanol 70% séchés puis repris dans l'eau stérile. Les ARN peuvent être stockés à – 80°C.

2.7 Traitement des ARN à la DNase I

L'ADN contaminant est éliminé par deux traitements successifs à la DNaseI (2U/ μ g d'ARN). Chaque traitement est réalisé sur 20 μ g d'ARN, dans un tampon contenant 100 mM Tris/HCl, pH7.5, 25mM MgCl₂ et 1mM Ca Cl₂ (Fermentas), par incubation à 37°C pendant 30 min. La DNase I est ensuite éliminée par deux extractions au phénol/chloroforme. La phase aqueuse obtenue est précipitée par l'ajout de 1/10 V TNE 10X et 2V d'éthanol absolu froid, pendant la nuit à - 20°C ou 15 à 30 min à - 80°C. Les ARN sont alors sédimentés par une centrifugation de 15 min à 13 000 rpm, à 4°C. Le culot est lavé à l'éthanol 70 % froid, séché puis repris dans l'eau stérile. Les ARN peuvent être stockés à - 80°C.

L'absence d'ADN est vérifiée par PCR sur un gène plastidial à partir d'environ 100ng d'ARN traités.

2.8 Analyse des ARN par RT-PCR

Synthèse du premier brin d'ADNc

1 à 2 μ g d'ARN traités à la DNase sont dénaturés à 65°C pendant 5 min en présence d'amorces spécifiques (80 nM), le tampon de réaction (50mM Tris/HCl, pH8,3, 75 mM KCl ; 3mM MgCl₂ et 10mM EDTA) et des dNTP (0,5mM). La rétro-transcription se fait en présence de 200 U de Superscript II H- RT (Invitrogen) et 100U de RNase inhibitor à 42°C pendant 50 min. Elle est arrêtée par chauffage à 70°C pendant 15 min. 2 μ l d'ADNc sont utilisés pour faire la réaction de PCR comme indiqué dans le paragraphe 2.2.

2.9 Analyse du profil d'expression des transcrits plastidiaux par puce à ADN

Cette technique permet de détecter simultanément l'accumulation des transcrits plastidiaux représentés sur la membrane de la puce à ADN par des oligomères de 70 nucléotides. Cette technique consiste en plusieurs étapes :

- Préparation des sondes (ADNc radioactifs), par rétrotranscription des ARNm en présence de α^{32} P-dATP
- Hybridation de la membrane
- Analyse des résultats

2.9.1 Préparation de la sonde

4µg d'ARNs totaux préalablement traités à la DNase sont dénaturés à 65°C pendant 5 min en présence de 0,2 pmol de mélange d'oligonucléotides (spécifique des gènes plastidiaux représentés dans la puce à ADN), 1,25 mM de dCTP, 1,25 mM dGTP, 1,25 mM dTTP et de α^{32} P-dATP. La rétro-transcription se fait en présence de 600 U de Superscript II H- RT (Invitrogen) et 100U de RNase inhibitor pendant 50 min à 42°C. Elle est arrêtée par chauffage à 70°C pendant 15 min. Les ADNc obtenus sont purifiés par passage à travers une colonne de Sephadex G-50 (il s'agit d'une seringue de 1 ml bouchée à son extrémité par de la laine de verre contenant des billes de séphadex G-50). Le volume réactionnel est ajusté à 400µl avec du TE (10mM Tris/HCl, pH8, 1 mM EDTA), le tout est filtré par la colonne. Les ADNc sont élués par 300µl de TE. Pour vérifier la qualité des ADNc obtenus ainsi que la quantité de radioactivité incorporée dans chaque échantillon, une fraction est déposée sur un gel de polyacrylamide dénaturant.

2.9.2 Hybridation des membranes

Les membranes des puces à ADN sont en nitrocellulose. Elles sont imbibées dans une solution de SSC 2X (0,3M NaCl ; 0,03 M Na Citrate, pH 7) avant utilisation. Une préhybridation à 65°C est réalisée pendant 1 heure dans un volume de 25ml de tampon d'hybridation (0,5M NaHPO₄ pH 7,2, 1 mM EDTA, 7% SDS, 1% BSA). Les ADNc radioactifs sont dénaturés 5 min à 95°C avant d'être ajoutés dans le tampon d'hybridation. L'hybridation des membranes se fait pendant 72h à 65°C. Les membranes sont par la suite lavées 5 min à 65°C dans 25 ml de tampon de lavage (40 mM NaHPO₄ pH 7,2, 1 mM EDTA, 1% SDS), puis 10 min à température ambiante dans 50 ml de tampon de lavage (Sambrook et al., 1989). Les membranes sont par la suite recouvertes de film plastiques puis mises en contact avec des écrans photosensibles (Fujifilm imaging Plate) pendant 12 jours dans une cassette et à température ambiante. Les écrans sont par la suite numérisés par un phosphoimager (Fujifilm FLA-8000).

2.9.3 Analyse des résultats

Les images numériques des puces à ADN obtenus sont en premier lieu analysées avec le logiciel Array Gauge. Ce logiciel calcule l'intensité de chaque spot présent dans la membrane. Pour cela, il a fallu concevoir une matrice permettant de mesurer l'intensité de chaque spot

ainsi que les régions autour (10 régions sont considérées) afin de pouvoir estimer le bruit de fond local de ce spot. Les résultats obtenus sont exportés vers un autre logiciel R, qui permet de recalculer l'intensité de chaque spot en éliminant les valeurs de bruit de fond. Les valeurs des intensités de chaque spot sont alors transférées dans un fichier Excel.

2.10 Analyse des ARN par Northern blot

Cette technique permet d'analyser l'accumulation d'un ARNm grâce à une sonde spécifique.

Migration et transfert des ARN sur membrane de nitrocellulose

Un gel d'agarose 1,2% (p/v) / formaldéhyde 6,6% (p/v) est préparé dans 150 mL final de tampon de migration 1X (20 mM MOPS; 1 mM EDTA; 1 mM acétate de sodium; pH 7).

Les échantillons (20 µg et 30 µg d'ARN totaux de plantules âgées de 6 jours d'*Arabidopsis*) sont dénaturés en présence de 9 µL de tampon de dépôt (5 µL formamide ; 2 µL formaldéhyde 37% ; 1 µL de tampon de migration 10X ; 1 µL de BET à 400µg/mL) par un traitement de 10 min à 65°C avant dépôt. L'électrophorèse est effectuée dans du tampon de migration 1X ; à 3 V/cm de gel. Les ARN sont visualisés à 320 nm, grâce au BET (Sambrook et al., 1989).

Les ARNs sont transférés par capillarité sur une membrane de nitrocellulose. Le transfert s'effectue pendant la nuit, en présence de tampon SSC 10X (1,5 M NaCl ; 0,15 M Na Citrate, pH 7). La membrane est ensuite incubée 45 min à 80°C.

Marquage de la sonde et hybridation

Les sondes utilisées sont obtenues par PCR. Les fragments PCR sont purifiés et 100 ng sont marquées radioactivement par incorporation de α^{32} P-dATP, par la technique d'amorçage aléatoire (kit « NEBlot Kit » Biolabs) suivant les instructions du fournisseur.

Les sondes ADN marquées sont purifiées par chromatographie d'exclusion comme indiqué pour la purification des ADNc marqués (paragraphe 2.8.1). Les conditions d'hybridation et de lavage sont identiques à celles des puces à ADN (paragraphe 2.8.2). Les membranes sont recouvertes de film plastique, puis exposé à un film autoradiographique à -80°C. Le temps d'exposition dépend du niveau d'expression du transcrite analysé.

2.11 Analyse des ARN par extension d'amorce

Cette technique permet d'analyser les différents transcrits d'un gène et de déterminer leur extrémité 5'. Pour cela, un oligonucléotide situé environ 80 bases en aval de l'ATG est marqué radioactivement, puis hybridé avec les ARN totaux. Une retro-transcription est

effectuée. Les ADNc obtenus sont purifiés puis précipités. En parallèle, la région promotrice du gène analysé qui a été préalablement amplifiée à partir de l'ADN génomique, est clonée puis séquencée en utilisant le même oligonucléotide. La séquence obtenue est séparée sur un gel d'acrylamide dénaturant en même temps que les ADNc obtenus par la réaction d'extension d'amorce, ce qui permet de localiser spécifiquement par la suite l'extrémité 5' des transcrits détectés.

2.11.1 Marquage de l'oligonucléotide

Le marquage de l'oligonucléotide se fait en 5' par la T4 polynucléotide Kinase et du γ ³² P-ATP, de la manière suivante :

100 ng d'oligonucléotide est incubé avec 5 μ l de γ ³² P-ATP (10 μ Ci/ μ l, 3000 Ci/mmol), 5 μ l de tampon 5X, 10 U de T4 polynucléotide Kinase (Invitrogen) dans un volume final de 25 μ l. La réaction se déroule pendant 10 min à 37°C. L'oligonucléotide est purifié comme indiqué dans le paragraphe 2.9.1.

2.11.2 Séquençage Manuel

La séquence de la région promotrice du gène étudié est réalisée selon le protocole fourni avec le Kit de Séquençage manuel (T7 sequencing Kit ; USB). 2 μ g d'ADN plasmidique obtenu par clonage dans le vecteur PCR2.1-TOPO sont utilisées pour le séquençage. L'ADN ainsi que l'oligonucléotide (1 μ M ; le même utilisé pour l'extension d'amorce) sont dénaturés pendant 5 min à 65°C en présence de 1,5 μ mol de NaOH 1N. Le mélange réactionnel est neutralisé par l'ajout de 1,5 μ l de HCl 1N. Ensuite, 2 μ l de tampon d'hybridation sont ajoutés et la réaction se déroule pendant 10 min à 37°C puis 5 min à température ambiante. On ajoute par la suite 3 μ l de tampon de marquage, 2 μ l de tampon de dilution, 1 μ l de α ³² P-dATP (10 μ Ci/ mmol, 3000Ci/ml) et 0,5 μ l de l'enzyme T7 DNA polymérase. La polymérisation s'effectue alors pendant 5 min à température ambiante. Pendant ce temps, 4 tubes contenant chacun 2,5 μ l d'un des ddNTP (di-déoxynucléotides A, C, G, T) sont incubées 1 min à 37°C. À la fin du temps d'incubation, 4,5 μ l du mélange réactionnel sont ajoutées à chaque ddNTP avant de poursuivre la réaction pendant 5 min à 37°C. La réaction est arrêtée par l'ajout de 5 μ l de tampon STOP (97,5% formamide, 10mM EDTA, 0,3% bleu de bromophénol, 0,3% xylène cyanol). Chaque séquence est dénaturée 2 min à 80°C avant d'être séparée par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide dénaturant.

2.11.3 Réaction d'extension d'amorce

10µg d'ARN totaux sont dénaturés pendant 5 min à 65°C en présence de 3µl d'oligonucléotide marqué, puis mis 5 min dans la glace. L'oligonucléotide marqué est incubé avec l'ARN pendant 20 min à sa température optimale de l'hybridation (T_m moins 5°C). On réalise après une rétro-transcription avec 100 U SuperScript II (Invitrogen) en présence de 0,4mM de chaque dNTP, 5µl de tampon 5X, 10mM DDT, 3,7 U RNase Inhibitor (Fermentas), pendant 50 min à 42°C. La réaction s'achève par chauffage 15 min à 70°C. Les ARN sont éliminés par traitement, 30 min à 37°C avec 1µl de RNase A (10mg/ml, Fermentas). Les ADNc radioactifs obtenus sont d'abord purifiés par extraction au phénol/chloroforme puis précipités par l'ajout de 1/10 V TNE 10X et 2V d'éthanol absolu froid, pendant la nuit à -20°C. Le culot obtenu après centrifugation de 15 min à 14000 rpm à 4°C et lavage à l'éthanol 70%, est repris avec 4µl du tampon de dépôt dénaturant (97,5% formamide, 10mM EDTA, 0,3% bleu de bromophénol, 0,3% xylène cyanol). Les ADNc sont dénaturés 2 min à 80°C avant leur dépôt et migration sur un gel de polyacrylamide dénaturant à côté des séquences préparées auparavant (correspondantes à la région promotrice du gène étudié).

2.11.4 Préparation de gel de polyacrylamide dénaturant

Des gels de 6% polyacrylamide (bis-acrylamide/acrylamide, 1/19) contenant de l'urée 8M sont préparés avec une solution de TBE-S 1X (45mM Tris-Borate pH8,3 ; 0,5mM EDTA). L'électrophorèse se déroule dans du TBE-S 1X à 30W pendant environ 1h30. Les gels sont ensuite démoulés des plaques, séchés puis mis en exposition avec un film autoradiographique.

2.12 Détermination de l'origine des transcrits

Ces différents transcrits peuvent provenir directement d'un site d'initiation de la transcription (transcrit primaire) ou bien du clivage d'un transcrit précurseur. La technique d'extension d'amorce, ne nous permettant pas de distinguer entre ces deux types de transcrits, nous avons alors réalisé les techniques suivantes :

2.12.1 Capping *in vitro* des ARN par guanylyltransferase

Les ARNm plastidiaux ne possèdent pas de coiffe à leur extrémité 5'. La guanylyltransferase permet le transfert du GMP en GTP au niveau de l'extrémité 5' tri ou di phosphate d'un ARNm primaire. Aucun transfert ne peut avoir lieu au niveau de l'extrémité 5' monophosphate d'un ARN processé.

Nous avons marqué l'extrémité 5' des ARN par addition par la guanylyltransferase d'une coiffe $\alpha^{32}\text{P}$ -dGTP, selon les instructions fournies par le fabricant (Ambion).

15 μg d'ARN et 10U de guanylyltransferase ont été incubés en présence de 100 μCi de $\alpha^{32}\text{P}$ -dGTP (3000 Ci/mmol) et 20 U de RNase Inhibitor. La réaction a été incubée à 37°C pendant 1h. Les ARN ont été par la suite purifiés par des extractions au phénol/chloroforme suivies d'une précipitation au TNE1X et éthanol 100%. Le culot obtenu (contenant les ARNs marqués) est repris directement dans un tampon d'hybridation (Hybr B III, kit RPA III_{TM} Kit, Ambion) puis dénaturé 5 min à 95°C avant d'être hybridé toute la nuit à 42°C avec une sonde ARN, produite par transcription *in vitro* correspondant au transcrite analysé. Les ARN non hybridés (simples brin) sont digérés pendant 30 min à 37°C avec un mélange de RNase A/RNase T1 (1,6 μl du mélange fourni dans le kitr Ambion). Après inactivation des RNases, les ARN doubles brin sont précipités puis lavés à l'éthanol 70% et séparés par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide dénaturant avec un marqueur de taille d'ADN.

2.12.2 5' Race couplée au traitement à la phosphatase (TAP)

Principe

Les transcrits plastidiaux primaires possèdent une extrémité 5' tri-phosphate, les transcrits secondaires, issus du clivage de transcrits précurseurs possèdent une extrémité 5' monophosphate. La ligation d'un adaptateur ARN en 5' et l'amplification de l'extrémité 5' par RACE peut se faire exclusivement avec un transcrite processé. En revanche, après un traitement des transcrits primaires à la phosphatase TAP (Tobacco acid pyrophosphatase) qui permet de digérer le groupement tri-phosphate, ces ARN peuvent ainsi être ligués à l'adaptateur ARN.

Dans le but d'identifier les transcrits primaires d'un gène, nous avons amplifié les transcrits étudiés à partir d'ARN traités et non traités avec la TAP, en utilisant le Kit RLM-RACE (Ambion).

Protocole

10µg d'ARN sont traités à la TAP, en présence d'inhibiteur de RNase, 1h à 37 °C dans un volume final de 20µl. 4µl des ARN traités à la TAP sont ligués avec 300 ng d'adaptateur par la T4 RNA ligase (5U), 1h à 37 °C. La reverse transcription est alors réalisée avec 2µl d'ARN ligués en utilisant une amorce (2µM) spécifique du transcrit analysé. Deux PCR successives sont alors réalisées sur les ADNc obtenus, en utilisant à chaque fois une amorce situées d'une part au niveau de la séquence de l'adaptateur ARN et d'autre part au niveau du transcrit analysé. Les produits de PCR obtenus sont clonés et plusieurs clones sont séquencés. Les séquences obtenues déterminent les extrémités 5' du transcrit.

2.12.3 Déterminations des extrémités 3' et 5' d'un transcrit par Circular RT-PCR

Principe

Cette technique a pour but de déterminer en même temps les extrémités 3' et 5' d'un transcrit. Pour cela les ARN sont autoligés par l'enzyme T4 RNA Ligase (les deux extrémités 5' et 3' se lient entre elles). En utilisant des amorces spécifiques situées au niveau du 3' et du 5' du transcrit analysé, une reverse-transcription suivie d'une PCR est réalisée. Les produits de PCR obtenus sont clonés et plusieurs clones sont séquencés. Les séquences obtenues permettent de déterminer les extrémités 3' et 5' du transcrit.

2.13

Protocole

1 à 5µg d'ARN totaux traités à la DNase sont dénaturés à 70°C pendant 2 min, puis placés dans la glace. La réaction d'autoligation se fait avec 50U de T4 RNA ligase (Fermentas) en présence de DNase I (1U, Fermentas) et RNase inhibitor (40U), 1 h à 37°C. Les ARN sont par la suite purifiés par deux extractions au phénol/chloroforme suivies d'une précipitation au TNE1X et éthanol 100%. Les ARN précipités par centrifugation, sont repris dans l'eau stérile et rétro-transcrits en présence de 1 µl d'amorce spécifique du transcrit (2 µM) et 200U de Superscript II H- RT (Invitrogen) dans un volume de 20µL pendant 1h à 42°C (Zanduetta-Criado and Bock, 2004). La PCR est par la suite réalisée dans un volume de 25µl avec 2 µl d'ADNc, en utilisant des amorces spécifiques situées de part et d'autre des extrémités 3' et 5' du transcrit. Les produits de PCR obtenus sont clonés et plusieurs clones ont été obtenus et

séquencés. Les séquences obtenues permettent de déterminer les extrémités 3' et 5' du transcrit.

2.14 Détermination de l'existence d'ARN double brin *in vivo*

Principe

Cette technique a pour but de déterminer l'existence d'ARN double brin *in vivo*. Pour cela les ARN sont traités avec un mélange de RNases A/T1, qui à certaines concentrations, permettent de digérer uniquement les ARNs en simples brin. Les ARN présent en double-brin sont ainsi protégés de la digestion par ces nucléases et peuvent être détectés par une RT-PCR, en utilisant des amorces spécifiques du transcrit analysé.

Protocole

La digestion par les RNases (16ng/μl de RNase A et 0,35U/μl de RNase T1) se fait pendant 30 min à 37°C dans un mélange réactionnel de 60μl (10mM Tris pH 7,5 ; EDTA 5mM ; NaCl 300mM) en utilisant 2μg d'ARN totaux traités préalablement à la DNase. Ces nucléases sont inactivées par une incubation de 30 min à 37°C avec 7,6 μg de Protéinase K. Les ARN sont par la suite purifiés par trois extractions au phénol/chloroforme et une extraction au chloroforme. Ils sont précipités par addition de TNE10X (1/10 V) et éthanol 100% (2V), pendant la nuit à - 20°C. Les ARN sont alors sédimentés par une centrifugation de 15 min à 13 000 rpm, à 4°C. Le culot est lavé à l'éthanol 70 % froid, séché puis repris dans l'eau stérile. Une RT-PCR est alors réalisée en utilisant des amorces spécifiques du transcrit analysé.

3 Méthodes d'analyses des protéines

3.1 Extraction des protéines

Le matériel végétal est finement broyé dans un mortier à l'azote. 200 mg de poudre sont mise en suspension avec 200μl du tampon de dépôt 4X (200mM Tris/HCl, pH6,8 ; 5% (v/v) β-mercaptoéthanol ; 0,2% bleu de Bromophénol ; 20% glycérol ; 4% SDS). L'échantillon est dénaturé pendant 10 min à 100°C, puis centrifugé 15 minutes à vitesse maximum. Le surnageant peut être alors utilisé pour une migration électrophorétique. C'est une méthode très rapide et efficace pour l'extraction des protéines.

3.2 Isolement de chloroplastes intacts d'*Arabidopsis*

Ce protocole est réalisé à partir d'un bac de plantule de trois semaines, cultivées en semis dense en chambre de culture. Les bacs sont placés à 4°C et à l'obscurité la nuit précédant l'extraction de chloroplastes afin d'éliminer l'amidon accumulé. Le protocole suivi est également adapté de « *Methods in Molecular Biology* », vol 82 : *Arabidopsis protocols*.

Toutes les manipulations sont réalisées dans la glace, dans une chambre froide à 4°C. Les feuilles sont broyées (3 fois 5sec) à l'aide d'un mini broyeur à hélices dans du tampon HB préalablement refroidi (0,45M sorbitol, 20mM Tricine KOH, 10mM EDTA, 10mM NaHCO₃, 0,1% BSA). Le broyat est filtré sur 4 épaisseurs de gaze et une épaisseur de toile à bluter de 50 µM de vide de maille. La suspension est ensuite centrifugée 3 min à 5000 g (rotor JS 7.5, Beckman). Le culot est mis en suspension dans 12 mL de tampon RB 1X (0,3M sorbitol, 20mM Tricine KOH, 5mM MgCl₂ ; 2,5mM EDTA, pH 7,2) puis déposé sur un gradient de percoll 40% (préparé dans du RB 2X concentré, puis le volume est ajusté avec de l'eau) et centrifugé 10 min à 5000 g (rotor JS 7.5, Beckman). Les chloroplastes intacts sédimentent alors en bas, on élimine le percoll par aspiration. Les chloroplastes sont ensuite lavés 3 fois dans du RB1X avec des centrifugations intermédiaires de 5 min à 5000g.

Afin de séparer les fractions membranaires et solubles plastidiales, les chloroplastes sont éclatés par choc osmotique (MOPS/NaOH, 10 mM pH7,8 ; MgCl₂ 4 mM et EDTA 2,5 mM ; PMSF 1 mM ; benzamidine.HCl 1 mM). Les membranes plastidiales sont alors sédimentées par une centrifugation de 3 min à 5000 g. La fraction soluble est prélevée et mise de côté, le culot de membranes est lavé 3 fois puis finalement repris dans le milieu de choc osmotique.

3.2.1 Séparation des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)

L'électrophorèse SDS-PAGE est un système discontinu constitué de deux gels contigus mais distincts : le gel de concentration et de séparation. Nous avons utilisé deux systèmes d'électrophorèse : Glycine SDS-PAGE (Laemmli, 1970) et Tricine SDS-PAGE (Schägger and von Jagow, 1987). Le premier permet de séparer des protéines de poids moléculaire supérieurs à 30 kDa, tandis que le second est plus adapté à la séparation de protéines de petit poids moléculaire (allant de 1 à 100 kDa).

Glycine SDS-PAGE

Dans ce système d'électrophorèse les gels de séparation et de concentration sont réalisés avec des tampons différents: le gel de concentration (5 % acrylamide (v/v) ; 1M Tris-HCl, pH 6,8 ; SDS 0,1% (v/v) ; 10% de persulfate d'ammonium (APS) ; 0,2% de Temed) et le gel de séparation (12% acrylamide (v/v) ; 2M Tris-HCl, pH 8,8 ; SDS 0,1% (v/v) ; 10% APS ; 0,2% de Temed). 10 à 30µg de protéines, après dénaturation, sont déposés dans chaque puits. La dénaturation des protéines est obtenue en chauffant pendant 5 minutes à 95°C les échantillons. L'électrophorèse est réalisée à température ambiante, avec un voltage constant de 100 V, dans un tampon Tris-Glycine (Tris 25mM ; Glycine 240mM ; SDS 1% (p/v)).

Tricine SDS-PAGE

Dans ce système d'électrophorèse, les gels de séparation et de concentration sont réalisés avec le même tampon (3M Tris-Cl, 0.3% SDS, pH8.45). L'électrophorèse est réalisée à température ambiante, avec un voltage constant de 100 V, dans deux tampons différents : tampon Tris-Tricine (0.1M Tris, 0.1M Tricine, 0.1% SDS) au niveau de la cathode et tampon 0.2M Tris-Cl, pH8.9 au niveau de l'anode.

3.3 Détection immunologique d'un transfert Western (western blot)

Les protéines séparées par Glycine SDS-PAGE sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (*Schleicher & Schuell*, 0,45µM) pendant une heure dans un tampon de transfert (Tris 26 mM ; Glycine 190 mM ; SDS 0,037 % (p/v) ; éthanol 20% (v/v)). Les protéines de petit poids moléculaire séparées par Tricine SDS-PAGE sont transférées dans du tampon (Tris 26 mM ; Glycine 190 mM; éthanol 20% (v/v)) pendant 75 min à 15V sur des membranes de nitrocellulose (*Schleicher & Schuell*, 0,2µM).

La qualité du transfert est vérifiée par coloration de la membrane avec du Rouge Ponceau (2% (p/v) de Rouge Ponceau S; Acide Sulfosalicylique 30%(p/v) ; TCA 30% (p/v)).

Après décoloration à l'eau, la membrane est saturée avec 5% de lait dans du TBS 1X (Tris-HCl 10mM, pH 7,5 ; NaCl 150mM) pendant une heure. La membrane est incubée pendant la nuit à 4°C avec l'anticorps dilué dans du TBS-Tween contenant 0,1%-Lait 5%. La membrane est lavée trois fois pendant 10 min au TBS-Tween 0,1% avec agitation. Après une deuxième

incubation avec l'anticorps secondaire (dilué au 1/3000) pendant 1h à température ambiante, avec agitation, dans du TBS-Tween 0,1%-Lait 5%, la membrane est rincée trois fois pendant 10 min au TBS-Tween 0,1% avec agitation. La réaction est enfin révélée avec application des réactifs ECL.

Références bibliographiques

- Allison LA, Simon LD and Maliga P** (1996) Deletion of *rpoB* reveals a second distinct transcription system in plastids of higher plants. *EMBO J.* **15**: 2802-2809.
- Barkan A, Walker M, Nolasco M and Johnson D** (1994) A nuclear mutation in maize blocks the processing and translation of several chloroplast mRNAs and provides evidence for the differential translation of alternative mRNA forms. *EMBO J.* **13**: 3170–3181.
- Barnes D, Franklin S, Schultz J, Henry R, Brown E, Coragliotti A and Mayfield SP** (2005) Contribution of 5' and 3'untranslated regions of plastid mRNAs to the expression of *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast genes. *Mol. Genet. Genomics* **274**:625–636.
- Beardslee TA, Roy-Chowdhury S, Jaiswal P, Buhot L, Lerbs-Mache S, Stern DB and Allison LA** (2002) A nucleus-encoded maize protein with sigma factor activity accumulates in mitochondria and chloroplasts. *Plant J.* **31**:199-209.
- Bendich AJ** (2004) Circular chloroplast chromosome: the grand illusion. *Plant Cell* **16**: 1661-1666.
- Bligny M, Courtois F, Thaminy S, Chang CC, Lagrage T, Baruah-WolV J, Stern D and Lerbs-Mache S** (2000) Regulation of plastid rDNA transcription by interaction of CDF2 with two different RNA polymerases. *EMBO J.* **19**: 1851–1860.
- Bollenbach TJ, Schuster G and Stern DB** (2004) Cooperation of endo- and exoribonucleases in chloroplast mRNA turnover. *Prog.Nucleic.Acid.Res.Mol.Biol.* **78**:305-337.
- Cahoon AB, Harris FM and Stern DB** (2004) Analysis of developing maize plastids reveals two mRNA stability classes correlating with RNA polymerase type. *EMBO Rep.* **5**: 801-806.
- Carrillo N, Seyer P, Tyagi A and Herrmann RG** (1986) Cytochrome b-559 genes from *Oenothera hookeri* and *Nicotiana tabacum* show a remarkably high degree of conservation as compared to spinach. *Curr. Genet.* **10** : 619–624.
- Christopher DA and Mullet JE** (1994) Separate photosensory pathway co-regulate blue light/ultraviolet-A-activated *psbD-psbC* transcription and light-induced D2 and CP43 degradation in barley (*Hordeum vulgare*) chloroplasts. *Plant Physiol.* **104**: 1119–1129.
- Courtois F, Merendino L, Demarsy E, Mache R and Lerbs-Mache S** (2007) Phage-type RNA polymerase RPOTmp transcribes the *rrn* operon from the PC promoter at early developmental stages in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **145**:712-721.
- Cowling RJ, Kamiya Y, Seto H and Harberd NP** (1998) Gibberellin dose-response regulation of GA4 gene transcript levels in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **117**:1195-1203.
- Demarsy E, Courtois F, Azevedo J, Buhot L and Lerbs-Mache S** (2006) Building up of the plastid transcriptional machinery during germination and early plant development. *Plant Physiol.* **142**: 993-1003.
- Drager RG, Girard-Bascou J, Choquet Y, Kindle KL and Stern DB** (1998) In vivo evidence for 5'→3'exoribonuclease degradation of an unstable chloroplast mRNA. *Plant J.* **13**: 85–96.
- Drapier D, Rimbault B, Vallon O, Wollman FA and Choquet Y** (2007) Intertwined translational regulations set uneven stoichiometry of chloroplast ATP synthase subunits. *EMBO J.* **26**:3581-3591.

- Dühring U, Axmann IM, Hess WR and Wilde A** (2006) An internal antisense RNA regulates expression of the photosynthesis gene *isiA*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **103**:7054-7058.
- Dyall S D, Brown M T and Johnson P J** (2004) Ancient Invasions: From Endosymbionts to Organelles. *Science.* **304**:253-257.
- Eisermann A, Tiller K and Link G** (1990) In vitro transcription and DNA binding characteristics of chloroplast and etioplast extracts from mustard (*Sinapis alba*) indicate differential usage of the *psbA* promoter. *EMBO J.* **9**: 3981–3987.
- Esposito D, Fey JP, Eberhard S, Hicks AJ and Stern DB** (2003) In vivo evidence for the prokaryotic model of extended codon–anticodon interaction in translation initiation. *EMBO J* **22**:651–656.
- Favory JJ, Kobayshi M, Tanaka K, Peltier G, Kreis M, Valay JG and Lerbs-Mache S** (2005) Specific function of a plastid sigma factor for *ndhF* gene transcription. *Nucleic Acids Res.* **33**:5991-5999.
- Felder S, Meierhoff K, Sane A P, Meurer J, Driemel C, Plucken H, Klaff P, Stein B, Bechtold N and Westhoff P** (2001) The nucleus-encoded HCF107 gene of *Arabidopsis* provides a link between intergenic RNA processing and the accumulation of translation-competent *psbH* transcripts in chloroplasts. *Plant Cell.* **13**: 2127–2141.
- Ferreira KN, Iverson TM, Maghlaoui K, Barber J and Iwata S** (2004) Architecture of the photosynthetic oxygen-evolving center. *Science.* **303**:1831-1838.
- Flügge UI** (2001) Plant chloroplasts and other plastids. In: *Encyclopedia of Life Sciences*, Macmillan, London.
- Fujiwara M, Nagashima A, Kanamaru K, Tanaka K and Takahashi H** (2000) Three new nuclear genes, *sigD*, *sigE* and *sigF*, encoding putative plastid RNA polymerase sigma factors in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* **481**: 47–52.
- Gatenby AA, Rothstein SJ and Nomura M** (1989) Translational coupling of the maize chloroplast *atpB* and *atpE* genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**:4066-4070.
- Gottesman S** (2005) Micros for microbes: non-coding regulatory RNAs in bacteria. *Trends Genet.* **21**:399-404.
- Gruissem W and Zurawski G** (1985) Analysis of promoter regions for the spinach chloroplast *rbcL*, *atpB* and *psbA* genes. *EMBO J.* **4**: 3375–3383.
- Haff L A and Bogorad L** (1976) Poly(adenylic acid)-containing RNA from plastids of maize. *Biochemistry* **15**: 4110–4115.
- Hajdukiewicz PT, Allison LA and Maliga P** (1997) The two RNA polymerases encoded by the nuclear and the plastid compartments transcribe distinct groups of genes in tobacco plastids. *EMBO J.* **16**: 4041-4048.
- Hakimi MA, Privat I, Valay JG and Lerbs-Mache S** (2000) Evolutionary conservation of C-terminal domains of primary sigma70-type transcription factors between plants and bacteria. *J. Biol. Chem.* **275**: 9215–9221.

- Hayes R, Kudla J, Schuster G, Gabay L, Maliga P and Grussem, W** (1996) Chloroplast mRNA 30-end processing by a high molecular weight protein complex is regulated by nuclear encoded RNA binding proteins. *EMBO J.* **15**: 1132–1141.
- Hedtke B, Borner T and Weihe A** (1997) Mitochondrial and chloroplast phage-type RNA polymerases in Arabidopsis. *Science* **277**: 809-811.
- Hedtke B, Borner T and Weihe A** (2000) One RNA polymerase serving two genomes. *EMBO Rep.* **1**: 435-440.
- Hennig J and Herrmann RG** (1986) Chloroplast ATP synthase of spinach contains nine nonidentical subunit species, six of which are encoded by plastid chromosomes in two operons in a phylogenetically conserved arrangement. *Mol.Gen.Genet.* **203**:117-128.
- Hernández JA, Muro-Pastor AM, Flores E, Bes MT, Peleato ML and Fillat MF** (2006) Identification of a furA cis antisense RNA in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *J Mol Biol.* **355**:325-334.
- Higgs DC, Shapiro RS, Kindle KL and Stern DB** (1999) Small *cis*-acting sequences that specify secondary structures in a chloroplast mRNA are essential for RNA stability and translation. *Mol. Cell. Biol* **19**: 8479–8491.
- Hirose T and Sugiura M** (1997) Both RNA editing and RNA cleavage are required for translation of tobacco chloroplast *ndhD* mRNA: a possible regulatory mechanism for the expression of a chloroplast operon consisting of functionally unrelated genes, *EMBO J.* **16**: 6804-6811.
- Homann A and Link G** (2003) DNA-binding and transcription characteristics of three cloned sigma factors from mustard (*Sinapis alba* L.) suggest overlapping and distinct roles in plastid gene expression. *Eur. J. Biochem.* **270**: 1288–1300.
- Hotchkiss T and Hollingsworth MJ** (1997) RNA processing alters open reading frame stoichiometry from the large ATP synthase gene cluster of spinach chloroplasts. *Plant Mol. Biol.* **33**:635-640.
- Ikeda TM and Gray MW** (1999) Identification and characterization of T3/T7 bacteriophage-like RNA polymerase sequences in wheat. *Plant Mol. Biol.* **40**: 567-578.
- Ikeuchi M, Koike H and Inoue Y** (1989) N-terminal sequencing of low-molecular-mass components in cyanobacterial photosystem II core complex two components correspond to unidentified open reading frames of plant chloroplast DNA. *FEBS Lett.* **253**: 178-182.
- Ishizaki Y, Tsunoyama Y, Hatano K, Ando K, Kato K, Shinmyo A, Kobori M, Takeba G, Nakahira Y and Shiina T** (2005) A nuclear-encoded sigma factor, Arabidopsis SIG6, recognizes sigma-70 type chloroplast promoters and regulates early chloroplast development in cotyledons. *Plant J.* **42**:133-144.
- Isono K, Shimizu M, Yoshimoto K, Niwa Y, Satoh K, Yokota A and Kobayashi H** (1997) Leaf-specifically expressed genes for polypeptides destined for chloroplasts with domains sigma 70 factors of bacterial RNA polymerases in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 14948–14953.
- Iwai M, Katoh H, Katayama M and Ikeuchi M** (2004) PSII-Tc protein plays an important role in dimerization of Photosystem II. *Plant Cell Physiol.* **45**:1809–1816.

Kanamaru K, Fujiwara M, Seki M, Katagiri T, Nakamura M, Mochizuki N, Nagatani A, Shinozaki K, Tanaka K and Takahashi H (1999) Plastidic RNA polymerase sigma factors in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* **40**: 832–842.

Kanamaru K, Nagashima A, Fujiwara M, Shimada H, Shirano Y, Nakabayashi K, Shibata D, Tanaka K and Takahashi H (2001) An arabidopsis sigma factor (SIG2)-dependent expression of plastid-encoded tRNAs in chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* **42**: 1034–1043.

Kapoor S, Wakasugi T, Deno H and Sugiura M (1994) an *atpE*-specific promoter within the coding region of the *atpB* gene in tobacco chloroplast DNA. *Curr Genet.* **26**:263-268.

Kashino Y, Koike H, Yoshio M, Egashira H, Ikeuchi M, Pakrasi HB and Satoh K (2002) Low-molecular-mass polypeptide components of a photosystem II preparation from the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus vulcanus*. *Plant Cell Physiol.* **43**:1366-1373.

Katz YS and Danon A (2002) The 3'-untranslated region of chloroplast *psbA* mRNA stabilizes binding of regulatory proteins to the leader of the message. *J Biol Chem* **277**:18665–18669.

Kim M and Mullet JE (1995) Identification of a sequence-specific DNA binding factor required for transcription of the barley chloroplast blue light-responsive *psbD-psbC* promoter. *Plant Cell* **7**: 1445–1457.

Kim M, Christopher DA and Mullet, JE (1999) ADP-dependent phosphorylation regulates association of a DNA-binding complex with the barley chloroplast *psbD* blue light responsive promoter. *Plant Physiol.* **119**: 663–670.

Klein RR and Mullet JE (1990) Light-induced transcription of chloroplast genes. *PsbA* transcription is differentially enhanced in illuminated barley. *J. Biol. Chem.* **265**:1895–1902.

Kohchi T, Yoshida T, Komano T and Ohyama K (1988) Divergent mRNA transcription in the chloroplast *psbB* operon. *EMBO J.* **7**:885-891.

Kuroda H and Maliga P (2001) Sequences downstream of the translation initiation codon are important determinants of translation efficiency in chloroplasts. *Plant Physiol* **125**:430–436.

Laemmli, UK (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680–685.

Lahiri SD and Allison LA (2000) Complementary expression of two plastid-localized σ -like factors in maize. *Plant Physiol.* **123**:883–894.

Legen J, Kemp S, Krause K, Profanter B, Herrmann RG and Maier RM (2002) Comparative analysis of plastid transcription profiles of entire plastid chromosomes from tobacco attributed to wild-type and PEP-deficient transcription machineries. *Plant J* **31**:171-188.

Lerbs-Mache S (1993) The 110-kDa polypeptide of spinach plastid DNA-dependent RNA polymerase: single-subunit enzyme or catalytic core of multimeric enzyme complexes? *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 5509-5513.

- Lerbs-Mache S** (2000) Regulation of rDNA transcription in plastids of higher plants. *Biochimie* **82**: 525–535.
- Liere K and Börner T** (2006) Transcription of Plastid In: Grasser; K.D (ed.) *Regulation of Transcription in Plants*. Blackwell publishing Ltd.
- Liere K and Maliga P** (2001) Plastid RNA polymerases. In Andersson, B. und Aro, E.-M. (eds.), *Regulation of Photosynthesis*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, Dordrecht, pp. 29-49.
- Liere K, Kaden D, Maliga P and Börner T** (2004) Overexpression of phage-type RNA polymerase RpoTp in tobacco demonstrates its role in chloroplast transcription by recognizing a distinct promoter type. *Nucleic Acids Res.* **32**:1159-1165.
- Lisitsky I, Klaff, P and Schuster G** (1996) Addition of poly(A)-rich sequences to endonucleolytic cleavage sites in the degradation of spinach chloroplast mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.USA.* **93**: 13398–13403.
- López-Juez E** (2007) Plastid biogenesis, between light and shadows. *J. Exp. Bot.* **58**: 11–26.
- López-Juez E and Pyke KA** (2005) Plastids unleashed: their development and their integration in plant development. *Int. J. Dev. Biol.* **49**: 557-577.
- Loschelder H, Schweer J, Link B and Link G** (2006) Dual temporal role of plastid sigma factor 6 in *Arabidopsis* development. *Plant Physiol.* **142**:642-650.
- Lung B, Zemann A, Madej MJ, Schuelke M, Techritz S, Ruf S, Bock R and Hüttenhofer A** (2006) Identification of small non-coding RNAs from mitochondria and chloroplasts. *Nucleic Acids Res.* **34**:3842-3852.
- Lysenko EA** (2007) Plant sigma factors and their role in plastid transcription. *Plant Cell Rep.* **7**: 845-859.
- Mache R and Lerbs-Mache S** (2001) Chloroplast genetic system of higher plants: chromosome replication, chloroplast division and elements of the transcriptional apparatus. *Curr Sci.* **80**: 217-224.
- Marín-Navarro J, Manuell A L, Wu J and Mayfield SP** (2007) Chloroplast translation regulation. *Photosynth Res.* **94**: 359-374.
- Martin W, Rujan T, Richly E, Hansen A, Cornelsen S, Lins T, Leister D, Stoebe B, Hasegawa M and Penny D** (2002) Evolutionary analysis of *Arabidopsis*, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci.USA.* **99**: 12246-12251.
- Meierhoff K, Felder S, Nakamura T, Bechtold N and Schuster G** (2003) HCF152, an *Arabidopsis* RNA binding pentatricopeptide repeat protein involved in the processing of chloroplast psbB-psbT-psbH-petB-petD RNAs. *Plant Cell.* **15**: 1480–1495.
- Memon AR, Meng B and Mullet JE** (1996) RNA-binding proteins of 37/38 kDa bind specifically to the barley chloroplast *psbA* 3'-end untranslated RNA. *Plant Mol. Biol.* **30**:1195–1205.

- Meurer J, Berger A and Westhoff P** (1996) A nuclear mutant of Arabidopsis with impaired stability on distinct transcripts of the plastid psbB, psbD/C, ndhH, and ndhC operons. *Plant Cell*. **8**:1193-1207.
- Miyagi T, Kapoor S, Sugita M and Sugiura M** (1998) Transcript analysis of the tobacco plastid operon rps2/atpI/H/F/A reveals the existence of a non-consensus type II (NCII) promoter upstream of the atpI coding sequence. *Mol. Gen. Genet.* **257**: 299-307.
- Moazed D and Noller HF** (1987) Interaction of antibiotics with functional sites in 16S ribosomal RNA. *Nature* **327**:389–394.
- Monde R, Schuster G and Stern DB** (2000) Processing and degradation of chloroplast mRNA. *Biochimie* **82**: 573–582.
- Monod C, Takahashi Y, Goldschmidt-Clermont M and Rochaix JD** (1994) The chloroplast ycf8 open reading frame encodes a photosystem II polypeptide which maintains photosynthetic activity under adverse growth conditions. *EMBO J.* **13**:2747-54.
- Mullet JE** (1993) Dynamic regulation of chloroplast transcription. *Plant Physiol.* **103**: 309-313.
- Nagashima A, Hanaoka M, Shikanai T, Fujiwara M, Kanamaru K, Takahashi H and Tanaka K** (2004a) The multiple-stress responsive plastid sigma factor, SIG5, directs activation of the psbD blue light-responsive promoter (BLRP) in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol.* **45**:357–368.
- Nagashima A, Hanaoka M, Motohashi R, Seki M, Shinozaki K, Kanamaru K, Takahashi H and Tanaka K** (2004b) DNA microarray analysis of plastid gene expression in an Arabidopsis mutant deficient in a plastid transcription factor sigma, SIG2. *Biosci.Biotechnol. Biochem.* **68**: 694–704.
- Nishimura Y, Kikis EA, Zimmer SL, Komine Y and Stern DB** (2004) Antisense transcript and RNA processing alterations suppress instability of polyadenylated mRNA in *chlamydomonas* chloroplasts. *Plant Cell.* **16**:2849-2869.
- Ohnishi N and Takahashi Y** (2001) PsbT polypeptide is required for efficient repair of photodamaged photosystem II reaction center. *J Biol Chem.* **276**: 33798-33804.
- Ohnishi N, Kashino Y, Satoh K, Ozawa S and Takahashi Y** (2007) Chloroplast-encoded polypeptide PsbT is involved in the repair of primary electron acceptor QA of photosystem II during photoinhibition in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biol Chem.* **282**: 7107-7115.
- Privat I, Hakimi MA, Buhot L, Favory JJ and Lerbs-Mache S** (2003) Characterization of Arabidopsis plastid sigma-like transcription factors SIG1, SIG2 and SIG3. *Plant Mol.Biol.* **55**: 385–399.
- Rochaix JD** (1996) Post-transcriptional regulation of chloroplast gene expression in *Chlamydomonas*. *Plant Mol. Biol* **32**: 327–341.
- Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T** (1989) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Santis-MacIossek G, Kofer W, Bock A, Schoch S, Maier RM, Wanner G, Rudiger W, Koop HU and Herrmann RG** (1999) Targeted disruption of the plastid RNA polymerase genes *rpoA*, *B* and *C1*: molecular biology, biochemistry and ultrastructure. *Plant J.* **18**: 477-489.
- Sato S, Tabata S, Hayashi H, Miyake C, Yokota A and Shibata D** (2000) Chloroplast development in *Arabidopsis thaliana* requires the nuclear-encoded transcription factor sigma B. *FEBS Lett.* **485**: 178-182.
- Sato J, Baba K, Nakahira Y, Tsunoyama Y, Shiina T, and Toyoshima Y** (1999) Development stage-specific multisubunit plastid RNA polymerase (PEP) in wheat. *Plant J.* **18**: 407-415.
- Schägger H and von Jagow G** (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1-100kDalton. *Anal. Biochem* **166**: 368-379.
- Scharff LB and Koop HU** (2006) Linear molecules of tobacco ptDNA end at known replication origins and additional loci. *Plant Mol Biol.* **62**:611-621.
- Schmitz-Linneweber C, Maier R M, Alcaraz J P, Cottet A, Herrmann RG and Mache R** (2001) The plastid chromosome of spinach (*Spinacia oleracea*): complete nucleotide sequence and gene organization. *Plant Molecular Biology* **45**: 307-315.
- Schweer J, Loschelder H and Link G** (2006) A promoter switch that can rescue a plant sigma factor mutant. *FEBS Lett.* **580**:6617-6622.
- Shiina T, Allison L and Maliga P** (1998) *rbcL* transcript levels in tobacco plastids are independent of light: Reduced dark transcription rate is compensated by increased mRNA stability. *Plant Cell* **10**: 1713-1722.
- Shiina T, Tsunoyama Y, Nakahira Y and Khan MS** (2005) Plastid RNA polymerases, promoters, and transcription regulators in higher plants. *Int Rev Cytol.* **244**: 1-68.
- Shirano Y, Shimada H, Kanamaru K, Fujiwara M, Tanaka K, Takahashi H, Unno K, Tabata S, Hayashi H, Miyake C, Yokota A, Shibata D** (2000) Chloroplast development in *Arabidopsis thaliana* requires the nuclear-encoded transcription factor sigma B. *FEBS Lett.* **485**:178-182.
- Sriraman P, Silhavy D, and Maliga P** (1998) The phage-type PclpP-53 plastid promoter comprises sequences downstream of the transcription initiation site. *Nucleic Acids Res.* **26**: 4874-4879.
- Stahl DJ, Rodermeil SR, Bogorad L and Subramanian AR** (1993) Co-transcription pattern of an introgressed operon in the maize chloroplast genome comprising four ATP synthase subunit genes and the ribosomal protein gene *rps2*. *Plant Mol. Biol.* **21**:1069-1076.
- Stern DB and Gruissem W** (1987) Control of plastid gene expression: 3' inverted repeats act as mRNA processing and stabilizing elements, but do not terminate transcription. *Cell* **51**: 1145-1157.
- Stern DB and Kindle KL** (1993) 3' end maturation of the *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast *atpB* mRNA is a two-step process. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 2277-2285.

- Stollar NE, Kim JK and Hollingsworth MJ** (1994) Ribosomes pause during the expression of the large ATP synthase gene cluster in spinach chloroplasts. *Plant Physiol.* **105**:1167-1177.
- Suay L, Salvador ML, Abesha E and Klein U** (2005) Specific roles of 5' RNA secondary structures in stabilizing transcripts in chloroplasts. *Nucleic Acids Res.* **33**:4754-4761.
- Sugita M and Sugiura M** (1996) Regulation of gene expression in chloroplasts of higher plants. *Plant Mol. Biol.* **32**: 315–326.
- Sugiura M** (1992) The chloroplast genome. *Plant Mol. Biol.* **19**: 149-168.
- Suzuki JY and Maliga P** (2000) Engineering of the rp123 gene cluster to replace the plastid RNA polymerase alpha subunit with the Escherichia coli homologue. *Curr. Genet.* **38**: 218–225.
- Suzuki JY, Sriraman P, Svab Z, and Maliga P** (2003) Unique architecture of the plastid ribosomal RNA operon promoter recognized by the multisubunit RNA polymerase in tobacco and other higher plants. *Plant Cell* **15**: 195–205.
- Suzuki JY, Ytterberg AJ, Beardslee TA, Allison LA, Wijk KJ and Maliga P** (2004) Affinity purification of the tobacco plastid RNA polymerase and in vitro reconstitution of the holoenzyme. *Plant J.* **40**:164–172.
- Swiatecka-Hagenbruch M, Liere K, Börner T** (2007) High diversity of plastidial promoters in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Genet Genomics* **277**:725-734.
- Thornton L, Roose J, Pakrasi H, Ikeushi M** (2005) The low molecular weight components. In *Photosystem II : The water/plastoquinone Oxido-reductase in Photosynthesis*. Edited by T. Wydrzynski and K. Satoh e. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Acad Pub. Group: 121-138.
- Timmis J N, Ayliffe M A, Huang C Y and Martin W** (2004) Endosymbiotic gene transfer: organelle genomes forge eukaryotic chromosomes. *Nature Rev. Genet.* **5**: 123-135.
- Tozawa Y, Teraishi M, Sasaki T, Sonoike K, Nishiyama Y, Itaya M, Miyao A, Hirochika H** (2007) The plastid sigma factor SIG1 maintains photosystem I activity via regulated expression of the psaA operon in rice chloroplasts. *Plant J.* **52**:124-132.
- Tsunoyama Y, Ishizaki Y, Morikawa K, Kobori M, Nakahira Y, Takeba G, Toyoshima Y Shiina, T** (2004) Blue light-induced transcription of plastid-encoded psbD gene is mediated by a nuclear-encoded transcription initiation factor, AtSig5. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **101**: 3304–3309.
- Wagner EG, Altuvia S and Romby P** (2002) Antisense RNAs in bacteria and their genetic elements. *Adv. Genet.* **46**:361-98.
- Westhoff P and Herrmann RG** (1988) Complex RNA maturation in chloroplasts the psbB operon from spinach. *Eur J Biochem.* **171**:551-564.
- Willey DL and Gray JC** (1989) Two small open reading frames are co-transcribed with the pea chloroplast genes for the polypeptides of cytochrome b-559. *Curr. Genet.* **15**: 213–220.
- Wu CY, Lin CH and Chen LJ** (1997) Identification of the transcription start site for the spinach chloroplast serine tRNA gene. *FEBS Lett.* **418**:157-61.

Yao J, Roy-Chowdhury S and Allison LA (2003) AtSig5 is an essential nucleus-encoded Arabidopsis sigma-like factor. *Plant Physiol.* **132**:739-747.

Yazgan O and Krebs JE (2007) Noncoding but nonexpendable: transcriptional regulation by large noncoding RNA in eukaryotes. *Biochem. Cell Biol.* **85**:484-496.

Yehudai-Resheff S, Hirsh M and Schuster G (2001) Polynucleotide phosphorylase functions as both an exonuclease and a poly(A) polymerase in spinach chloroplasts. *Mol. Cell. Biol.* **21**: 5408–5416.

Zandueta-Criado A and Bock R (2004) Surprising features of plastid ndhD transcripts: addition of non-encoded nucleotides and polysome association of mRNAs with an unedited start codon. *Nucleic Acids Res.* **32**: 542–550.

Zheleva D, Sharma J, Panico M, Morris H R and Barber J (1998) Isolation and Characterization of Monomeric and Dimeric CP47-Reaction Center Photosystem II Complexes. *J. Biol. Chem.* **273**: 16122-16127.

Zouni A, Witt HT, Kern J, Fromme P, Krauss N, Saenger W and Orth P (2001) Crystal structure of photosystem II from *Synechococcus elongatus* at 3.8 angstrom resolution. *Nature.* **409**:739-743.

Zurawski G, Bottomley W and Whitfeld PR (1982) Structures of the genes for the beta and epsilon subunits of spinach chloroplast ATPase indicate a dicistronic mRNA and an overlapping translation stop/start signal. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **79**:6260-6264.

Publication

Nucleus-encoded plastid sigma factor SIG3 transcribes specifically the *psbN* gene in plastids

Wafa Zghidi, Livia Merendino, Annick Cottet, Régis Mache and Silva Lerbs-Mache*

Laboratoire Plastiques et différenciation cellulaire, Université Joseph Fourier and Centre National de la Recherche Scientifique, B.P. 53, 38041 Grenoble, France

Received July 24, 2006; Revised and Accepted November 9, 2006

ABSTRACT

We have investigated the function of one of the six plastid sigma-like transcription factors, sigma 3 (SIG3), by analysing two different *Arabidopsis* T-DNA insertion lines having disrupted *SIG3* genes. Hybridization of wild-type and *sig3* plant RNA to a plastid specific microarray revealed a strong reduction of the plastid *psbN* mRNA. The microarray result has been confirmed by northern blot analysis. The SIG3-specific promoter region has been localized on the DNA by primer extension and mRNA capping experiments. Results suggest tight regulation of *psbN* gene expression by a SIG3-PEP holoenzyme. The *psbN* gene is localized on the opposite strand of the *psbB* operon, between the *psbT* and *psbH* genes, and the SIG3-dependent *psbN* transcription produces antisense RNA to the *psbT*–*psbH* intergenic region. We show that this antisense RNA is not limited to the intergenic region, i.e. it does not terminate at the end of the *psbN* gene but extends as antisense transcript to cover the whole *psbT* coding region. Thus, by specific transcription initiation at the *psbN* gene promoter, SIG3-PEP holoenzyme could also influence the expression of the *psbB* operon by producing *psbT* antisense RNA.

INTRODUCTION

Plastids are semiautonomous plant organelles harbouring their own transcription system that originate from a cyanobacteria- and proteobacteria-like endosymbiote. The cyanobacteria-like ancestor of chloroplasts has contributed with a eubacteria-type RNA polymerase and the proteobacteria-like ancestor of mitochondria with a phage-type RNA polymerase to the transcriptional apparatus of higher plants (1–3). Transcription regulation of the plastid genome of higher plants is rather complex. In dicotyledon plants, two different phage type RNA polymerases (NEPs, nucleus

encoded RNA polymerases, RPOTp and RPOTmp) and one eubacteria-type RNA polymerase (PEP, plastid encoded RNA polymerase) participate in the transcription of the ~120 genes that are encoded on the plastid genome. The PEP core enzymes is composed of four different subunits, α , β , β' and β'' , which are encoded on the plastid genome in two different transcription units. Genes coding the β , β' and β'' subunits are arranged as operon analogous to the *rif* operon of *Escherichia coli*. The α subunit is encoded in a S10 or spe-like operon together with genes coding for ribosomal proteins [(4), reviewed in (5)].

The activity of the PEP core enzyme (α , β , β' , β'') is regulated by sigma-like transcription factors (SLFs), which have at first been characterized by *in vitro* transcription assays (6–8). The first cDNA sequences coding plant nucleus-encoded SLFs have been described much later (9–15) and finally six different sigma factors, SIG1–SIG6, have been described for *Arabidopsis thaliana* (16). The mRNAs of these SLFs are translated in the cytoplasm and corresponding proteins are subsequently imported as precursor proteins into the plastids. The functions of all these sigma factors are not yet completely elucidated. Besides of specificity in the recognition of different promoter regions, SLFs are also differentially expressed during plant development and plastid differentiation (17,18). Transcription of most of the sigma factor coding genes is under light control, but tissue/organ specific expression and regulation by circadian rhythm have also been described previously (11,13,19). In addition, regulation of PEP activity by phosphorylation either of SLFs or RNA polymerase subunits has been described (20,21).

In general, it seems that SLFs have overlapping as well as specific functions (15,22,23). Although overlapping functions have been demonstrated by *in vitro* transcription assays that are performed without competition by other sigma factors, the specific functions are more easily detected by analyses that reflect *in vivo* competition conditions, i.e. by characterization of specific sigma knock-out plants. Most of the results concerning the specific functions of plant sigma factors have been obtained by analyses of *Arabidopsis* T-DNA insertion mutants. From these results it can be concluded that a SIG2-PEP holoenzyme transcribes specifically some of the tRNA genes (24) and the *psaJ* gene (25). SIG5 has been shown to play an important role in the recognition of the

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +33 0 4 76 63 57 44; Fax: +33 0 4 76 63 55 86; Email: Silva.Lerbs-Mache@ujf-grenoble.fr

© 2006 The Author(s).

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.0/uk/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

blue-light dependent promoter of the *psbD* gene (26–28) and might in addition have specific functions during embryogenesis (29). SIG6 plays a more general role during early plastid differentiation and plant development (30), and SIG4 is of specific importance for *ndhF* gene transcription (31). The functions of SIG1 and SIG3 *in vivo* have not yet been described.

From results obtained by *in vitro* transcription assays, it is suggested that the activity of SIG1 might be regulated by its interaction with additional protein(s) (32) and that the activity of SIG3 might be regulated by proteolytic cleavage (15,22). In the present paper, we have analysed the plastid gene expression pattern of an *Arabidopsis* SIG3 T-DNA insertion mutant in order to characterize the function of SIG3 in plastid gene transcription.

MATERIALS AND METHODS

Isolation of SIG3 T-DNA insertion lines

Two different *A.thaliana* (ecotype Columbia, Co) SIG3 T-DNA insertion lines have been obtained from the SALK collection (SALK_009166 and SALK_081321, named *sig3-2* and *sig3-4*, respectively). The T-DNA is inserted at the border of intron 1 and exon 2 in line *sig3-2* and within exon 4 in line *sig3-4*. None of the two lines was kanamycin resistant. The heterozygous SIG3 insertion lines were at first backcrossed with wild-type (WT, Co.) plants two times in order to eliminate any other T-DNA insertion or mutations. Every generation resulting from self-pollination was analysed by PCR for the presence of the T-DNA insertion in the SIG3 gene. Resulting homozygotes were isolated for both lines. The sequences of the primers that have been used for the characterization of the T-DNA lines are as follows:

1: 5'-GATGATACTGGTTGTGCCGCC-3'; 2: 5'-AACGG-CAAGCACAAAGAGACG-3'; 3: 5'-TGCCAAAAGGTTCT-TTGCCAG-3'; 4: 5'-GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT-3'; 5: 5'-TTCAATTCGTTCCCATTC-3'. PCRs have been performed as described previously (31).

Plant material and RNA isolation

Surface-sterilized *Arabidopsis* seeds were spread on MS agar plates, kept for 72 h at 4°C in darkness and then transferred into a growth chamber and grown for 6 days at 23°C under 16/8 h light/dark cycle at 110 μmol of photons m⁻² s⁻¹. Total RNA was prepared from seedling as described in (23).

DNA microarray preparation

The *A.thaliana* plastid DNA microarray was constructed by spotting 60mer synthetic oligonucleotides that corresponded to sequences of 80 protein genes on nitrocellulose membranes. Oligonucleotides have been chosen within 200 nt sequences downstream of the ATG translation initiation codons. The spotting procedure was performed by Eurogentec (Belgium). Each DNA sample was spotted two times on a nitrocellulose membrane.

cDNA synthesis and array analyses

Total RNA was treated twice with DNase I (2 U/μg RNA) in order to remove traces of DNA. An aliquot of 4 μg of

each RNA preparation have been labelled for microarray hybridization. RNA was reverse transcribed using specific primers corresponding to the 80 protein coding genes that we wanted to analyse on the microarray. Primers are localized as near as possible to the 3' end of the 60mers that have been spotted onto the filters. The reaction was performed as described (31) in the presence of 100 μCi of [α -³²P]dATP (Amersham Bioscience) using Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen). Samples were treated with RNase H at 37°C for 15 min and non-incorporated deoxyribonucleotides were removed by passage through Sephadex G50. An aliquot of each of the synthesized cDNAs was analyzed on a 6% denaturing polyacrylamide gel in order to verify the quality of the synthesized cDNA. Hybridization was performed under the same conditions as indicated for northern experiments, however, hybridization time was extended to 3 days. After 3 weeks exposure to Fujifilm Imaging Plates, the plates were analyzed using a Phosphorimager (Fujifilm FLA-8000) and the accompanying software. Background subtraction was performed by application of the R Project for Statistical Computing (33) (<http://www.R-project.org>). Before calculating mean values and standard deviations, results from all independent experiments were normalized taking the highest-labelled experiment as reference.

Primer extension

Using isolated total DNA from *Arabidopsis* as template, the *clpP*, *atpH*, *psbN* and *psbT* promoter regions have been PCR amplified and cloned into pCR^{2.1}-TOPO^R (Invitrogen) with the following primers: 5'-CCAATATGCAATGGGGG-3' and 5'-GTATCTCCTTCTCCAGG-3' (*clpP*), 5'-GGATAGGAATACTATC-3' and 5'-GTCCAATAGAAGCAAGC-3' (*atpH*, -44), 5'-GTGAGTCTATGGAAGGTC-3' and 5'-CGCTAAGATTAATCCAGCC-3' (*atpH*, -413), 5'-CATC-CAGTAGAACAGAAG-3' and 5'-CTCTTAGTTGTTGAG-AGG-3' (*psbN*) and 5'-AGGTTGGTTTACGTTTG-3' and 5'-TCATTTTTTAGTTGAAATTTT-3' (*psbT*). Primer extension experiments have been performed as described (31) using 10 μg of total RNA. The following primers have been used for primer extension and to establish the accompanying sequence ladders: 5'-GTATCTCCTTCTCCAGG-3' (*clpP*), 5'-GTCCAATAGAAGCAAGC-3' (*atpH*), 5'-CAAGGCAGTATATAGAGC-3' (*psbN*), 5'-GAAATTTAGGTGTTTC-3' (*psbT*) and 5'-ATGGAAGCATTGGTTTATAC-3' (*psbN/psbT*-antisense).

Capping

In vitro capping reactions were performed in a final volume of 30 μl, using 15 μg of total RNA and 10 U of guanylyltransferase (Ambion), in the presence of 100 μCi of [α -³²P]GTP (3000 Ci/mmol) and 20 U of RNase inhibitor. The reactions were incubated at 37°C for 1 h. RNAs were purified with phenol/chloroform extractions and precipitated with 3 vol of ethanol. Transcripts were then hybridized to 5 ng of complementary riboprobe and subjected to ribonuclease protection assay, using the RPA IIITM Ribonuclease Protection Assay Kit (Ambion), according to the manufacturer's protocol.

5'-RACE

The discrimination between transcription start sites and processing sites of precursor RNAs was done by RNA Ligase Mediated Rapid Amplification of cDNA Ends (RLM-RACE Kit; Ambion) without and with previous TAP treatment of RNAs. Reactions were performed according to the supplier's protocol but without removal of free 5'-phosphates by calf intestine alkaline phosphatase. PCR products were analysed on agarose gels after two successive PCR amplifications, the first using two outer primers and the second using two inner primers. Primers are as follows: *psbT*-as outer: 5'-ATGGAAGCATTGGTTTATACATTTTC-3', *psbT*-as inner: 5'-CGGGAACCACCTAAAATTTCAAC-3', *psbN* outer: 5'-CTCTTAGTTGTTGAGAGG-3' and *psbN* inner: 5'-CCC-AAAGGCAGTATATAGAC-3'. The inner and outer Adapter primers are those of the RLM-RACE Kit.

Northern

For northern blot hybridization, PCR fragments have been ³²P-labelled by random priming (*psbH*, *psbN*, *psbB* and *rbcL*) or riboprobes have been generated by T7 RNA polymerase (*psbT*). The gene-specific PCR fragments have been obtained with the following primers: 5'-GGCTACACAA-ACTGTTGAAG-3' and 5'-CTAATTCAGTAAATTCATCC-3' (*psbH*), 5'-GGAAACAGCAACCCTAGTCGCC-3' and 5'-CCCCGTGTTCTCGAATGGATC-3' (*psbN*), 5'-GGT-CCTGGAATATGGGTATCC-3' and 5'-GCCCGAATTC-CACTTGAGC-3' (*psbB*), 5'-AACCAAGGATACTGATAT-CTTGGC-3' and 5'-ATCGTCCTTGTAAACGATCAAGGC-3' (*rbcL*). Prehybridization (1 h at 65°C) and hybridization (24 h at 65°C) were performed in 0.5 M NaHPO₄, pH 7.2, 1 mM EDTA, 7% SDS and 1% BSA. After hybridization filters were washed in 40 mM NaHPO₄, pH 7.2, 1 mM EDTA and 7% SDS at room temperature for 10 min followed by washing at 65°C for 5 min.

The *psbT* PCR fragment has been cloned into pCR2.1-TOPO vector (Invitrogen), the construct was linearized by BamHI and transcribed using T7 RNA polymerase in order to obtain a *psbT* antisense riboprobe. Hybridization of the *psbT* antisense RNA was performed overnight in 50% formamide, 5× SSC, 5× Denhardt and 1% SDS at 60°C. After hybridization, filters were washed twice in 0.2× SSC containing 0.1% SDS at 42°C for 10 min.

RESULTS

Isolation of SIG3 T-DNA insertion lines

Two different *A.thaliana* SIG3 T-DNA insertion lines have been obtained from the SALK collection (named here *sig3-2* for SALK_009166 and *sig3-4* for SALK_081321). The positions of the T-DNA insertions in the *SIG3* gene are indicated in Figure 1A. Homozygous plants were selected for each of the two lines by PCR analyses using one primer pair that amplifies the border between T-DNA and the *SIG3* gene (primers 2 and 5 for *sig3-2* and primers 3 and 5 for *sig3-4*) and one primer pair that amplifies part of the *SIG3* gene (primers 1 and 2 for *sig3-2* and primers 3 and 4 for *sig3-4*). Figure 1B shows the PCR analyses obtained after cleaning of the mutants by two successive backcrosses (see Materials and

Methods). Results reveal three homozygous plants for *sig3-2* (Figure 1B, lanes 1/7, 3/9 and 4/10) and one homozygous plant for *sig3-4* (Figure 1B, lanes 2/8). These plants have been propagated and their descendents have been analysed in the following experiments. Figure 1C shows the visible phenotypes of WT and mutant plants (*sig3-4*) when grown at 23°C under 16/8 h light/dark cycle at 110 μmol of photons m⁻² s⁻¹, i.e. visible phenotypes are not different. We have also compared different light conditions, varying from 50 to 200 μmol of photons m⁻² s⁻¹, using light/dark cycle or continuous illumination. Up to now, we could not detect visible differences between phenotypes of WT and *sig3* (*sig3-2* and *sig3-4*) plants (data not shown). If not otherwise indicated, in all following experiments *sig3-4* plants have been analysed.

Analyses of plastid gene expression in the SIG3 T-DNA insertion mutants

In order to characterize the function of SIG3 in plastid gene expression, we performed an overall transcript profiling by microarray hybridization. Transcript levels of 6-day-old *SIG3* insertion mutants corresponding to 80 ORFs of the *A.thaliana* plastid genome (see Materials and Methods) were compared to that of WT plants. Three independent experiments have been made. Normalized average values (*sig3*/WT) and standard deviations are summarized in Table 1 (Supplementary Table S1 is available at NAR online). If the commonly used threshold value of 0.66 (1/1.5) is applied (34), only two mRNAs, *psbN* and *atpH*, are significantly reduced in the *sig3* plants thus representing valuable candidates for specific transcription by a SIG3-PEP holoenzyme. These two mRNAs have been analysed in more detail by primer extension in order to determine the promoter region for specific SIG3 dependent transcription (Figure 2A and B).

The determination of 5' ends of precursor RNAs by primer extension shows that *psbN* mRNA is transcribed from a single PEP promoter (Figure 2A, lanes 5 and 6). Transcription initiation at position -32 was confirmed by *in vitro* capping of *psbN* mRNA (Figure 2A, lanes 7-9). The upstream DNA sequence of the transcription start site harbours -35 and -10 sequences reminiscent of prokaryotic-type promoter elements (Figure 2D, upper lane). The *psbN* transcript is strongly reduced in the *sig3* plants, thus indicating that the *psbN* transcription is under specific control of SIG3. This experiment was made with the two different *sig3* mutants, *sig3-2* and *sig3-4*, and in both cases we obtained the same result (data not shown). This shows that the lack of *psbN* mRNA in the two mutants is indeed caused by the lack of sigma factor 3 and not by an additional, undetected, mutation.

The *atpH* gene yields two different transcripts. One of them ends up at position -44 from the ATG translation initiation codon (Figure 2B, lanes 1 and 2). This mRNA should result from transcription by NEP, as its upstream sequence does not reveal recognizable prokaryotic-type promoter elements. The exact position of the longer mRNA in Figure 2B could not be determined since the accompanying sequence ladder could not be read up to this point. Therefore, we have cloned the DNA sequence upstream of the -44 RNA and repeated the primer extension analysis using a primer that is close enough to determine the 5'-end of the long *atpH* transcript (Figure 2B, lanes 11 and 12). The upstream DNA

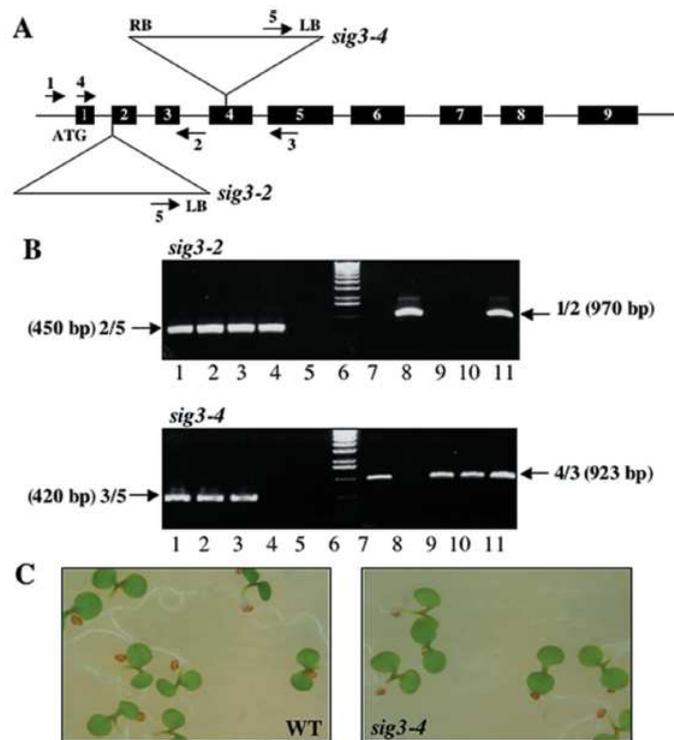


Figure 1. Characterization of two different *SIG3* T-DNA insertion mutants. (A) Schematic representation of the T-DNA insertions and the location of the primers that have been used for PCR analyses. (B) Selection of homozygous lines for *sig3-2* and *sig3-4* after the second backcross. Total DNA was prepared from five individual F_1 lines obtained by self-pollination of heterozygous plants after the second backcross. The presence of the T-DNA was verified by PCR using primers 2 and 5 (*sig3-2*, lanes 1–5) or primers 3 and 5 (*sig3-4*, lanes 1–5). The presence of WT DNA was analysed by PCR using primers 1 and 2 (*sig3-2*, lanes 7–11) or primers 4 and 3 (*sig3-4*, lanes 7–11). (C) WT and homozygous *SIG3* T-DNA insertion mutants grown on agar plates under 16 h light/8 h dark cycle for 1 week.

sequence of the long transcript starting at position -413 is reported in Figure 2D, lower lane. This long RNA should result from specific transcription by *SIG3*-PEP holoenzyme because this RNA is completely absent in *sig3* plants (Figure 2B, lane 12). Altogether, these results show that the *atpH* gene is under two-promoter/two-RNA polymerase control, and one of the two promoters is recognized specifically by a *SIG3*-PEP holoenzyme. As control for an mRNA whose expression does not change, i.e. it is not under control of *SIG3*, we have analysed also *clpP* mRNAs by primer extension. The predominant -53 precursor RNA that is produced by *NEP* (35) is present in equal amount in WT and *sig3* plants (Figure 2C, lanes 4 and 5).

The lack of *psbN* mRNA does not change the processing of the *psbB* operon

The *psbN* mRNA represents naturally occurring antisense RNA to the *psbB* polycistronic mRNA (36). Therefore, we wanted to know whether the strong reduction of the *psbN* mRNA in the *sig3* plants influences the processing of the polycistronic transcript of the *psbB* operon which consists of *psbB*, *psbT*, *psbH*, *petB* and *petD* mRNAs (37,38). The organization of the *psbB* operon is schematically represented in Figure 3A.

At first we have analysed the intermediary RNA species that result from processing of the long co-transcript by northern analyses (Figure 3B). By using probes that correspond to the *psbB*, *psbT* and *psbH* genes northern analysis do not show remarkable differences between WT and *sig3* RNAs (Figure 3B). The *rbcL* mRNA is analysed because the microarray analyses for this gene had a high average value and a high standard deviation (see Table 1). The *rbcL* probe had been spotted in one of the corners of the nitrocellulose membrane that had been utilized to handle the membrane. Background hybridization was very high in some experiments and the microarray results are not conclusive. Therefore, we have analysed the *rbcL* transcripts by northern hybridizations. As shown in Figure 3B, the *rbcL* mRNA level does not change significantly in *sig3* plants. The *psbN* mRNA has been analysed in order to verify the microarray result. The result confirms that *psbN* transcription is indeed very much reduced in the *sig3* mutant.

The *psbT* sense and antisense mRNAs were analysed by primer extension, a method that is more sensitive than northern analysis (Figure 4). The localizations of the primers that have been used in these experiments is schematically indicated in Figure 4A. Primer extension analysis using primer (1), i.e. analysing *psbT*-antisense RNA, yields two different RNAs (~ 330 and ~ 140 bases) that are both absent in *sig3*

Table 1. Transcript analysis of plastid genes in *sig3* compared with WT plants

Gene name	Ratio <i>sig4</i> /WT	Gene name	Ratio <i>sig4</i> /WT	Gene name	Ratio <i>sig4</i> /WT
psbN	0.49 ± 0.46	ndhE	0.96 ± 0.25	petN	1.08 ± 0.21
atpH	0.64 ± 0.20	psaJ	0.97 ± 0.09	rps12	1.09 ± 0.33
atpA	0.72 ± 0.17	psbI	0.97 ± 0.15	rpl16	1.09 ± 0.03
atpE	0.75 ± 0.20	petL	0.97 ± 0.18	rpl22	1.09 ± 0.13
atpF	0.77 ± 0.32	psbT	0.98 ± 0.25	ycf2	1.09 ± 0.24
rpoC1	0.79 ± 0.13	ndhF	0.98 ± 0.22	rps 8	1.11 ± 0.04
rps18	0.80 ± 0.26	rpoC2	1.00 ± 0.45	ycf5	1.11 ± 0.45
rpoB	0.80 ± 0.52	psbK	1.00 ± 0.12	ndhB	1.12 ± 0.05
ndhH	0.85 ± 0.28	psbB	1.02 ± 0.36	rps4	1.12 ± 0.26
petA	0.87 ± 0.09	Rps7	1.02 ± 0.30	psbM	1.12 ± 0.43
rpl36	0.88 ± 0.11	clpP	1.02 ± 0.37	ndhJ	1.13 ± 0.41
psaC	0.91 ± 0.17	psbJ	1.02 ± 0.27	psaA	1.14 ± 0.43
rps14	0.91 ± 0.12	ndhD	1.02 ± 0.27	ycf1	1.15 ± 0.47
petB	0.91 ± 0.15	matK	1.03 ± 0.22	rps19	1.15 ± 0.50
atpB	0.91 ± 0.11	accD	1.03 ± 0.17	psbZ	1.17 ± 0.13
psbC	0.92 ± 0.33	rps14	1.04 ± 0.15	rpl33	1.18 ± 0.09
petG	0.92 ± 0.10	ndhG	1.04 ± 0.20	ndhK	1.20 ± 0.26
petD	0.92 ± 0.09	rpl20	1.04 ± 0.23	psbL	1.21 ± 0.25
cemA	0.92 ± 0.10	rpL23	1.05 ± 0.04	rps16	1.24 ± 0.64
rps11	0.92 ± 0.33	Rps15	1.05 ± 0.30	rps3	1.24 ± 0.26
ndhC	0.93 ± 0.26	rps2	1.05 ± 0.10	psbH	1.31 ± 0.05
psbE	0.94 ± 0.05	Ycf4	1.05 ± 0.54	ycf3	1.33 ± 0.31
rpl32	0.94 ± 0.22	psaI	1.05 ± 0.49	psbF	1.45 ± 0.39
rpl2	0.94 ± 0.15	psaB	1.07 ± 0.09	psbD	1.50 ± 0.63
rpoA	0.94 ± 0.14	ndhA	1.07 ± 0.27	psbA	2.07 ± 1.03
ndhI	0.96 ± 0.03	atpI	1.08 ± 0.15	rbcL	2.07 ± 1.44

Values have been obtained from three independent experiments, each one performed in two replicates.

plants (Figure 4B, left-hand side). From this result we can conclude that both of these RNAs are under the control of SIG3. The shorter of the two transcripts results from processing and the longer one is a primary transcript, as shown by 5'-RACE without or after treatment of mRNAs with tobacco acid pyrophosphatase [TAP, (39)] (Figure 4B, left-hand side, lanes 7 and 8). This means that the longer RNA corresponds to a *psbN/psbT*-antisense co-transcript, and the shorter one (i.e. the *psbT*-antisense RNA) results from processing of the long *psbN/psbT*-antisense co-transcript. The shorter RNA ends up in the intergenic region, between *psbT* and *psbN*. The exact cleavage site is shown in Figure 4C (upper lane). The processing event separates the *psbT*-antisense RNA from the *psbN* mRNA. Altogether, this experiment shows that transcription from the *psbN* promoter produces antisense RNA that covers the whole *psbT* reading frame and whose production is dependent on sigma factor 3.

Primer extension using primer (2) reveals two different RNAs having their 5' ends located either in the intergenic region of the *psbB* and the *psbT* genes (several transcripts ~154 bases) or within the coding region of the *psbB* gene (~345 bases). Both RNAs are present in WT as well as in *sig3* plants (Figure 4B, right-hand side, lanes 5 and 6). The ~154 bases transcripts diverge between the last 6 nt at the 5' end. These RNAs could be processing intermediates of the larger RNA. But the sequence upstream of these mRNAs reveals two possible NEP promoter consensus sequences, underlined in Figure 4C, that could also be responsible for transcription initiation of RNAs starting at different, closely situated, sites.

DISCUSSION

In the present paper, we have analysed plastid gene expression in two different SIG3 T-DNA insertion mutants that had been obtained from the SALK collection. Plastid mRNAs have been characterized by three different methods. At first, RNA levels of all plastid mRNA coding genes have been monitored by hybridization on a plastid specific microarray and in a second step, selected mRNAs have been analysed in more detail either by northern or by primer extension experiments. In each analysis, RNAs prepared from *sig3* mutants have been compared to RNAs obtained from WT plants.

Microarray analysis revealed only two significantly reduced mRNAs in *sig3* plants, i.e. *psbN* and *atpH* (Table 1). These two mRNAs have been further characterized by primer extension, a method that allows localization of the 5' ends of the corresponding precursor RNAs (Figure 2A and B). This analysis shows that the *psbN* gene is under control of a single promoter that is specifically recognized by SIG3-PEP holoenzyme. The promoter sequence of the SIG3-specific PEP promoter of *psbN* is shown in Figure 3 (upper line). The -10 sequence is remarkably rich in adenine, while the -35 element harbours the consensus TTG triplet. On the other hand, the *atpH* gene is transcribed from two different promoters. The presence of two different promoters explains why the *atpH* mRNA is less reduced in *sig3* mutants than the *psbN* mRNA. Only the minor, longer, *atpH* RNA (-413) is under control of SIG3-PEP holoenzyme.

The comparison of the two different SIG3-specific promoter sequences reveals similarities in an extended -35 region, in the region between the -10 and -35 consensus elements and immediately upstream of the transcription start site. The -10 consensus element is less conserved (Figure 2D). The question of what makes the specificity of SIG3 to these promoters cannot be answered by simple sequence comparison and represents a challenge for future work. The same holds true for other sigma factor/promoter interactions such as SIG2/*psaJ* (25), SIG2/*trnE-V-M* and Q (24), SIG4/*ndhF* (31) and SIG5/*psbD* BLRD (27). At a first glance, the specificity of SIG3 reported here for the *psbN* gene promoter seems to be in contradiction with previous publications showing recognition of the *psbA* and *rbcL* promoters by SIG3 (15,23). However, these experiments have been made using *in vitro* transcription conditions without sigma competition. Similar results showing sigma specificity *in vivo* under competitive conditions and apparently less specificity under non-competitive conditions are also reported for SIG2 with respect to the *psbA* promoter (15,23,25,27). In addition to redundant action of sigma factors under non-competitive conditions we can also not exclude that additional SIG3-specific promoters exist in the multiple promoter regions that precede many of the plastid transcription units. Some of these promoters might be more easily revealed in other developmental or environmental situations than used in our studies. On the other hand, the absence of one sigma factor might be compensated by overexpression of other sigma factors that might initiate from another PEP promoter within the same promoter region thus compensating the lack of one sigma factor for the overall transcription of a given gene. In such case, no change will be detectable by microarray analysis.

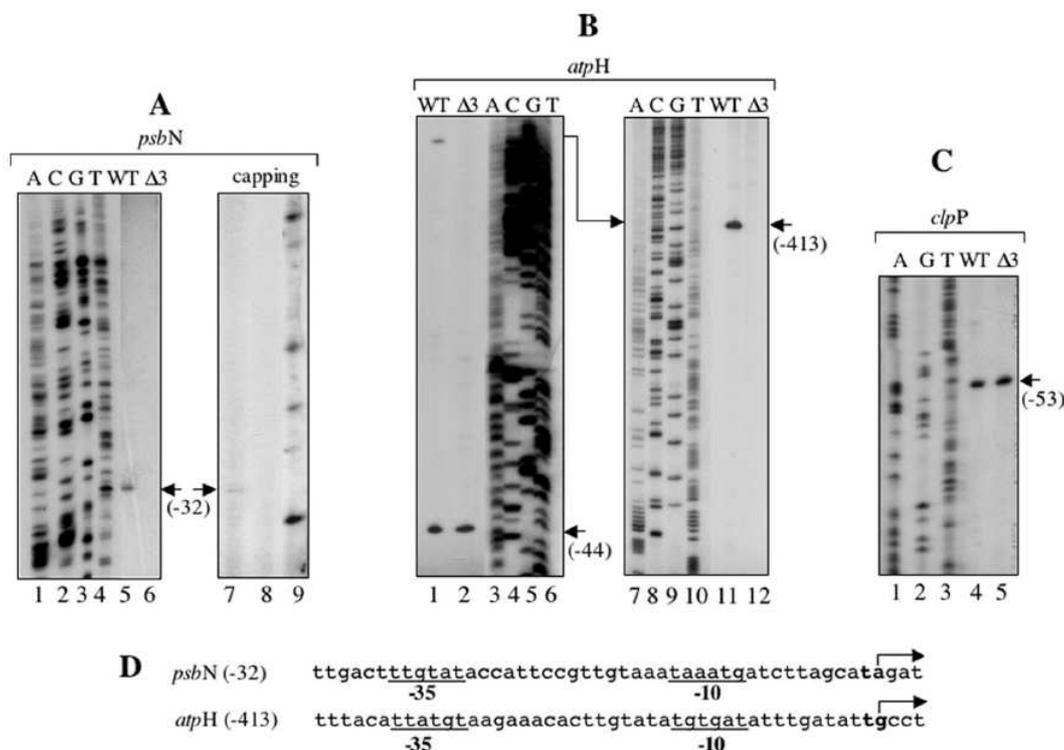


Figure 2. Analyses of *psbN*, *atpH* and *clpP* precursor RNAs. Total RNA was prepared from 6-day-old *Arabidopsis* WT and *sig3* ($\Delta 3$) plantlets, RNA was either reverse transcribed and cDNAs were separated on 6% denaturing polyacrylamide gels (*psbN*, *atpH* and *clpP*) or in addition 5'-labelled by guanylyltransferase and analysed after RNase protection (*psbN*). The accompanying sequence ladders have been prepared using the same primers as for primer extension. (A) Primer extension analysis of *psbN* mRNA from WT (lane 5) and *sig3* (lane 6) plantlets and analysis of the -32 transcript by *in vitro* capping (lanes 7-9). Capped RNA was analysed either directly (lane 9) or after RNase digestion without (lane 8) and after prior hybridization to *psbN* complementary riboprobe (lane 7). (B) Primer extension analyses of *atpH* mRNA prepared from WT and *sig3* ($\Delta 3$) plantlets using a primer that is located within the *atpH* coding region (lanes 1 and 2) or a primer located within the 5'-non-coding region (lanes 11 and 12). (C) Primer extension analysis of *clpP* mRNA from WT (lane 4) and *sig3* (lane 5) plantlets. (D) The nucleotide sequences upstream of the *psbN* (-32) and *atpH* (-413) precursor RNAs are shown. Transcription start sites are indicated by arrows and by boldface in the sequences. The -10 and -35 consensus sequences of the SIG3-specific *psbN* and *atpH* promoters are underlined.

Under our experimental conditions, there is only one gene on the plastid genome whose expression is remarkably reduced when SIG3/PEP is lacking. This is *psbN*. The function of the PsbN protein is still unknown. On the basis of antibody experiments it had been shown that PsbN is localized on the thylakoid membranes (40). However, the suggestion that PsbN represents one of the small proteins of photosystem II (PSII) has been recently contradicted by systematic sequencing of all PSII centre proteins (41). We have grown *sig3* plants under various light conditions (50-200 μmol of photons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 8 h/16 h dark/light cycle or continuous light), but we did not observe changes in the visible phenotype when compared with WT plants. The question of why evolution has conserved one sigma factor to regulate specifically the transcription of the *psbN* gene cannot be answered at the moment. The *psbN* gene expression might serve a regulatory function for the expression of the *psbB* operon that is located on the opposite DNA strand (see Figure 3A). The expression of the *psbB* operon has been extensively studied in *Euglena gracilis* (42), *Chlamydomonas reinhardtii* (43,44) and *Arabidopsis* (45-47). In fact, two different 5' leader segments

have been described in *Arabidopsis* for processed *psbH* transcripts, one of them overlapping with the 5' leader of the *psbN* transcript (45). The *psbN* mRNA might therefore influence the processing of the *psbH* mRNA. To verify this hypothesis we have analysed the expression pattern of the *psbB* operon in WT and *sig3* plants by northern hybridization and by primer extension (Figures 3B and 4B). Using these two methods, we could not detect changes in the processing pattern of the *psbB* operon in *sig3* plants. Equally, western blot analyses of protein extracts prepared from WT and *sig3* plants using commercially available antibodies against PsbB and PsbH proteins do not reveal remarkable differences (data not shown). Unfortunately, antibodies against the PsbT and PsbN proteins are not yet available in order to test also these two proteins.

Primer extension using a primer that starts at the ATG of the *psbT* gene to detect *psbT* antisense transcripts (primer 1 in Figure 4A and B) shows that the *psbN* mRNA extends at its 3' end at least up to the beginning of *psbT* thus covering the entire *psbT* gene as antisense RNA. Both mRNAs, *psbN* and *psbT*, could therefore be regulated by antisense RNA.

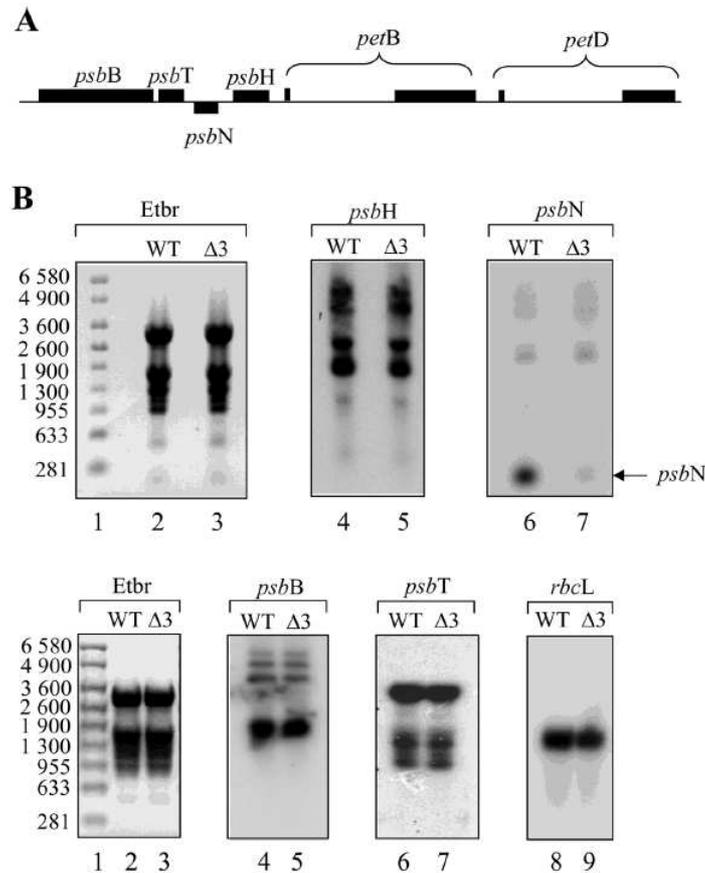


Figure 3. Analysis of the expression of the *psbN* gene and of the *psbB* operon by northern experiments. (A) Schematic representation of the *psbB* operon. (B) Gel blot hybridization of WT and *sig3* ($\Delta 3$) RNAs. Total RNA (10 μ g) of 6-day-old plantlets have been separated on denaturing agarose gels and stained directly by ethidium bromide (lanes 2 and 3, upper and lower panels) or RNA has been transferred to nitrocellulose and hybridized with probes corresponding to *psbH* (lanes 4 and 5, upper panel), *psbN* (lanes 6 and 7, upper panel), *psbB* (lanes 4 and 5, lower panel), *psbT* (lanes 6 and 7, lower panel) and *rbcL* (lanes 8 and 9, lower panel). Hybridization probes correspond to 32 P-labelled PCR fragments (*psbH*, *psbN*, *psbB* and *rbcL*) or to complementary riboprobe (*psbT*). Molecular weight markers are shown on the left-hand side.

Noteworthy, by specific transcription of the *psbN* gene, SIG3 could also regulate the expression of the *psbB* operon by producing *psbT* antisense RNA.

Primer extension analysis of the *psbT* sense RNAs revealed a yet unknown *psbT* transcript whose 5' end is located within the coding region of *psbB* (~345 bases, Figure 4A and B). It would be interesting to investigate whether this RNA results from transcription initiation or from processing. Initiation of the *psbT* mRNA within the *psbB* coding region would mean that under certain conditions both genes, *psbB* and *psbT*, need to be transcribed separately. On the other hand, processing of the polycistronic mRNA within the *psbB* coding region means inactivation of the *psbB* mRNA. Thus, our results indicate an additional, so far unknown, mode of regulation of the *psbB* operon, concerning especially the two proximal genes, *psbB* and *psbT*. The shorter *psbT* sense transcript (~154 bases, Figure 4A and B) ends up within the intergenic region between the *psbB* and *psbT* genes. The 5' ends of these transcripts extend over six bases that are located downstream

of two different potential NEP promoters. Thus, although cleavage of a dicistronic *psbB-psbT* mRNA is expected as part of processing of the polycistronic *psbB* precursor RNA we cannot exclude that the shorter *psbT* mRNA is produced by transcription initiation. It has recently been shown that antisense transcripts stabilize polyadenylated mRNA in chloroplasts (48). Therefore, it would be likely to assume that the absence of *psbN/psbT*-antisense RNA in *sig3* plants destabilized the *psbT* sense transcript. However, the quantity of the ~154 bases *psbT* sense transcripts in *sig3* plants is not significantly different from WT plants. Thus, regulation by antisense stabilization is not applicable at least not under the growth conditions that have been routinely used in the present work (i.e. 110 μ mol of photons $m^{-2} s^{-1}$). Experiments are actually in progress to analyse quantitative changes in *psbN* and *psbT* sense and antisense RNAs during plant growth and development and under specific stress conditions. We hope that these experiments will provide an idea under which conditions *psbT* antisense RNA regulation might be

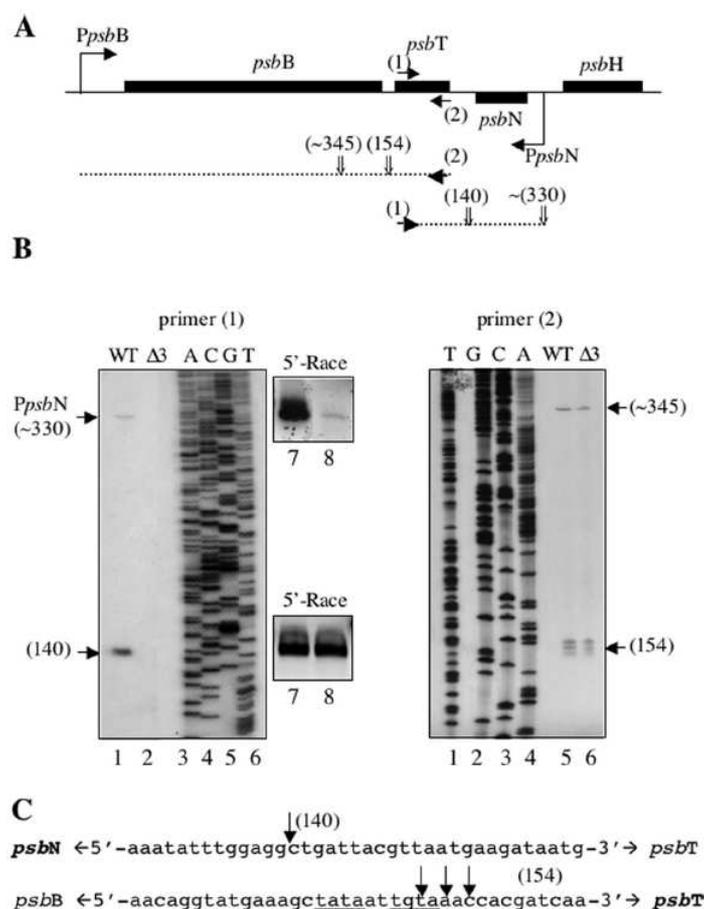


Figure 4. Transcript patterns of the *psbT* sense and antisense transcripts. (A) Schematic representation of part of the *psbB* operon. Primers that have been used for primer extension analyses are indicated by horizontal, closed, arrows and by numbers. RNAs that have been revealed by primer extension are indicated by dotted lines and processing sites are labelled by vertical, open, arrows. The unique *psbB* and *psbN* promoters are indicated as PpsbB and PpsbN. (B) Primer extension analyses of *psbT* sense and antisense RNAs. The *psbT* antisense RNA has been analysed using primer (1) and the *psbT* sense RNA (mRNA) has been analysed using primer (2). The sequence ladders have been established using the same primers as for primer extension. The 5' ends of the 140 and ~330 bases *psbN* transcripts have been analysed by 5'-RACE after (lane 7) and without (lane 8) TAP treatment of mRNAs. (C) Nucleotide sequences surrounding the cleavage sites between *psbN* sense and *psbT*-antisense RNA and the 5' end(s) of the shorter *psbT* mRNAs. Numbers indicate the distance from the 5' end of the primers.

important in plastids. The *psbT* protein has been shown to play a role in dimerization of PSII (49) and to be required for efficient repair of photodamaged PSII reaction centre (50). Environmental conditions that lead to photodamage of PSII might therefore be connected to a specific induction of PsbT protein expression, regulated by transcription from independent promoter(s) and/or by antisense RNA. It would be interesting to test such a hypothesis in the future. The *sig3* plants described here represent a powerful means to investigate on such type of regulation of the *psbB* operon, but also to elucidate the function of the *psbN* protein.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Data are available at NAR Online.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to S. Lemaille for his help in adaptation of the R computing software (<http://www.R.project.org/>) for our special purpose, to H. Pesey and E. Lambert for helpful technical assistance and to J.-P. Alcaraz for excellent sequencing service. Part of the work was financed by the European Community (FP6-2002-LifeSciHealth, PLASTOMICS, Proposal No. 503238). Funding to pay the Open Access publication charges for this article was provided by the European Community.

Conflict of interest statement. None declared.

REFERENCES

- Shiina, T., Tsunoyama, Y., Nakahira, Y. and Khan, M.S. (2005) Plastid RNA polymerase, promoters, and transcription regulators in higher plants. *Int. Rev. Cytol.*, **244**, 1–68.

2. Toyoshima, Y., Onda, Y., Shiina, T. and Nakahira, Y. (2005) Plastid transcription in higher plants. *Crit. Rev. Plant Sci.*, **24**, 59–81.
3. Filée, J. and Forterre, P. (2006) Viral proteins functioning in organelles: a cryptic origin? *Trends Microbiol.*, **13**, 510–513.
4. Zhou, D.-X., Quigley, F., Massenet, O. and Mache, R. (1989) Cotranscription of the S10- and spe-like operons in spinach chloroplasts and identification of three of their gene products. *Mol. Gen. Genet.*, **216**, 439–445.
5. Igloi, G.L. and Kössel, H. (1992) The transcriptional apparatus of chloroplasts. *Crit. Rev. Plant Sci.*, **10**, 525–558.
6. Bülow, S. and Link, G. (1988) Sigma-like activity from mustard (*Sinapis alba* L.) chloroplasts conferring DNA-binding and transcription specificity to *E. coli* core RNA polymerase. *Plant Mol. Biol.*, **10**, 349–357.
7. Lerbs, S., Brätting, E. and Mache, R. (1988) DNA-dependent RNA polymerase of spinach chloroplasts: characterization of α -like and σ -like polypeptides. *Mol. Gen. Genet.*, **211**, 459–464.
8. Tiller, K. and Link, G. (1993) Sigma-like transcription factors from mustard (*Sinapis alba* L.) etioplast are similar in size to, but functionally distinct from, their chloroplast counterparts. *Plant Mol. Biol.*, **21**, 503–513.
9. Isono, K., Shimizu, M., Yoshimoto, K., Niwa, Y., Satoh, K., Yokota, A. and Kobayashi, H. (1997) Leaf-specifically expressed genes for polypeptides destined for chloroplasts with domains of σ^{70} factors of bacterial RNA polymerases in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **94**, 14948–14953.
10. Tanaka, K., Tozawa, Y., Mochizuki, N., Shinozaki, K., Nagatani, A., Wakasa, K. and Takahashi, H. (1997) Characterization of three cDNA species encoding plastid RNA polymerase sigma factors in *Arabidopsis thaliana*: evidence for the sigma factors heterogeneity in higher plant plastids. *FEBS Lett.*, **413**, 309–313.
11. Tozawa, Y., Tanaka, K., Takahashi, H. and Wakasa, K. (1998) Nuclear encoding of a plastid factors in rice and its tissue- and light-dependent expression. *Nucleic Acids Res.*, **26**, 415–419.
12. Tan, S. and Troxler, F. (1999) Characterization of two chloroplast RNA polymerase sigma factors from *Zea mays*: photoregulation and differential expression. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **96**, 5316–5321.
13. Lahiri, S.D., Yao, J., McCumbers, C. and Allison, L.A. (1999) Tissue-specific and light-dependent expression within a family of nuclear-encoded sigma-like factors from *Zea mays*. *Mol. Cell. Biol. Res. Commun.*, **1**, 14–20.
14. Oikawa, K., Fujiwara, M., Nakazato, E., Tanaka, K. and Takahashi, H. (2000) Characterization of two plastid σ factors, SigA1 and SigA2, that mainly function in matured chloroplasts in *Nicotiana tabacum*. *Gene*, **261**, 221–228.
15. Homann, A. and Link, G. (2003) DNA-binding and transcription characterization of three cloned sigma factors from mustard (*Sinapis alba* L.) suggest overlapping and distinct roles in plastid gene expression. *Eur. J. Biochem.*, **270**, 1288–1300.
16. Fujiwara, M., Nagashima, A., Kanamaru, K., Tanaka, K. and Takahashi, H. (2000) Three new nuclear genes, *sigD*, *sigE* and *sigF*, encoding putative plastid RNA polymerase σ factors in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.*, **481**, 47–52.
17. Kanamaru, K., Fujiwara, M., Seki, M., Katagiri, T., Nakamura, M., Mochizuki, N., Nagatani, A., Shinozaki, K., Tanaka, K. and Takahashi, H. (1999) Plastidic RNA polymerase σ factors in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.*, **40**, 832–842.
18. Sushmita, S.D. and Allison, L. (2000) Complementary expression of two plastid-localized σ -like factors in maize. *Plant Physiol.*, **123**, 883–894.
19. Morikawa, K., Ito, S., Tsunoyama, Y., Nakahira, Y., Shiina, Y. and Toyoshima, Y. (1999) Circadian-regulated expression of a nuclear-encoded plastid sigma factor gene (*sigA*) in wheat seedlings. *FEBS Lett.*, **451**, 275–278.
20. Baginski, S., Tiller, K. and Link, G. (1997) Transcription factor phosphorylation by a protein kinase associated with chloroplast RNA polymerase from mustard (*Sinapis alba*). *Plant Mol. Biol.*, **34**, 181–189.
21. Baena-González, E., Baginsky, S., Mulo, P., Summer, H., Aro, E.-M. and Link, G. (2001) Chloroplast transcription at different light intensities. Glutathione-mediated phosphorylation of the major RNA polymerase involved in redox-regulated organellar gene expression. *Plant Physiol.*, **127**, 1044–1052.
22. Hakimi, M.-A., Privat, I., Valay, J.-G. and Lerbs-Mache, S. (2000) Evolutionary conservation of C-terminal domains of primary sigma⁷⁰-type transcription factors between plants and bacteria. *J. Biol. Chem.*, **275**, 9215–9221.
23. Privat, I., Hakimi, M.-A., Buhot, L., Favory, J.-J. and Lerbs-Mache, S. (2003) Characterization of *Arabidopsis* plastid sigma-like transcription factors SIG1, SIG2 and SIG3. *Plant Mol. Biol.*, **55**, 385–399.
24. Kanamaru, K., Nagashima, A., Fujiwara, M., Shimada, H., Shirano, Y., Nakabayashi, K., Shibata, D., Tanaka, K. and Takahashi, H. (2001) An *Arabidopsis* sigma factor (SIG2)-dependent expression of plastid-encoded tRNAs in chloroplasts. *Plant Cell Physiol.*, **42**, 1034–1043.
25. Nagashima, A., Hanaoka, M., Motohashi, R., Seki, M., Shinozaki, K., Kanamaru, K., Takahashi, H. and Tanaka, K. (2004) DNA microarray analysis of plastid gene expression in an *Arabidopsis* mutant deficient in a plastid transcription factor sigma, SIG2. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **68**, 694–704.
26. Tsunoyama, Y., Morikawa, K., Shiina, T. and Toyoshima, Y. (2002) Blue light specific and differential expression of a plastid σ factor Sig5 in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.*, **516**, 225–228.
27. Tsunoyama, Y., Ishizaki, Y., Morikawa, K., Kobori, M., Nakahira, Y., Takeba, G., Toyoshima, Y. and Shiina, T. (2004) Blue light-induced transcription of plastid-encoded *psbD* gene is mediated by a nuclear-encoded transcription initiation factor, AtSig5. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **101**, 3304–3309.
28. Nagashima, A., Hanaoka, M., Shikanai, T., Fujiwara, M., Kanamaru, K., Takahashi, H. and Tanaka, K. (2004) The multiple-stress responsive plastid sigma factor, SIG5, directs activation of the *psbD* blue light-responsive promoter (BLRP) in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.*, **45**, 357–368.
29. Yao, J., Roy-Chowdhury, S. and Allison, L.A. (2003) AtSig5 is an essential nucleus-encoded *Arabidopsis* σ -like factor. *Plant Physiol.*, **132**, 739–747.
30. Ishizaki, Y., Tsunoyama, Y., Hatano, K., Ando, K., Kato, K., Shinmyo, A., Kobori, M., Takeba, G., Nakahira, Y. and Shiina, T. (2005) A nuclear-encoded sigma factor, *Arabidopsis* SIG6, recognizes sigma-70 type chloroplast promoters and regulates early chloroplast development in cotyledons. *Plant J.*, **42**, 133–144.
31. Favory, J.-J., Kobayashi, M., Tanaka, K., Peltier, G., Kreis, M., Valay, J.-G. and Lerbs-Mache, S. (2005) Specific function of a plastid sigma factor for *ndhF* gene transcription. *Nucleic Acids Res.*, **33**, 5991–5999.
32. Morikawa, K., Shiina, T., Murakami, S. and Toyoshima, Y. (2002) Novel nuclear-encoded proteins interacting with a plastid sigma factor, Sig1, in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.*, **514**, 300–304.
33. R Development Core Team (2005) *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, ISBN 3-900051-07-0.
34. Donson, J., Fang, Y., Espiritu-Santo, S.A., Miyamoto, S., Armendarez, V. and Volkmoth, W. (2002) Comprehensive gene expression analysis by transcript profiling. *Plant Mol. Biol.*, **48**, 75–97.
35. Hajdukiewicz, P.T.J., Allison, L.A. and Maliga, P. (1997) The two RNA polymerases encoded by the nuclear and the plastid compartments transcribe distinct groups of genes in tobacco plastids. *EMBO J.*, **16**, 4041–4048.
36. Kohchi, T., Yoshida, T., Komano, T. and Ohya, K. (1988) Divergent mRNA transcription in the chloroplast *psbB* operon. *EMBO J.*, **7**, 885–891.
37. Westhoff, P. and Herrmann, R.G. (1988) Complex RNA maturation in chloroplasts: the *psbB* operon from spinach. *Eur. J. Biochem.*, **171**, 551–564.
38. Meurer, J., Berger, A. and Westhoff, P. (1996) A nuclear mutant of *Arabidopsis* with impaired stability on distinct transcripts of the plastid *psbB*, *psbD/C*, *ndhH*, and *ndhC* operons. *Plant Cell*, **8**, 1193–1207.
39. Kühn, K., Weihe, A. and Börner, T. (2005) Multiple promoters are a common feature of mitochondrial genes in *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Res.*, **33**, 337–346.
40. Ikeuchi, M., Inoue, Y. and Vermaas, W. (1995) Characterization of photosystem II subunits from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. In Mathis, P. (ed.), *Photosynthesis: from Light to Biosphere*. Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, The Netherlands, Vol. III, pp. 297–300.
41. Kashino, Y., Koike, H., Yoshio, M., Egashira, H., Ikeuchi, M., Pakrasi, H.B. and Satoh, K. (2002) Low-molecular-mass polypeptide

- components of a photosystem II preparation from the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus vulcanus*. *Plant Cell Physiol.*, **43**, 1366–1373.
42. Hong, L., Stevenson, J.K., Roth, W.B. and Hallick, R.B. (1995) *Euglena gracilis* chloroplast *psbB*, *psbT*, *psbH* and *psbN* gene cluster: regulation of *psbB-psbT* pre-mRNA processing. *Mol. Gen. Genet.*, **247**, 180–188.
43. Johnson, C.H. and Schmidt, G.W. (1993) The *psbB* gene cluster of the *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast: sequence and transcriptional analyses of *psbN* and *psbH*. *Plant Mol. Biol.*, **22**, 645–658.
44. Vaistij, F.E., Boudreau, E., Lemaire, S.D., Goldschmidt-Clermont, M. and Rochaix, J.-D. (2000) Characterization of Mbb1, a nucleus-encoded tetratricopeptide-like repeat protein required for expression of the chloroplast *psbB/psbT/psbH* gene cluster in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **19**, 14813–14818.
45. Felder, S., Meierhoff, K., Sane, A.P., Meurer, J., Driemel, C., Plücken, H., Klaff, P., Stein, B., Bechtold, N. and Westhoff, P. (2001) The nucleus-encoded *HCF107* gene of *Arabidopsis* provides a link between intergenic RNA processing and the accumulation of translation-competent *psbH* transcripts in chloroplasts. *Plant Cell*, **13**, 2127–2141.
46. Meierhoff, K., Felder, S., Nakamura, T., Bechtold, N. and Schuster, G. (2003) HCF152, an *Arabidopsis* RNA binding pentatricopeptide repeat protein involved in the processing of chloroplast *psbB-psbT-psbH-petB-petD* RNAs. *Plant Cell*, **15**, 1480–1495.
47. Sane, A.P., Stein, B. and Westhoff, P. (2005) The nuclear gene *HCF107* encodes a membrane-associated R-TPR (RNA tetratricopeptide repeat)-containing protein involved in expression of the plastidial *psbH* gene in *Arabidopsis*. *Plant J.*, **42**, 720–730.
48. Nishimura, Y., Kikis, E.A., Zimmer, S.L., Komine, Y. and Stern, D.B. (2004) Antisense transcript and RNA processing alterations suppress instability of polyadenylated mRNA in *Chlamydomonas* chloroplasts. *Plant Cell*, **16**, 2849–2869.
49. Iwai, M., Katoh, H., Katayama, M. and Ikeuchi, M. (2004) PSII-Tc protein plays an important role in dimerization of Photosystem II. *Plant Cell Physiol.*, **45**, 1809–1816.
50. Ohnishi, N. and Takahashi, Y. (2001) PsbT polypeptide is required for efficient repair of photodamaged Photosystem II Reaction Center. *J. Biol. Chem.*, **276**, 33798–33804.

Résumé

Trois ARN polymérase sont responsables de la transcription du génome plastidial. L'une d'entre elle, la PEP (Plastid-Encoded RNA Polymerase), est de type eubactérien et multimérique. Cette enzyme interagit avec des facteurs de transcription de type sigma au niveau des régions promotrices des gènes cibles. Chez *Arabidopsis thaliana*, six facteurs sigma sont codés par des gènes nucléaires et sont localisés dans les plastes.

Nous avons étudié la fonction du facteur sigma 3 (SIG3), à l'aide de mutants d'insertion d'ADN-T d'*Arabidopsis*. L'analyse du profil d'expression des gènes plastidiaux (transcriptome) par puce à ADN nous a permis de montrer que le complexe PEP-SIG3 transcrit spécifiquement le gène *psbN* et régule l'expression des gènes *atpH*, *atpA*, *atpE*, *atpF* et *atpB*.

Le gène *psbN* se trouve sur le brin opposé de l'opéron *psbB*, entre les gènes *psbT* et *psbH*. L'expression de *psbN* produit des ARNs antisens de *psbT*. Des expériences de protection à la RNase A/T1 nous permettent de suggérer que les transcrits sens et antisens de *psbT* forment *in vivo* un ARN double brin. Nous avons montré que chez le mutant *sig3*, le transcrit antisens de *psbT* est totalement absent alors que la protéine PsbT est plus abondante par rapport au sauvage. Ces résultats suggèrent que la formation d'un ARN double brin *psbT* sens/antisens diminue l'efficacité de la traduction de la protéine PsbT.

Ainsi, le complexe PEP-SIG3, en reconnaissant spécifiquement le promoteur du gène *psbN*, permet la synthèse de transcrits complémentaires à *psbT* ce qui constitue un outil de régulation de l'expression de la protéine PsbT.

Les gènes *atpH* et *atpB* font partie respectivement de l'opéron *atpI/atpH/atpF/atpA* et l'opéron *atpB/atpE*. En utilisant la spectinomycine, nous avons montré que l'expression des différents gènes codant les sous unités de l'ATP synthase plastidiale est exclusivement contrôlée par l'ARN polymérase plastidiale, PEP. Nous avons ensuite analysé l'expression de ces opérons dans le mutant *sig3*.

Le gène *atpH* code la sous unité CF0-III du complexe de l'ATP synthase, 5-12 fois plus abondante que les autres sous unités. Le gène *atpB* code la sous unité β du complexe CF1 de l'ATP synthase. Nous avons observé par puce à ADN chez la plante sauvage que l'accumulation de l'ARNm *atpH* est 5 à 12 fois plus importante que les autres transcrits codant les sous unités de l'ATP synthase. Nous avons montré que l'ARNm *atpH* est produit soit par co-transcription des gènes *atpI/atpH* soit par transcription à partir d'un promoteur (*PatpH*-413) reconnu par le complexe PEP-SIG3. Nous suggérons ainsi que le complexe PEP-SIG3 pourrait participer par la régulation transcriptionnelle de l'expression du gène *atpH* à l'établissement de la stœchiométrie de l'ATP synthase plastidiale chez *Arabidopsis thaliana*.

Par contre, l'opéron *atpB/atpE* est transcrit à partir de deux promoteurs : *PatpB* -520 et *PatpB* -467. Seul le promoteur *PatpB* -467 est sous le contrôle du facteur SIG3. Ces résultats suggèrent donc que le facteur SIG3 régule de manière plus atténuée l'expression de l'opéron *atpB/atpE*.

