



HAL
open science

Détermination des fonctions des protéines FtsZ dans la division et la biogenèse des plastes de plantes supérieures par la caractérisation des mutants FtsZ d'*Arabidopsis thaliana*.

Mohamed Karamoko

► **To cite this version:**

Mohamed Karamoko. Détermination des fonctions des protéines FtsZ dans la division et la biogenèse des plastes de plantes supérieures par la caractérisation des mutants FtsZ d'*Arabidopsis thaliana*.. Biologie végétale. Université de Grenoble, 2008. Français. NNT : . tel-00708839

HAL Id: tel-00708839

<https://theses.hal.science/tel-00708839>

Submitted on 15 Jun 2012

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.

**UNIVERSITE GRENOBLE I – JOSEPH FOURIER
U.F.R. DE BIOLOGIE
Ecole Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER

Discipline : BIOLOGIE

Présentée et soutenue publiquement

Par

MOHAMED KARAMOKO

Le 04 AVRIL 2008

Titre :

**Détermination des fonctions des protéines FtsZ dans la division et
la biogenèse des plastes de plantes supérieures par la
caractérisation des mutants *FtsZ d'Arabidopsis thaliana***

Directeur de thèse : Denis FALCONET

Composition du jury

| | |
|---------------------------|------------|
| Mme Christelle Breton | Présidente |
| Mme Catherine Bergounioux | Rapporteur |
| Mr Christophe d'Hulst | Rapporteur |
| Mme Silva Lerbs-Mache | Invitée |
| Mr Denis Falconet | Examineur |

Thèse préparée dans le laboratoire Plastes et Différenciation Cellulaire
UJF-CNRS FRE 3017

Remerciements

Tout d'abord, un grand merci à Denis. J'ai passé trois années formidables sous ta direction. Merci pour tout, ton aide, tes conseils, tes coups de gueule. Merci pour ta confiance. Si c'était à refaire, je signerais les yeux fermés.

Je remercie le Dr. Silva LERBS-MACHE de m'avoir accueilli dans son équipe et d'avoir accepté de juger mon travail. Je remercie également le Prof. Michel HERZOG pour m'avoir accueilli au laboratoire de Génétique Moléculaire des Plantes.

Merci au Dr. Catherine BERGOUNIOUX et au Prof. Christophe D'HULST d'avoir accepté de juger mon travail. Je remercie le Prof. Christelle BRETON d'avoir accepté de présider le Jury de soutenance.

Je remercie le Professeur Régis MACHE pour sa sympathie et sa disponibilité. Je remercie également le Professeur Paul MANDARON pour ses qualités humaines, et pour sa contribution précieuse à ce travail.

Je remercie Isabelle PAINTRAND, Marie-France MARAIS et Jean Luc PUTAUX (Cermav) Maryse BLOCK, Catherine ALBRIEUX et Didier GRUNWALD, (PCV et CEA, Grenoble) pour leur collaboration dans ce travail.

Un merci spécial à Edouard BOEX-FONTVIEILLE le jeune « padaone » de la science.

Je remercie aussi tous les autres membres de l'équipe Transcription plastidiale: Florence COURTOIS, Livia MERENDINO, Jean-Gabriel VALAY, Emeline LAMBERT.

Enfin, merci à tous les autres membres du Laboratoire plastes et différenciation cellulaire que j'ai toujours sollicité pour un conseil ou un avis scientifique : Anne Marie LABOURE, Marcel KUNTZ, Stéphane LOBREAUX, Jean Pierre ALCARAZ, Gilles VACHON, Daniel PERAZZA, Gabrielle TIGHTINSKY, Joël GAFFE, Eliane CHARPENTIER, Abderrahim LAHROUSSI, France ALEXANDRE.

Un méga-gigantesque merci à toute la bande de collègues et amis : Edouard BOEX-FONTVIEILLE, Damien NISSOU, Emilie DEMARSY, Wafa ZGHIDI, Mustafa MALIK GHULAM, Iga SAMOL, Claudia ROSSIG, Frank BUHR, Maryam SHAHBAZI, Abir YOUSSEF, Frédéric LAPORTE, Florian CHEVALIER.

Je remercie le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique et l'Ambassade de Côte d'Ivoire en France qui m'ont financé pendant ce travail de thèse.

Un immense merci à ma mère qui m'a toujours encouragé dans cette voie et qui a su me conseiller. Je remercie également mon épouse qui a su me calmer, me recadrer et me soutenir. Merci pour tout ce que vous m'avez donné.

TABLE DES MATIERES

| | |
|---|-----------|
| ABREVIATIONS | 6 |
| INTRODUCTION | 7 |
| 1. ORIGINE DES PLASTES..... | 10 |
| 2. ETUDES SUR LES PLASTES ET LA DIVISION DES PLASTES | 12 |
| 2.1. <i>Observations de plastes en division</i> | 12 |
| 2.2. <i>Observation de l'anneau de division</i> | 15 |
| 2.3. <i>L'approche génétique de la division des plastes</i> | 18 |
| 3. L'APPAREIL DE DIVISION DES PLASTES | 19 |
| 3.1. <i>L'appareil de division d'origine endosymbiotique</i> | 21 |
| 3.1.1. La protéine FtsZ et la protéine associée ARC6..... | 21 |
| 3.1.2. Les protéines topologiques Min | 25 |
| 3.1.3. Les régulateurs indirects ARC3 et GC1 de formation de l'anneau Z..... | 27 |
| 3.2. <i>L'appareil de division provenant de la cellule hôte</i> | 29 |
| 4. L'ASSEMBLAGE DE L'APPAREIL DE DIVISION | 30 |
| 5. MUTANTS AFFECTES DANS LA DIVISION DES PLASTES..... | 33 |
| 6. PRESENTATION DU SUJET DE THESE | 35 |
| MATERIELS ET METHODES | 36 |
| 1. MATERIELS ET OUTILS INFORMATIQUES | 36 |
| 1.1. <i>Matériel végétal</i> | 36 |
| 1.2. <i>Souches de bactéries</i> | 36 |
| 1.3. <i>Vecteurs de clonage</i> | 37 |
| 1.4. <i>Oligonucléotides</i> | 38 |
| 1.5. <i>Outils informatiques</i> | 38 |
| 2. METHODES | 39 |
| 2.1. <i>Méthodes concernant les plantes</i> | 39 |
| 2.1.1. Cultures en condition stérile d' <i>Arabidopsis thaliana</i> | 39 |
| 2.1.2. Culture en terre ou avec vermiculite | 39 |
| 2.1.3. Les croisements chez <i>Arabidopsis thaliana</i> | 40 |
| 2.1.4. Transformation stable d' <i>Arabidopsis thaliana</i> | 41 |
| 2.1.5. Dosage des pigments des feuilles d' <i>Arabidopsis thaliana</i> par HPLC | 42 |
| 2.1.6. Mesure de l'efficacité du photosystème II (PSII) | 42 |
| 2.2. <i>Purification et fractionnement des chloroplastes</i> | 43 |
| 2.2.1. Purification de chloroplastes intacts..... | 43 |
| 2.2.2. Fractionnement des chloroplastes | 44 |
| 2.2.3. Isolation des grains d'amidon | 44 |
| 2.3. <i>Méthodes concernant l'ADN</i> | 45 |
| 2.3.1. Extraction d'ADN à partir de plantes pour analyse PCR..... | 45 |
| 2.3.2. Electrophorèse sur gel d'agarose..... | 45 |
| 2.3.3. Purification des fragments d'ADN issus de gels d'agarose | 45 |
| 2.3.4. Digestion de l'ADN par des enzymes de restriction | 46 |
| 2.3.5. Ligation de deux fragments d'ADN..... | 46 |
| 2.3.6. Transformation des bactéries chimio-compétentes | 46 |
| 2.3.7. Transformation par électroporation..... | 47 |
| 2.3.8. Extraction de l'ADN plasmidique | 47 |
| 2.3.9. Maxi préparation de plasmides | 48 |
| 2.3.10. Réactions d'amplification en chaîne (PCR)..... | 49 |
| 2.3.11. Séquençage d'ADN..... | 49 |

| | |
|--|----|
| 2.4. Analyse de l'ADN génomique des plantes par hybridation moléculaire | 50 |
| 2.4.1. Extraction de l'ADN génomique par CTAB | 50 |
| 2.4.2. Digestion enzymatique de l'ADN | 50 |
| 2.4.3. Transfert sur membrane | 51 |
| 2.4.4. Marquage radioactif d'un fragment d'ADN par amorçage au hasard..... | 51 |
| 2.4.5. Pré-hybridation et hybridation des filtres..... | 52 |
| 2.4.6. Lavage et autoradiographie des filtres | 52 |
| 2.5. Méthodes concernant les ARN | 53 |
| 2.5.1. Extraction des ARN d' <i>Arabidopsis thaliana</i> | 53 |
| 2.5.2. Gel d'agarose dénaturant pour ARN | 54 |
| 2.5.3. Reverse transcription..... | 54 |
| 2.6. Méthodes concernant les protéines | 54 |
| 2.6.1. Dosage des protéines | 54 |
| 2.6.2. Concentration des protéines | 55 |
| 2.6.3. Extraction des protéines au phénol..... | 55 |
| 2.6.4. Extraction rapide des protéines | 56 |
| 2.6.5. Electrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) | 56 |
| 2.6.6. Détection des protéines | 56 |
| 2.7. Analyse de la topologie membranaire..... | 57 |
| 2.7.1. Décrochage des protéines des thylacoïdes intacts..... | 57 |
| 2.7.2. Traitements des thylacoïdes intacts par la thermolysine..... | 58 |
| 2.8. Extraction des protéines internes et externes du grain d'amidon..... | 58 |
| 2.9. Surproduction des protéines dans <i>E. coli</i> | 59 |
| 2.10. Purification des protéines | 59 |
| 2.10.1. Purification sur colonne d'affinité Ni-NTA Agarose..... | 59 |
| 2.10.2. Utilisation de la FPLC (Fast Performance Liquid Chromatography) | 60 |
| 2.11. Méthodes immunologiques..... | 61 |
| 2.11.1. Obtention d'anticorps | 61 |
| 2.11.2. Purification des anticorps FtsZ1 et FtsZ2 par immunoaffinité sur colonne affigel | 61 |
| 2.11.3. Purification sur colonne affigel 102 (Bio-Rad)..... | 61 |
| 2.11.4. Western blots..... | 63 |
| 2.12. Méthodes concernant la microscopie..... | 63 |
| 2.12.1. Préparation des tissus : fixation, inclusion et coupes pour la microscopie photonique | 63 |
| 2.12.2. Fixation puis inclusion dans l'Epon pour la microscopie électronique | 64 |
| 2.12.3. Ultramicrotomie | 65 |
| 2.12.4. Immuno-détection avec les anticorps sur coupe | 65 |

CHAPITRE I..... 66

**L'association des protéines de division FtsZ1 avec les thylacoïdes
des chloroplastes est régulée au cours du développement
chez *Arabidopsis thaliana***

| | |
|-------------------|----|
| CHAPITRE II | 77 |
|-------------------|----|

Caracterisation des mutants *FtsZ2*

| | |
|--|-----|
| 1. CARACTERISATION DES MUTANTS <i>FtsZ21</i> ET <i>FtsZ22</i> | 77 |
| 1.1. Criblage des plantes mutantes <i>FtsZ21</i> et <i>FtsZ22</i> | 77 |
| 1.2. Expression des protéines <i>FtsZ</i> chez les plantes mutantes <i>FtsZ21</i> et <i>FtsZ22</i> | 80 |
| 1.3. ETUDES MORPHOLOGIQUES DES PLANTES MUTANTES <i>FtsZ21</i> ET <i>FtsZ22</i> | 82 |
| 1.4. Observation par microscopie confocale des plantes <i>FtsZ21</i> | 83 |
| 1.5. Observation par microscopie confocale des plantes <i>FtsZ22</i> | 84 |
| 1.6. Complémentation des phénotypes mutants <i>FtsZ21</i> et <i>FtsZ22</i> | 86 |
| 1.7. Observation des ultrastructures des chloroplastes des plantes <i>FtsZ21</i> et <i>FtsZ22</i> | 89 |
| 1.8. Caractérisation des doubles mutants et du triple mutant | 90 |
| 1.8.1. Obtention des doubles mutants et du triple mutant | 90 |
| 1.8.2. Expression des protéines dans les doubles mutants et le triple mutant..... | 90 |
| 1.8.3. Morphologie des doubles mutants et du triple mutant | 91 |
| 1.8.5. Observation des ultrastructures par microscopie électronique des chloroplastes des doubles mutants et du triple mutant | 94 |
| 2. LOCALISATION DES PROTEINES <i>FtsZ2</i> CHEZ <i>ARABIDOPSIS</i> | 96 |
| 2.1. La protéine <i>FtsZ2</i> est associée aux thylacoïdes en plus d'être présente dans le stroma..... | 96 |
| 2.2. Topologie et régulation de l'association de <i>FtsZ2</i> aux thylacoïdes en fonction du stade de développement de la plante..... | 97 |
| 2.3. Localisation des isoformes <i>FtsZ2</i> dans les thylacoïdes d' <i>Arabidopsis</i> | 99 |
| 3. CONCLUSION | 100 |

| | |
|-------------------|-----|
| CHAPITRE III..... | 102 |
|-------------------|-----|

Les protéines *FtsZ* sont elles impliquées dans le métabolisme de l'amidon ?

| | |
|---|-----|
| 1. INTRODUCTION | 102 |
| 2. L'AMIDON DANS LES MUTANTS <i>FtsZ</i> D' <i>ARABIDOPSIS</i> | 102 |
| 3. EXPRESSION DES PROTEINES <i>FtsZ</i> LORS DE LA TRANSITION PROPLASTE-AMYLOPLASTE DANS LES CELLULES BY-2 DU TABAC..... | 104 |
| 3.1. Choix du matériel biologique | 104 |
| 3.2. La transition proplaste-amyloplaste | 104 |
| 3.3. Expression des protéines <i>FtsZ</i> lors de la transition proplaste-amyloplaste | 105 |
| 4. CONCLUSION | 107 |

| | |
|---------------------------|-----|
| CONCLUSION GENERALE | 108 |
|---------------------------|-----|

| | |
|------------------|-----|
| REFERENCES | 112 |
|------------------|-----|

ABREVIATIONS

| | |
|--------------------|--|
| ADN | acide désoxyribonucléotidique |
| ADNc | acide désoxyribonucléotidique complémentaire |
| ARNm | acide ribonucléotidique messenger |
| ATP | adénosine 5'-triphosphate |
| BrET ou BET | bromure d'éthidium |
| Da | dalton |
| 2,4-D | dichlorophénoxyacétique acide |
| DO | densité optique |
| DATP | désoxyadénosine 5'-triphosphate |
| DCTP | désoxycytidine 5'-triphosphate |
| DGTP | désoxyguanine 5'-triphosphate |
| DTTP | désoxythymidine 5'-triphosphate |
| DNTP | désoxynucléotides triphosphate dATP, ou dACP, ou dGTP ou |
| DTT | dithiothréitol |
| DMSO | diméthylsulfoxyde |
| EDTA | éthylènediamine tétra-acétate |
| GFP | green fluorescent protein |
| GTP | guanosine 5'-triphosphate |
| H | heure |
| IPTG | isopropylthio-β-D-galactoside |
| kDa | kilodalton |
| L | litre |
| LB | milieu de <u>L</u> uria- <u>B</u> ertani |
| M | molaire |
| Min | minute |
| μl | microlitre |
| ml | millilitre |
| PAGE | électrophorèse en gel de polyacrylamide |
| Pb | paire de bases |
| PCR | Polymerase Chain Reaction |
| PM | Poids moléculaire |
| PMSF | phénylméthylsulfonylfluoride |
| P/V | poids à volume |
| PVP | polyvinylpyrrolidone |
| RNAse | Ribonucléase |
| rpm | rotation par minute |
| SAB ou BSA | sérum albumine de bœuf |
| SDS | sodium dodécyl sulfate |
| TCA | acide trichloroacétique |
| TEA | Tri Ethanol Amine |
| TEMED | N,N,N',N'4 tétraméthylènediamine |
| Tris | tris -(hydroxyméthyl) aminométhane |
| UV | ultra-violet |
| V/V | volume à volume |
| WT | wild-type (sauvage) |

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Peu de gens connaissent l'origine de cet organite que l'on appelle chloroplaste, et dont la présence est indispensable à la vie sur notre planète (Figure 1).



Figure 1. Un monde sans chloroplaste (à gauche) et avec chloroplastes (à droite)

Les chloroplastes ont été certainement observés pour la première fois au XVII^{ème} siècle par Nehemiah Grew en Angleterre et Anthony van Leewenhoeck aux Pays-Bas (Gunning et al., 2006). Ce n'est cependant, que vers le milieu du XIX^{ème} siècle, que deux microscopistes français, Jean-Baptiste Arthur Gris et Adolphe Lucien Trécul ont dessiné et publié les premiers chloroplastes appelés vésicules (Gris, 1857; Trécul, 1858). Le terme *plaste* a ensuite été introduit par Schimper (Schimper, 1883) pour définir une catégorie d'organites de la cellule végétale. Schimper a également classé les *plast*es en différents groupes (chloroplastes, leucoplastes et chromoplastes) et a suggéré que les deux derniers types proviennent de la transformation de chloroplastes (Figure 2). Concomitamment aux observations des chloroplastes, le concept de continuité des *plast*es qui stipule que ceux-ci ne sont pas créés *de novo*, mais naissent à partir de *plast*es préexistants a été énoncé. Ce concept fait suite aux travaux menés sur le développement des algues (Nägeli, 1846; Schmitz, 1883) et a ensuite été étendu aux plantes supérieures (Meyer, 1883; Schimper, 1883; Schimper, 1885). Mais, c'est sans aucun doute à Constantin Mereschkowsky, un botaniste russe, que l'on doit au début du XX^{ème} siècle la démonstration la plus convaincante de l'origine endosymbiotique des chloroplastes (Mereschkowsky, 1905).

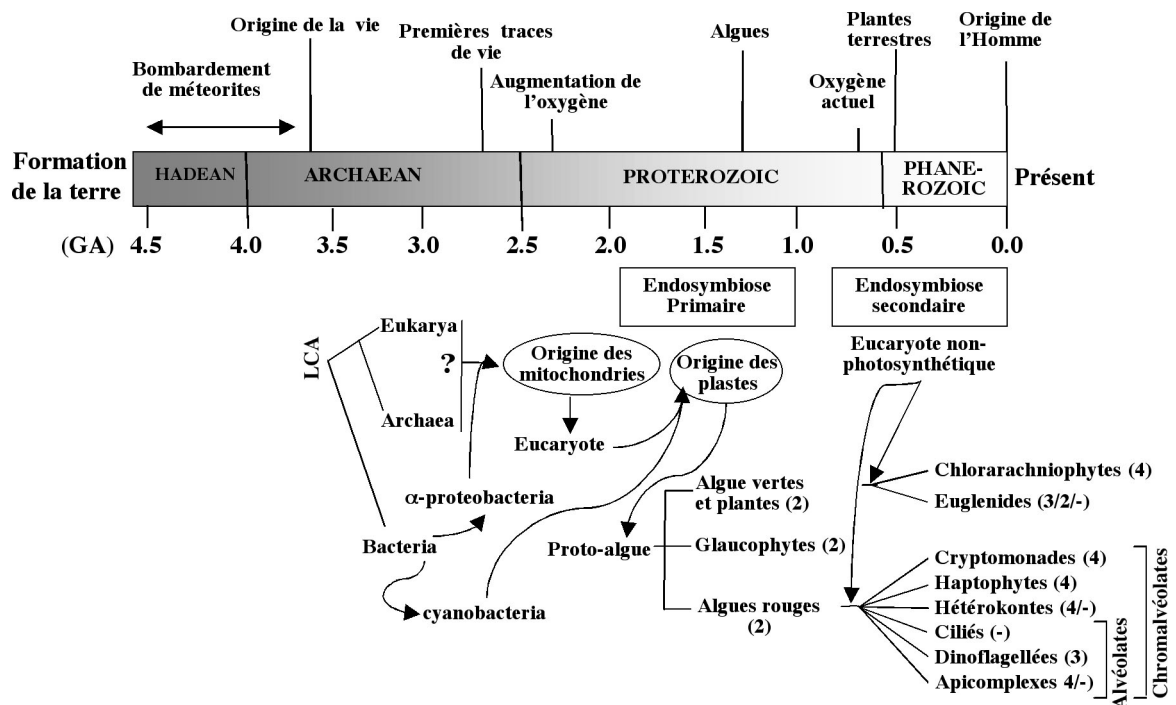


Figure 2. Evolution des plastes à l'échelle géologique. L'ancêtre commun LCA (Last common ancestor), a existé vers 3,5 milliards d'années (3.5 GA) et l'origine des cyanobactéries peut être datée vers 2,7 GA. L'endosymbiose entre l'ancêtre des α -protéobactéries actuelles et une cellule hôte (Archaea ou Eukarya, ce qui reste encore à déterminer avec certitude, d'où le point d'interrogation) s'est produite il y a environ 2,2 GA, et a donné naissance à toutes les cellules eucaryotes. L'événement endosymbiotique entre un eucaryote (avec des mitochondries) et une cyanobactérie s'est produit entre 1,6 et 0,6 GA et a donné naissance aux plastes primaires d'algues rouges, vertes et brunes (glaucophyte), tous entourés de deux membranes. Des endosymbioses ultérieures entre les algues vertes ou rouges, avec une autre cellule eucaryote non photosynthétique, a donné naissance à une variété d'organismes dont les plastes sont entourés par un nombre variable de membranes (indiqués entre parenthèses).

La démonstration de Mereschkowsky reposait sur trois éléments de preuve connus à l'époque: (1) le principe de la symbiose, déjà énoncé pour désigner la coexistence de deux organismes distincts, (2) les observations que les chloroplastes se divisent et la notion de continuité des plastes, et (3) la ressemblance entre les cyanobactéries et les plastes. Après Mereschkowsky, le rôle de la symbiose dans l'évolution a été énoncé par quelques auteurs (Portier, 1918; Wallin, 1927), mais en l'absence d'arguments plus convaincants, l'idée a été

presque universellement rejetée pour une longue période et ce en particulier après les écrits de (Lumière, 1919).

Au cours des décennies suivantes, grâce au développement des techniques de microscopie, les études sur la structure des chloroplastes ont remarquablement progressé. En 1935, les premières microphotographies montrant les granas dans les chloroplastes, par observation en microscopie photonique, ont été publiées (Doutreligne, 1935) et la structure du grana décrite (Heitz, 1936). Cinq ans plus tard, les premières observations de chloroplastes, grâce à la microscopie électronique, ont été rapportées (Kausche and Ruska, 1940; Menke, 1940). Ces études ont été suivies par de nombreuses observations révélant la structure interne des différents types de plastes (Steahelin, 2003). L'observation de l'ADN dans le chloroplaste avec la microscopie électronique a ensuite été publiée (Ris and Plaut, 1962), suivie un an plus tard, par un rapport similaire concernant l'observation de l'ADN dans les mitochondries (Nass and Nass, 1963).

Toutes ces études ont conduit à la renaissance de la théorie endosymbiotique, qui a été de nouveau popularisée en 1967 par Lynn Margulis (Sagan, 1967). Suite aux progrès obtenus dans les domaines aussi variés que la microbiologie, la biochimie et la génétique, il a été démontré à la fin des années 1960 et au début des années 1970 que les chloroplastes (et mitochondries) avaient beaucoup d'autres traits compatibles avec une origine endosymbiotique (Kirk and Tilney-Bassett, 1978). Enfin, le séquençage du génome d'*Arabidopsis thaliana* a montré que parmi les quelques 25 000 gènes nucléaires, environ 1 550 (Abdallah et al., 2000) à 4500 (Martin et al., 2002) gènes proviennent de la cyanobactérie d'origine. Ainsi, un grand nombre de gènes présents dans le plaste original ont été transférés dans le génome nucléaire au cours de l'évolution de la cellule eucaryote.

Les études poursuivies sur la division des plastes ont confirmé cette origine endosymbiotique de l'organite. Une grande partie de ces progrès se fonde sur l'observation des chloroplastes en division et la révélation des anneaux de division. À la fin des années 1980 et au début des années 1990, une approche génétique a montré que la division des plastes est sous contrôle nucléaire. Le premier gène participant à la division des plastes, le gène *FtsZ*, a été identifié en 1995 par homologie avec les gènes impliqués dans la division des bactéries (Osteryoung and Vierling, 1995). Les résultats obtenus depuis cette découverte reflètent l'origine complexe de cet organite.

1. Origine des plastes

Des preuves géologiques semblent indiquer que les premières traces de vie datent de plus de 3,5 Ga (Giga année ou 10^9 années) (Nisbet and Sleep, 2001; Schopf, 2006). Cette vie serait apparue vers la fin des bombardements intenses que notre planète a subis et ce jusqu'à la fin de l'ère géologique Archaean précoce (Forterre and Gribaldo, 2007) (Figure 2). L'ancêtre universel commun (LCA, Last common Ancestor, ou Cenancestor) de toute vie terrestre (Woese, 1998; Forterre and Philippe, 1999; Doolittle, 2000; Poole and Penny, 2007a) a ensuite donné naissance aux trois règnes connus : Bacteria, Archaea et Eukarya. Vers 2,7 Ga, la concentration en oxygène dans l'atmosphère a commencé à augmenter, et l'analyse de roches de cette période montre la présence de cyanobactéries et sans doute de cellules eucaryotes (Brocks et al., 1999; Summons et al., 1999). Cette augmentation de l'oxygène dans l'atmosphère a permis l'apparition des premières cellules eucaryotes contenant des mitochondries. Cette origine est probablement due à l'invasion d'une cellule (Archea ou protoeucaryote, la nature de la cellule hôte est encore controversée (Esser and Martin, 2007; Poole and Penny, 2007b) par l'ancêtre d'une α -protéobactérie (Gray et al., 1999; Poole and Penny, 2007a). Toutes les cellules eucaryotes actuelles proviennent de cette cellule ancestrale qui a acquis une mitochondrie. Des études phylogénétiques et biochimiques sont en faveur d'une origine unique des plastes primaires. Ces plastes sont la conséquence d'une association symbiotique entre une cyanobactérie et la cellule eucaryote contenant des mitochondries, association qui s'est produite entre 1,6 et 0,6 Ga (Yoon et al., 2004; Cavalier-Smith, 2006). Au fil du temps, la bactérie symbiotique a été réduite à un plaste séparé du reste de la cellule par deux membranes : les membranes internes et externes de la cyanobactérie (Reumann et al., 2005; Block et al., 2007). Cette endosymbiose a donné naissance à une proto-algue, qui a ensuite généré trois lignées caractérisées par leurs pigments photosynthétiques: la lignée verte (Viridiplantae, les algues vertes et les plantes terrestres), la lignée rouge (Rhodophyta, les algues rouges) et la lignée bleue (Glaucophyta, les glaucophytes) (Delwiche, 1999; Moreira et al., 2000; Palmer, 2003; Bhattacharya et al., 2004; Dyall et al., 2004 et Martin et al., 2002; McFadden and van Dooren, 2004). Toutefois, des résultats récents chez l'amibe (*Paulinella chromatophora*) semblent indiquer une origine distincte du plaste dans cet organisme, relançant la sempiternelle question de l'origine unique ou non du plaste (Marin et al., 2005; Larkum et al., 2007). L'étape suivante, dans le processus d'évolution, a été la propagation des plastes par endosymbiose secondaire. Cette endosymbiose met cette fois-ci en scène le nouvel eucaryote photosynthétique qui a été phagocyté par une cellule eucaryote non

photosynthétique. Cet événement a pu se produire entre 1,2 et 0,55 Ga (Gibbs, 1978; Douglas, 1998; Archibald and Keeling, 2002; Bhattacharya et al., 2004; Yoon et al., 2004; Cavalier-Smith, 2006). Deux divisions d'algues (Chlorarachniophyte et Euglenophyta) ont ainsi acquis des plastides provenant d'algues vertes et quatre divisions (Cryptophyta, Haptophyta, Heterokontophyta et Haptophyta) ainsi qu'un embranchement parasitaire (Apicomplexa) ont acquis des plastides des algues rouges. Il est intéressant d'observer qu'un nucléomorphe, le vestige du noyau de l'algue, est toujours présent entre la deuxième et troisième membrane des plastides chez les Cryptophytes (Douglas et al., 1991) et les Chlorarachniophytes (McFadden et al., 1995). Pour plus de renseignements, on peut se référer aux articles suivants : (Keeling, 2004; Sato, 2006; Bhattacharya et al., 2007; Reyes-Prieto et al., 2007).

Chez les plantes supérieures, un degré de complexité est apparu avec la formation de différents types de plastides en fonction des tissus (Figure 3).

Ces événements symbiotiques sont à l'origine de l'explosion de toutes les formes de vie, en particulier des organismes autotrophes, au cours du phanérozoïque, rendant ainsi possible la vie pour les vertébrés terrestres, y compris les humains.

Les plastides des plantes supérieures

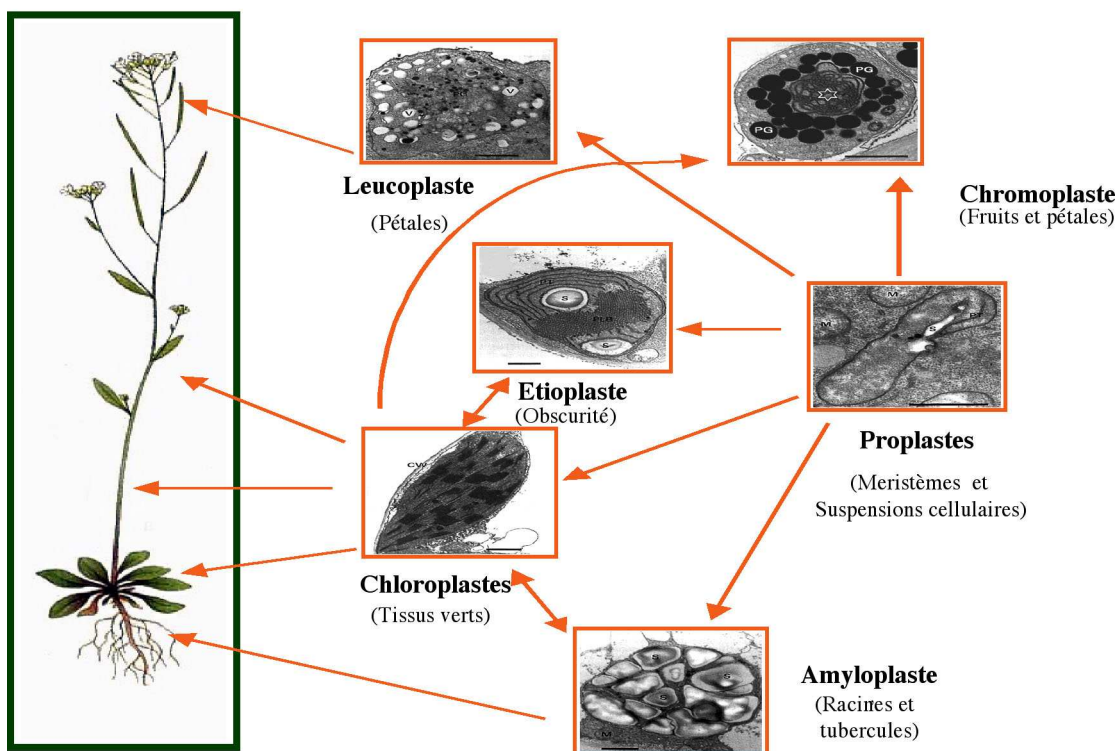


Figure 3. Les différents types de plastides dans les cellules de plantes supérieures.

2. Etudes sur les plastes et la division des plastes

2.1. Observations de plastes en division

Nos connaissances sur les plastes et la division des plastes sont directement liées aux progrès réalisés dans la compréhension des mécanismes de l'évolution et de la symbiose (Figure 4).

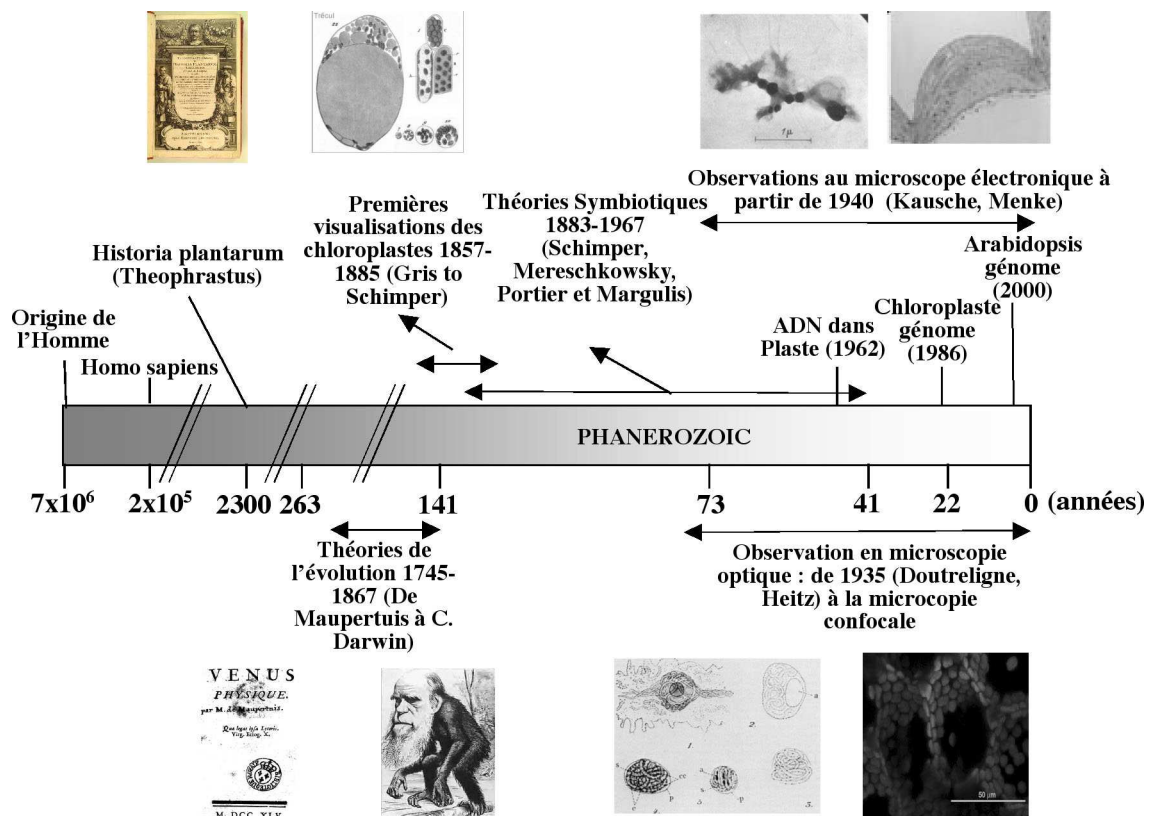


Figure 4. Progrès majeurs à l'échelle humaine dans la compréhension des plastes. L'origine des premiers hommes est datée à environ 7 millions d'années et celle d'*Homo sapiens* à environ 200 000 années. La première encyclopédie botanique connue, écrite par Théophrastus un disciple d'Aristote, date de 2 300 années. Les premières théories sur l'évolution remontent au XVIII^{ème} siècle et les premières descriptions de chloroplastes, ainsi que l'hypothèse de leur origine endosymbiotique ont été faites à partir du milieu du XIX^{ème} siècle. Des progrès majeurs ont été réalisés au XX^{ème} siècle grâce aux progrès techniques, en particulier dans les techniques d'observations (microscopie) et le séquençage des génomes.

Vers la fin du 18^{ème} siècle, des philosophes et des scientifiques ont suggéré que les organismes vivants pourraient avoir évolué progressivement. Parmi ces auteurs, on peut citer Emmanuel Kant dans "Kritik der Urtheilskraft" (Critique du jugement), publié en 1790, dans

lequel il affirme que l'analogie des formes animales implique une origine commune, et donc un parent commun. On peut aussi citer Erasmus Darwin (le grand-père de Charles Darwin), qui a émis l'hypothèse dans "Zoonomia or The Laws of Organic Life" (1792-1795) que tous les animaux à sang chaud descendent d'un seul "filament vivant".

Les idées d'Erasmus Darwin ont sans doute inspiré Lamarck, le premier scientifique à avoir développé une théorie de l'évolution en 1809 dans son livre "philosophie zoologique ou exposition des considérations apparentées à l'histoire naturelle des animaux". En 1859, vers la fin de son livre "L'origine des espèces par voie de sélection naturelle", Charles Darwin a écrit : "sans doute que tous les êtres organiques qui ont vécu sur cette terre sont les descendants de quelque forme primordiale, dans laquelle la vie a tout d'abord été insufflée. Dans cette courte phrase, Charles Darwin résume 3,5 Ga d'évolution organique, mais sans en connaître les mécanismes qui sous-tendent le processus d'évolution. Il faudra attendre encore un siècle pour être en mesure de déchiffrer ces mécanismes. En même temps que Charles Darwin écrivit son essai, les premières observations et dessins de chloroplastes dans la cellule ont été publiés (Gris, 1857; Trécul, 1858). Quelques décennies plus tard, (Schimper, 1883) suggérait dans une note en bas de page traduite en anglais (Martin and Kowallik, 1999) : "si on peut formellement confirmer que les plastes ne se sont pas créés *de novo* dans les cellules, la relation entre les plastes et les organismes au sein desquels ils sont présents serait la réminiscence d'une symbiose. Les plantes vertes doivent leur origine à l'union qui s'est faite entre un organisme sans pigment avec un organisme d'une seule couleur uniforme, teinté de chlorophylle". Un siècle plus tard, il est étonnant de constater que dans une telle déclaration, Schimper avait déjà compris que les plastes se divisent, et plus étonnant encore, qu'ils proviennent d'un autre organisme. C'est seulement un siècle plus tard, avec les œuvres de nombreux scientifiques, parmi eux Mereschkowsky, Portier et Margulis, et les progrès dans les techniques (microscopie, biologie cellulaire et moléculaire), que le rôle joué par la symbiose dans l'évolution sera largement accepté (pour une revue complète sur l'évolution par la symbiose voir Sapp, 1994).

La période des pionniers de la deuxième moitié du 19^{ème} siècle et du début du 20^{ème} siècle, a été suivie par une période creuse avec seulement quelques rapports concernant la division des chloroplastes et qui sont ici brièvement présentés. Les premières observations en microscopie photonique montrant des chloroplastes en division ont été faites sur des plantes allant des Bryophytes (Sharp, 1934) jusqu'au Angiospermes (Randolf, 1922; Kusunoki and Kawasaki, 1936; Dangeard, 1947). En 1941, on trouve dans une publication écrite par (Hollande and Hollande, 1941) la phrase suivante "les chloroplastes sont constitués de

corpuscules différenciés, indivis, libres, répartis dans le périplasme au contact direct duquel ils se trouvent. Ils ont une vie propre et sont aptes à se diviser". En 1949, Yuasa, en étudiant la structure du chloroplaste de *Selaginella savatieri*, une Pteridophyte, décrit le type amoéboïde de division du chloroplaste, en plus des trois types de division qui sont : les types de division ordinaires, longitudinaux et latéraux (Yuasa, 1949). Au début des années 1950, les travaux de Strugger montrent la division des proplastides et des chloroplastes et sont à l'origine de la renaissance de la théorie de Schimper et Meyer sur la continuité des plastides (Strugger, 1950) (Figure 5).

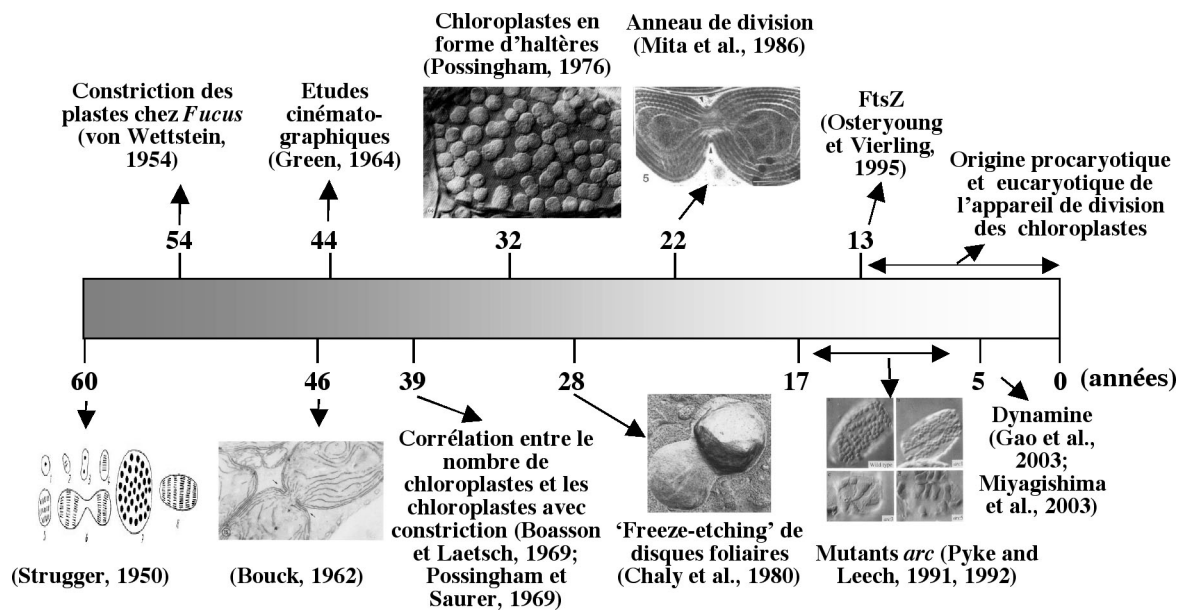


Figure 5. Progrès réalisés dans l'étude de la division des plastides au cours du dernier demi-siècle. Les découvertes majeures sur la division des plastides ont débuté avec l'observation de plastides présentant une constriction et la mise en évidence d'une corrélation entre le nombre de plastide présentant une constriction et le nombre de plastides dans la cellule. La mise en évidence d'anneaux de division, l'analyse des mutants *arc* et l'identification des protéines impliquées dans la division des plastides représentent les étapes importantes des découvertes.

En 1955, Fasse-Franzisket montre que lors du développement normal de la feuille d'*Agapanthus umbellatus* à la lumière, le chloroplaste se divise plusieurs fois (Fasse-Franzisket, 1955). Dans le même temps, les études sur le comportement des plastides au moyen de la microscopie électronique, révèlent les mécanismes par lesquels les plastides se divisent. Les chloroplastes se divisent par formation, autour du chloroplaste, d'une constriction initiale donnant au chloroplaste la forme d'haltères. Cette constriction est suivie d'un pincement donnant naissance aux deux chloroplastes-fils. La constriction s'accompagne de la fusion de la

membrane interne et de la membrane externe du chloroplaste. Ce type de division a été observé d'abord dans l'algue brune *Fucus* (von Wettstein, 1954), puis dans deux plantes dicotylédones (Mühlethaler, 1960) et enfin dans l'algue rouge *Lomentaria* (Bouck, 1962). La division des proplastides dans les plantes supérieures s'effectue comme celle des chloroplastes dans les algues et plantes vertes avec un pincement s'accompagnant d'une fusion des deux membranes (Strugger, 1957). Un deuxième mécanisme de division des chloroplastes matures par 'centralisation' a aussi été décrit. Dans le gamétophyte de la fougère *Matteucia struthiopteris* (L.) Todaro, le chloroplaste mature se divise par une invagination centripète de la membrane interne (Gantt and Arnott, 1963). En 1964, la première œuvre cinématographique, montrant la division de chloroplastes dans les cellules de l'algue verte *Nitella axillaris*, et démontrant ainsi que des chloroplastes en forme d'haltères se divisent, est publiée (Green, 1964). Il fallut attendre encore quelques années avant que des observations au microscope de cellules des feuilles de tabac (Boasson and Laetsch, 1969) et épinards (Possingham and Saurer, 1969), établissent une corrélation entre l'augmentation du nombre de chloroplastes et la présence de chloroplastes en forme d'haltères. Au début des années 1970, de nouvelles observations cinématographiques de plastides en division sont publiées, mais cette fois-ci sur des cellules de feuille chez la mousse *Mnium cuspidatum* (Ueda et al., 1970). A la même époque il est aussi démontré qu'une fois la division du chloroplaste initiée, celle-ci peut se poursuivre en dehors de la cellule (Ridley and Leech, 1970; Kameya and Takahashi, 1971).

Toutes ces études d'ultrastructures établissent que les plastides se divisent généralement par un mécanisme impliquant la fission binaire. Ce mécanisme se caractérise par une constriction des membranes (Possingham and Lawrence, 1983; Leech and Pyke, 1988; Whatley, 1988). Il existe cependant quelques exceptions, comme le mécanisme de centralisation (ou partition) décrit ci-dessus (Gantt and Arnott, 1963; Modrusan and Wrischer, 1990; Miyake and Taniguchi, 1995), la division accidentelle induite par la plaque cellulaire (Staff and Parthasarathy, 1984), et la division par bourgeonnement signalée chez un *Bryophyllum* spp (Kulandaivelu and Gnanam, 1985).

2.2. Observation de l'anneau de division

Un certain nombre de structures spécifiques, denses aux électrons, sont associées à la division des plastides. Les premières observations ont indiqué la présence d'une telle structure dans la lumière entre les deux membranes de l'enveloppe, au niveau de l'isthme de constriction de plastides en forme d'haltères (Suzuki and Ueda, 1975; Luck and Jordan, 1980;

Chaly and Possingham, 1981; Leech et al., 1981). Un anneau dense aux électrons, appelé PD-ring : (Plastid Dividing ring) associé à la constriction et présent dans le cytoplasme à la surface du chloroplaste a été décrit pour la première fois chez l'algue rouge *Cyanidium caldarium* RK-1 (Mita et al., 1986). Chez l'avoine, *Avena sativum*, le PD-Ring s'est révélé être un anneau présent à l'intérieur du chloroplaste dans le stroma mais aussi à l'extérieur du chloroplaste sur l'enveloppe externe (Hashimoto, 1986). Ce double anneau a été détecté chez tous les Angiospermes étudiés (Hashimoto, 1986; Kuroiwa, 1989; Oross and Possingham, 1989), l'algue rouge (Mita et al., 1986; Mita and Kuroiwa, 1988; Kuroiwa, 1989), et les fougères (Duckett and Ligrone, 1993) (tableau 1).

Tableau 1. Nombre et taille des anneaux de divisions (PD ring). La taille maximale en nanomètre (largeur x épaisseur) des anneaux durant l'étape de contraction des chloroplastes est donnée. Symbole utilisé : ? non documenté.

| Groupes | Plantes | Algues | Algues | Glauco- | Heterokontes | |
|---------|-------------|------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|-------------------------------------|-------------------------|
| | terrestres | vertes | rouges | cystophytes | | |
| Nombre | 2 | 1 or 2 | 3 | 1 | 1 | |
| PD ring | Taille (nm) | <i>A. sativa</i> (1) | <i>T. potteri</i> (4) | <i>C. merolae</i> ^b | <i>C. Paradoxa</i> ^c (7) | <i>H. akashiwo</i> (8) |
| | | <i>S. oleracea</i> (2) | 100 x 20 | (6) | 50 x ? | 100 x ? |
| | | <i>P. vulgaris</i> (2) | <i>N. bacillaris</i> ^a | externe | | <i>M. Splendens</i> (9) |
| | | <i>N. tabacum</i> (2) | (5) | 80-100 x 25 | | 200-240 x 5-10 |
| | | <i>T. aestivum</i> (2) | 60 x 14 | intermédiaire | | <i>M. Rasilis</i> (9) |
| | | <i>P. Zonale</i> (3) | | 80-110 x 2 | | 80-100 x ? |
| | 15-40 x 5 | | interne | | | |
| | | | 100-120 x 5 | | | |

Note: ^aChez *Nannochloris bacillaris* l'anneau devient plus large, alors que son épaisseur reste constant durant la division du chloroplaste. ^bPendant la contraction de l'anneau externe, celui-ci s'épaissit en maintenant un volume constant. L'épaisseur de l'anneau intermédiaire, présent dans l'espace intermembranaire, et de l'anneau interne reste inchangée, et leur volume décroît en proportion au cours de la contraction. ^cL'anneau ne semble pas augmenter en épaisseur et largeur durant la division de la membrane interne, ce qui suggère une perte des composés de l'anneau durant la constriction. Références : (1) (Hashimoto, 1986); (2) (Kuroiwa et al., 2002); (3) (Oross and Possingham, 1989); (4) (Chida and Ueda, 1991); (5) (Ogawa et al., 1995); (6) (Kuroiwa, 2000; Miyagishima et al., 2001b); (7) (Iino and Hashimoto, 2003); (8) (Hashimoto, 1997); (9) (Weatherill et al., 2007).

La situation est plus complexe chez les Bryophytes : la mousse *Funaria hygrometrica* ne possède qu'un anneau externe (Tewinkel and Volkmann, 1987), alors que l'hépatite *Odontoschisma denudatum* possède les deux anneaux (Duckett and Ligrone, 1993). Chez les Chlorophytes, certaines algues vertes possèdent seulement l'anneau externe comme *Trebouxia potteri* (Chida and Ueda, 1991), alors que d'autres comme *Nannochloris bacillaris* (Ogawa et al., 1995) exhibent deux anneaux de chaque côté de l'enveloppe plastidiale. Dans

l'algue rouge *Cyanidioschyzon merolae*, un anneau est présent dans la lumière entre la membrane interne et externe du plaste (Miyagishima et al., 1998), portant ainsi à trois le nombre d'anneaux chez les Rhodophytes. Ce troisième anneau, présent entre les membranes, n'a pas été observé, pour l'instant, dans d'autres organismes. Chez les cyanelles de *Cyanophora paradoxa*, les plastes photosynthétiques de glaucocystophytes, un seul anneau interne est présent dans le stroma (Iino and Hashimoto, 2003). L'observation de PD-Ring dans les plastes secondaires est rare. Cependant, la présence d'un seul anneau 'periplastidial' a été décrite à la surface de la paire intérieure des quatre membranes entourant le plaste chez les hétérokontes *Mallomonas splendens* et *Mallomonas rasilis* (Synurophyceae) (Beech and Gilson, 2000; Weatherill et al., 2007), *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) (Hashimoto, 1997) et *Nannochloropsis oculata* (Hashimoto, 2005). Dans le parasite apicomplexe, *Toxoplasma gondii*, aucune structure de division n'a été observée et le plaste (appelé apicoplaste) en division se trouve associé aux centrosomes du fuseau mitotique (Striepen et al., 2000). Néanmoins, dans un autre rapport, des anneaux ont été observés au niveau de la constriction de l'apicoplaste en division (Matsuzaki et al., 2001). On ne sait pas, pour l'instant, si l'absence d'observation d'anneaux dans le stroma des plastes secondaires est due à des problèmes techniques. La présence presque universelle de l'anneau, aussi bien pour les plastes résultant de l'endosymbiose primaire que de l'endosymbiose secondaire, (tableau 1) laisse à penser que ces anneaux, acquis après les l'endosymbiose, jouent un rôle clé dans la division des plastes (Hashimoto, 2003; Hashimoto, 2005).

En sus des différences dans le nombre d'anneaux, la largeur et l'épaisseur des anneaux diffèrent entre les plantes supérieures et les algues (tableau 1). À ce jour, l'anneau le plus large a été observé sur la surface extérieure du plaste de l'hétérokonte *Mallomonas splendens* (Weatherill et al., 2007). La cinétique d'apparition de l'anneau, (allant d'une apparition précoce, moyenne ou tardive) est très variable selon les organismes. Les anneaux internes et externes sont observés dans les trois stades de division chez l'algue rouge ainsi que chez la plupart, sinon toutes, des algues vertes. En revanche, chez les plantes supérieures, les anneaux ne sont observés que dans la phase tardive de division des chloroplastes. Pour des études approfondies et l'interprétation des structures observées, on peut se référer aux revues suivantes : (Kuroiwa, 1989; Kuroiwa et al., 1998; Kuroiwa, 2000). L'identité des composants de l'anneau a été étudiée par des analyses cytochimiques et cyto-physiologiques, ainsi que par des observations au microscope électronique. Les premières études ont suggéré que l'actine pourrait être un élément de l'anneau (Mita and Kuroiwa, 1988; Hashimoto, 1992), mais il a finalement été démontré que l'actine n'est pas impliquée mais que ce serait plutôt une protéine

de 56 kDa qui forme des filaments de 5 nm de diamètre (Miyagishima et al., 2001b).

2.3. L'approche génétique de la division des plastes

La première évidence d'un contrôle nucléaire de la division des plastes a été suggérée par l'étude d'un mutant d'orge déficient dans la synthèse de protéines chloroplastiques, du fait de l'absence de ribosomes plastidiaux. Ce mutant présente un nombre normal de chloroplastes, une quantité normale d'ADN plastidial, et élabore normalement les anneaux de division. Ces observations démontraient que la traduction de gènes plastidiaux n'était pas nécessaire pour que la division des plastes puisse se faire (Scott et al., 1982; Hashimoto and Possingham, 1989).

Afin d'identifier les gènes impliqués dans la division des chloroplastes, des mutants d'*Arabidopsis* avec le nombre et la taille des chloroplastes modifiés ont été caractérisés. Ces mutants ont été obtenus par traitement aux Méthane sulfonate d'éthyle (EMS) (Pyke and Leech, 1991), ou par insertion de T-DNA. Onze mutants indépendants *arc* (accumulation and replication of chloroplasts) ont été identifiés et leurs principales caractéristiques sont résumées dans le tableau 2. La relation entre cinq gènes *arc* a été abordée à travers une série d'études de doubles mutants (Marrison et al., 1999). ARC1 diminue le taux de division des proplastes, mais se trouve sur une autre voie que les protéines ARC3, ARC5, ARC6 et ARC11. ARC6 est à l'origine de la division des proplastes et des chloroplastes. ARC3 contrôle le taux d'expansion des chloroplastes et ARC11 le positionnement central du plan de division. Enfin ARC5, agit dans un stade tardif de la division en facilitant la séparation des deux chloroplastes fils.

Tableau 2. Phenotype des mutants *arc* chez *A. thaliana*. Ler : Landsberg; Col : Columbia;

Ws : Wassilewskija

| Géno-type | Eco-type | Taille des cellules du mésophylle (μm^2) | Surface moyenne des chloroplastes (μm^2) | Chloroplastes/cellule | Chloroplastes/ $10^3\mu\text{m}^2$ de surface de cellules de mésophylle | Caractéristiques des chloroplastes (observés dans le mésophylle à moins spécifié) | References |
|-----------|-----------------------|---|---|-----------------------|---|---|--|
| WT | Ler | 4778-4800 | 50 | 120 | 25 | Sphérique | (Pyke and Leech, 1992) (Marrisson et al., 1999) |
| WT | Ws | 5087 | 52 | 83 | 16 | Sphérique | (Pyke et al., 1994) (Rutherford, 1996) |
| WT | Col | | 50 | 100 | 23 | Sphérique | (Osteryoung et al., 1998) |
| arc1 | Ler (ems) | 3388 | 26 | 108 | 32 | Augmentation du nombre de petits chloroplastes. Feuilles pales. | (Pyke and Leech, 1992) (Pyke and Leech, 1994) |
| arc2 | Ler (ems) | 4339 | 111 | 40 | 9 | Nombre réduit de chloroplaste | (Pyke and Leech, 1992) |
| arc3 | Ler (ems) | 3582 | 202 | 18 | 5 | Quelques grand chloroplastes | (Pyke and Leech, 1992) |
| arc5 | Ler (ems) | 3500 | 290 | 13 | 4 | Quelques grands chloroplastes avec une constriction centrale | (Pyke and Leech, 1994) (Robertson et al., 1996) |
| arc6 | Ws (T-DNA) | 3700 | 1080 | 2 | 0,4 | En moyenne 2 chloroplastes géants. Taille réduite des proplastés dans le méristème apical et racinaire. Cellules de gardes sans plastés. Quelques gros leucoplastes | (Pyke and Page, 1998) (Pyke et al., 1994) (Robertson et al., 1995) |
| arc7 | Ws | | 40 | 80 | 26 | Augmentation du nombre de chloroplaste. Feuilles pales. | (Rutherford, 1996) (Pyke, 1999) |
| arc8 | Ws | | 110 | 45 | 10 | | (Rutherford, 1996) |
| arc9 | Ws | | 140 | 34 | 12 | | (Rutherford, 1996) |
| arc10 | Ws | | 170 | 38 | 6 | Population très hétérogène. | (Rutherford, 1996) (Pyke, 1999) |
| arc11 | Ler (NaeI deleted ac) | 4200 | 110 | 29 | 7 | Population hétérogène. Ultrastructure normale | (Marrisson et al., 1999) |
| arc12 | Col | | | 2 | | Similaire à <i>arc6</i> . Cellules de garde sans plastés | (Pyke, 1999) |

3. L'appareil de division des plastés

La preuve définitive de la conservation des mécanismes de division entre les plastés et les bactéries provient de la découverte d'un homologue de la protéine FtsZ dans le génome nucléaire chez *Arabidopsis thaliana* (Osteryoung and Vierling, 1995). L'identification dans les plantes d'autres homologues de la division bactérienne et la localisation de leurs produits dans le chloroplaste a suggéré que les mécanismes de division permettant la constriction de la membrane interne des chloroplastes étaient d'origine endosymbiotique. Un second appareil de division provenant de la cellule hôte a été postulé pour être présent à la surface du chloroplaste (Miyagishima et al., 2001c). Quelques années plus tard, une dynamine a été impliquée dans la division des chloroplastes en formant un anneau de division sur la membrane externe du plaste (Gao et al., 2003; Miyagishima et al., 2003).

A ce jour, une dizaine de protéines ont été identifiées comme participant directement à la division des plastes. Leur origine confirme que l'appareil de division des chloroplastes est un complexe hybride, avec d'une part des protéines provenant du symbiote et d'autre part des protéines qui proviennent de la cellule hôte impliquée dans l'événement endosymbiotique (tableau 3). Pour de récentes informations sur le sujet voir : (Miyagishima and Kuroiwa, 2006; Glynn et al., 2007; Maple and Moller, 2007a; Maple and Moller, 2007b).

Tableau 3. Composants internes et externes de la l'appareil de division des plastes. (+) identifiés et (-) non identifiés dans les génomes actuellement disponibles. (?) pas encore identifié mais le génome est incomplet.

| Appareil | Protéines | localisation | ⁽¹⁾ Plastes primaires | | | | ⁽¹⁾ Plastes secondaires | |
|-------------|---------------|---|----------------------------------|---------------|---------------|-------------------|------------------------------------|---------------|
| | | | Plantes terrestres | Algues vertes | Algues rouges | Glaucocystophytes | Heterokontes | Cryptomonades |
| Côté Stroma | FtsZ1 | Anneau associé avec la membrane interne. (principalement dans le stroma) | + | + | | + | | |
| | FtsZ2 | | + | + | | ? | | |
| | FtsZA | | | | + | | + | + |
| | FtsZB | | | | + | | - | ? |
| | ARC6 | Traverse la membrane interne | + | + | - | ? | - | ? |
| | MinD/ARC11 | Pôles du plaste | + | + | - | ? | - | + |
| | MinE | Pôles du plaste | + | + | - | ? | - | + |
| | ARC3 | Au niveau de l'anneau et des pôles du plaste | + | + | - | ? | - | ? |
| | GC1 (AtSulA) | Associé avec la membrane interne | + | + | + | ? | - | ? |
| | Côté cytosole | ARC5 (DRP5B) | patches | + | + | + | ? | + |
| PDV1 | | Cytosoliques (ARC5) et | + | - | - | ? | - | ? |
| PDV2 | | anneaux associés avec la membrane externe. | + | - | - | ? | - | ? |

⁽¹⁾A ce jour, seulement quelques génomes d'algues sont complètement séquencés. Ce sont les génomes suivants avec des plastes primaires : *Ostreococcus taurii*, *Ostreococcus lucimarinus*, *Chlamydomonas reinhardtii* (algue verte) and *Cyanidioshyzon merolae* (algue rouge); et pour les organismes avec des plastes secondaires : *Thalassiosira pseudonana* et *Phaeodactylum tricorutum* (deux diatomes, heterokontes) (Misumi et al., 2008). Aucun des gènes des protéines listées, n'a été trouvé dans le génome des parasites apicomplexe. La liste des génomes complets se trouve sur les sites suivants : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/> et http://genome.jgi-psf.org/euk_cur1.html. La liste des génomes chloroplastiques et des nucléomorphes est disponible sur le site : http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/static/euk_o.html. Le site <http://chloroplast.cbio.psu.edu/index.html> est entièrement consacré à l'analyse des génomes chloroplastiques.

3.1. L'appareil de division d'origine endosymbiotique

3.1.1. La protéine FtsZ et la protéine associée ARC6

L'appareil de division doit fournir la force nécessaire à la scission de la cellule mère en deux cellules filles. Dans la cellule eucaryote, le cytosquelette joue un rôle important dans un tel processus appelé cytotodiérèse. Un anneau central formé d'actine et de myosine, de concert avec d'autres protéines, se contracte pour diviser les cellules animales et fongiques. La cytotodiérèse dans les cellules végétales se fait par la formation de la plaque cellulaire, qui est composée du phragmoplaste (ou phycoplast dans certaines algues), un assemblage complexe de microtubules et d'autres éléments du cytosquelette. Les procaryotes possèdent des homologues de protéines du cytosquelette et la plupart de ces cellules utilisent la protéine FtsZ, un homologue de la tubuline, pour se diviser. La protéine FtsZ (filamentous temperature sensitive protein Z), a été identifiée dans un crible génétique des cellules *d'Escherichia coli* incapables de se diviser à la température restrictives et forme un anneau contractile (Z-ring) au site de division (Lutkenhaus and Addinall, 1997). FtsZ est une protéine hautement conservée que l'on retrouve dans la plupart des principaux groupes de bactéries et d'archées (Vaughan et al., 2004; Margolin, 2005). Toutefois, FtsZ est absente dans quelques groupes bactériens, comme dans la famille des chlamydiaceae, des bactéries intracellulaires obligatoires, qui utilisent des mécanismes provenant de la cellule hôte pour se diviser. FtsZ est aussi absente chez les planctomycètes, un groupe de bactéries bourgeonnantes, sans couche de peptidoglycane, mais qui présentent une organisation inhabituelle avec un cloisonnement interne et un nucléoïde entouré d'une membrane (Lindsay et al., 2001). Les mycoplasmes, des 'mollicutes' sans paroi, ont perdu beaucoup de protéines de division, mais contiennent FtsZ, à l'exception de *Ureaplasma urealyticum*. Chez les archées, FtsZ a été trouvée dans tous les génomes connus chez les euryarchaeota, mais est absente chez les crenarchaeota. Le mécanisme de division cellulaire en absence de FtsZ est pour l'instant méconnu.

Le premier gène FtsZ chez un eucaryote a été trouvé dans le génome nucléaire d'*Arabidopsis thaliana* (Osteryoung and Vierling, 1995). Depuis, les analyses phylogénétiques des séquences de protéines FtsZ indiquent que les protéines FtsZ, chez les plantes supérieures et inférieures (la lignée des plastes verts), appartiennent à deux groupes différents appelés FtsZ1 et FtsZ2 (Osteryoung et al., 1998; Osteryoung and McAndrew, 2001; El-Shami et al., 2002) (Figure 6A).

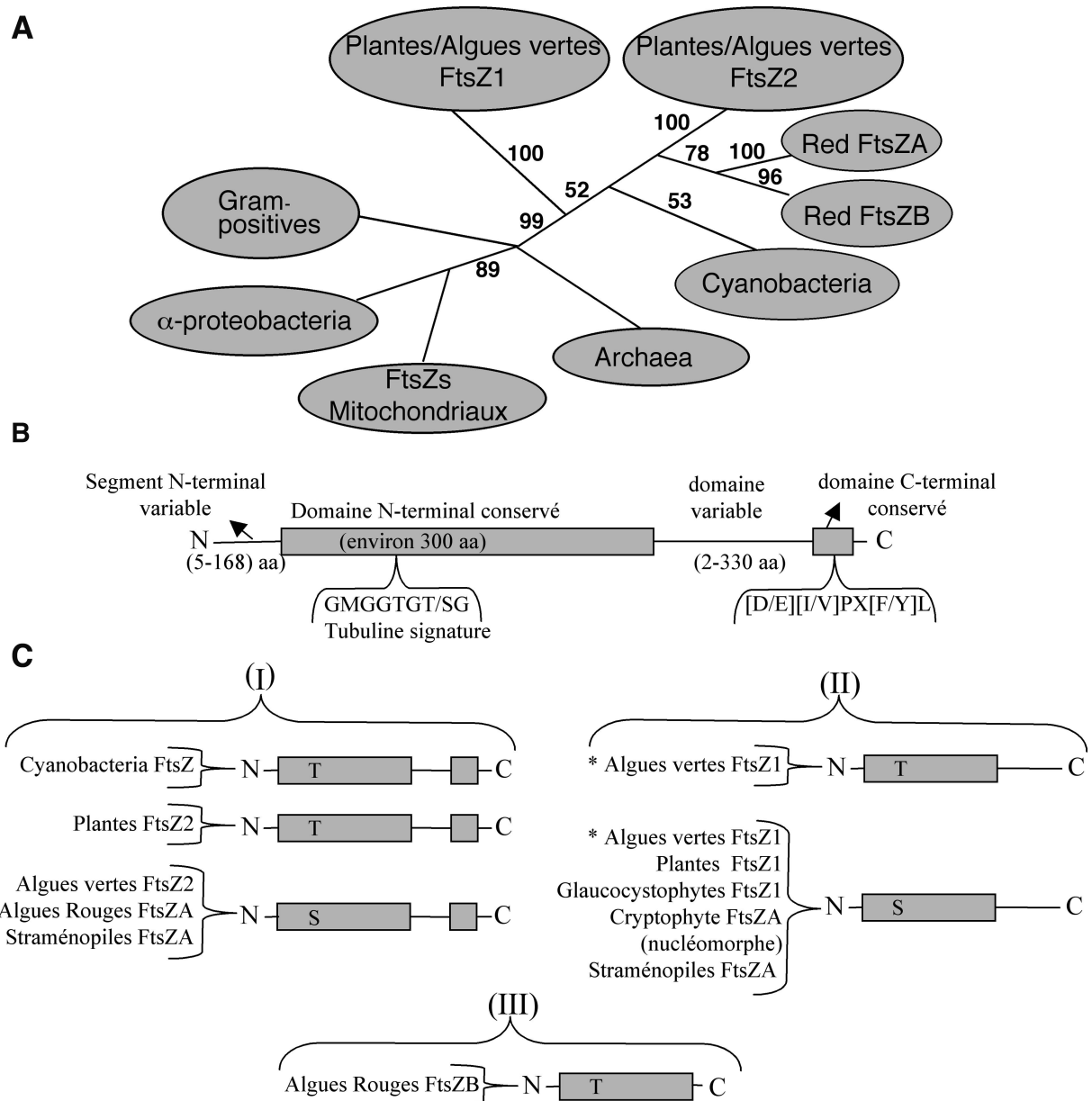


Figure 6. Les protéines FtsZ de division des plastes. (A) Relation phylogénétique entre les protéines FtsZ (Les valeurs de bootstaps, neighbor-joining method based on Kimura distance, d'après Miyagishima et al., 2004). (B) Représentation schématique des quatre domaines présents dans la séquence de la protéine et qui sont décrits dans le texte. (C) Comparaison des trois groupes de protéines FtsZ en fonction de la présence des différents domaines. Les séquences du groupe I contiennent le domaine variable C-terminal et le domaine conservé C-terminal, alors que les séquences du groupe II ont le domaine variable mais pas le domaine conservé C-terminal. Les séquences du groupe III ne contiennent ni le domaine variable, ni le domaine conservé C-terminal. Les résidus sérine (S) ou thréonine (T) du motif tubuline sont indiqués. * Dans le groupe II, les algues vertes telles *Chlamydomonas reinhardtii*, *Nannochloris bacillaris*, *Volvox carteri* contiennent le résidu T, alors que *Marchantia*

polymorpha and *Oestrecoccus taurii* ont le résidu S dans la signature Tubulin.

La participation de ces protéines dans la division des chloroplastes a été démontrée par l'analyse d'un mutant KO *FtsZ1* dans la mousse *Physcomitrella patens* (Strepp et al., 1998), et chez *Arabidopsis*, pour les deux protéines *FtsZ1* et *FtsZ21*, par expression d'ARN antisens (Osteryoung et al., 1998). Les mutants présentent tous un défaut dans la division des chloroplastes avec la présence de cellules ne contenant que quelques plastes de grandes tailles. La conservation des mécanismes de division entre les chloroplastes et les bactéries a été démontrée en corrigeant les défauts de division d'un mutant *FtsZ* thermosensible chez *E. coli* en exprimant la protéine *FtsZ1* de plante (Gaikwad et al., 2000). Les protéines *FtsZ* chez les algues rouges se classent aussi en deux groupes phylogénétiques : Le groupe *FtsZA* qui contient aussi les protéines de plastes provenant de la symbiose secondaire avec les algues rouges, et le groupe *FtsZB* (Miyagishima et al., 2004). Comme on pouvait s'y attendre, les protéines *FtsZ* de mitochondries sont plus proches de celles des α -protéobactéries, les progéniteurs des mitochondries, alors que les *FtsZs* de chloroplastes sont plus étroitement associées à celles des cyanobactéries (Figure 6A). La présence de quatre domaines dans les protéines *FtsZ* a été révélée par les alignements des structures secondaires entre l' α/β -tubuline et la protéine *FtsZ1* de *Methanococcus jannaschii* (Nogales et al., 1998) et par l'analyse phylogénétique (Vaughan et al., 2004). Ces domaines comprennent un segment variable situé en N-terminal, suivi d'un domaine hautement conservé puis un espace intermédiaire variable, et enfin un domaine C-terminal conservé (Figure 6B). La seule fonction pour l'instant connue, pour une partie de la région N-terminale, concerne l'adressage de la protéine au plaste dans les cellules eucaryotes. Le domaine conservé avec environ 300 acides aminés contient le motif tubuline qui est indispensable pour la fixation du GTP, et son hydrolyse nécessaire pour la polymérisation de *FtsZ* en protofilaments. La longueur et la composition en acides aminés de la région intermédiaire est très variable et n'est pas requise pour la polymérisation de *FtsZ*.

Le motif C-terminal n'est pas nécessaire pour l'auto-assemblage de *FtsZ* (Ma and Margolin, 1999; Osteryoung and McAndrew, 2001), mais est impliqué, chez les bactéries, dans l'interaction protéine-protéine, en se liant à ZipA et FtsA, deux protéines associées à la membrane (Wang et al., 1997; Din et al., 1998; Liu et al., 1999; Ma and Margolin, 1999; Hale et al., 2000; Mosyak et al., 2000; Yan et al., 2000). La comparaison des régions C-terminales, comprenant la région intermédiaire variable et le motif conservé (Miyagishima et al., 2004), fait ressortir trois groupes distincts (Figure 6C). Les séquences du groupe I comprennent les protéines *FtsZ2* des plastes verts et les séquences *FtsZA* des plastes rouges (algues rouges et

Stramenopiles) qui possèdent le domaine conservé C-terminal. Ces séquences sont plus proches des séquences de cyanobactéries, suggérant que ce groupe contient les séquences FtsZ ancestrales. Les séquences dans le groupe II comprennent les FtsZ1 de plastes verts et les FtsZA de plastes secondaires qui ne contiennent pas le motif C-terminal. Pour l'instant, le groupe III ne contient que les protéines FtsZB d'algues rouges qui ne possèdent ni la région intermédiaire ni le domaine C-terminal.

Les analyses phylogénétiques et les comparaisons des domaines indiquent que les protéines FtsZ1 et FtsZB résultent d'une duplication des gènes FtsZ2 et FtsZA, respectivement avec la perte subséquente du motif C-terminal.

La fonction du motif C-terminal dans les séquences chloroplastiques n'est pas connue. Les homologues des protéines FtsA et ZipA qui interagissent avec ce domaine dans les bactéries, sont absentes dans les cellules eucaryotes. Néanmoins, la même fonction est sans doute conservée, puisque l'expression de la protéine FtsZ2 de plaste perturbe gravement la division bactérienne alors que l'expression de FtsZ1 a moins d'effet. L'effet observé est dépendant de la présence de ce motif et suggère qu'il interagit avec les protéines FtsA et/ou ZipA dans *E. coli* (El-Kafafi et al., 2005). Dans les bactéries, FtsA et ZipA sont en mesure de lier FtsZ à la membrane. FtsA est largement conservée dans les bactéries, mais la protéine est absente dans les actinomycètes, les cyanobactéries, les mycoplasmes et les archées. ZipA ne se trouve que dans des bactéries étroitement proches de *E. coli*.

Chez *Arabidopsis*, la mutation *arc6* (tableau 2) a été associée au produit d'un gène nucléaire agissant comme un régulateur positif de la formation de l'anneau de division FtsZ (Vitha et al., 2003) et la protéine est l'orthologue de Ftn2 dans les cyanobactéries (Koksharova and Wolk, 2002). ARC6 est une protéine de la membrane interne, avec dans sa séquence N-terminale le domaine J (domaine permettant des interactions avec des chaperones Hsp70), exposée côté stroma et sa région C-terminale présente dans l'espace intermembranaire. ARC6 interagit avec le motif C-terminal de FtsZ2 et pourrait permettre la liaison des filaments FtsZ à la membrane. Les chloroplastes géants observés dans le mutant *arc6* présentent de nombreux filaments FtsZ courts au lieu de l'anneau intact FtsZ visualisé dans les plantes sauvages. Inversement une polymérisation excessive de FtsZ est observée dans les plantes surexprimant ARC6 (Vitha et al., 2003). Ces phénotypes suggèrent pour ARC6 un rôle similaire à celui de ZipA dans les bactéries, dans l'assemblage des filaments FtsZ (RayChaudhuri, 1999; Hale et al., 2000). Des homologues de ARC6 se trouvent dans le génome nucléaire de toutes les plantes supérieures analysées, mais cette présence est limitée aux chlorophytes puisque les orthologues n'ont été retrouvés à ce jour que seulement dans le

génomique nucléaire de *Chlamydomonas reinhardtii* et *Ostreococcus taurii*.

3.1.2. Les protéines topologiques Min

Le système Min (pour Mini cellules, engendrées par la division asymétrique), avec deux ou trois protéines dans des bactéries, inhibe la formation de l'anneau de division Z aux pôles de la cellule. Dans *E. coli*, ce système consiste de MinC, un inhibiteur de polymérisation de FtsZ (Hu et al., 1999) et de MinD et MinE, deux protéines qui oscillent d'un pôle à l'autre de la cellule (Raskin and de Boer, 1999). MinD est une ATPase qui se lie à la membrane dans sa forme ATP, et qui est libérée de la membrane après l'hydrolyse de l'ATP. MinE se lie à MinD et stimule l'hydrolyse de l'ATP ce qui permet le décrochage de MinD de la membrane. La liaison de MinC à MinD se produit le plus souvent aux pôles de la cellule, séquestrant ainsi MinC loin du centre de la cellule. Cette séquestration permet la polymérisation de FtsZ au point médian de la cellule et sa subséquente division. Bien que les protéines Min soient largement conservées, elles ne sont pas présentes dans tous les organismes. Cependant, les gènes sont présents dans des bactéries qui sont proches de la racine de l'arbre phylogénétique de la vie (*Thermatoga maritima* et *Aquifex aeolicus*), indiquant ainsi qu'ils étaient présents dans les bactéries ancestrales. Ces gènes ont ensuite été perdus dans certaines lignées telles que *Caulobacter crescentus*. *Bacillus subtilis* n'a pas de protéine MinE, mais possède la protéine DivIVA qui est responsable de la localisation de MinC et MinD (pour une revue récente, voir Lutkenhaus, 2007).

A ce jour, aucun homologue de *MinC* n'a été identifié chez les eucaryotes, bien que la surexpression de la protéine MinC de *E. coli* dans les plantes perturbe la division des chloroplastes (Tavva et al., 2006). Toutefois, les homologues de *MinD* et *MinE* ont été identifiés, pour la première fois, dans le génome plastidial de l'algue verte *Chlorella vulgaris* (Wakasugi et al., 1997) et chez le cryptomonade *Guillardia theta* (Douglas and Penny, 1999). Depuis, *MinD* a été trouvé dans le génome nucléaire chez *Arabidopsis* (Colletti et al., 2000; Kanamaru et al., 2000), le souci (Moehs et al., 2001), la mousse *P. Patens* (Hayashida et al., 2005), ainsi que dans d'autres plantes comme le riz, la vigne, le tabac, le peuplier et le sorgho. Les gènes *MinE* ont également été découverts dans le génome nucléaire d'*Arabidopsis* (Itoh et al., 2001; Reddy et al., 2002), la mousse *P. Patens* (Hayashida et al., 2005) ainsi que dans le riz, la vigne et l'orge. Ces résultats suggèrent que la présence de ces gènes dans le génome nucléaire est une caractéristique générale chez les plantes supérieures. Grâce au séquençage des génomes chloroplastiques et nucléaires, *MinD* et *MinE* ont été identifiés dans différentes algues. La localisation de ces gènes, lorsqu'ils sont présents, est variable et, en fonction des

organismes, les protéines sont codées dans le plaste ou à la suite de transferts latéraux de gènes (LGT) dans le génome nucléaire. Dans les Charophytes, les ancêtres immédiats des plantes terrestres, *MinD* et *MinE* sont absents du génome des chloroplastes de *Chaetosphaeridium globosum* (Coleochaetales) et *Chlorokybus atmophyticus*, ce qui suggère qu'ils sont probablement présents, comme dans les plantes supérieures, dans le génome nucléaire. Chez *Mesostigma viride*, un homologue de *Chaetosphaeridium globosum* (Lemieux et al., 2007), qui a divergé très tôt des Streptophytes, *MinD*, mais pas *MinE*, est codée par le plaste. Ce résultat suggère que le transfert de *MinD* au noyau a eu lieu après la divergence des Chlorophytes et des Streptophytes. Chez *Chlamydomonas reinhardtii*, une Chlorophyceae, les deux protéines, *MinD* (WeiZhong et al., 2007) et *MinE* sont codées dans le noyau et adressées dans le chloroplaste. Bien qu'ayant évolué à partir d'une algue rouge dont les génomes plastidiaux et nucléaires ne contiennent ni *MinD* et *MinE*, les génomes des plastes secondaires chez les Chryptophytes *Guillardia theta* et *Rhodomonas salina* contiennent à la fois *MinD* et *MinE*, ce qui suggère que la perte de ces deux gènes dans les algues rouges s'est produit après l'événement endosymbiotique. Nous avons identifié dans notre étude un homologue de *MinD* dans le génome plastidial de *Emiliana huxleyi*, organisme qui appartient au groupe des Haptophytes (ce qui représente à notre connaissance la première caractérisation d'une protéine impliquée dans la division du plaste dans ce groupe d'algues). Aucune des deux protéines n'est présente dans le génome nucléaire et plastidial de *Thalassiosira pseudonana* (Heterokonts).

La fonction de ces deux protéines a été étudiée chez *Arabidopsis*. Les changements induits dans l'expression de *MinD* et *MinE* aboutissent à la division asymétrique du chloroplaste (Colletti et al., 2000; Dinkins et al., 2001; Maple et al., 2002; Fujiwara et al., 2004). Les deux protéines peuvent former des homodimères (tableau 4) (Maple et al., 2005), et l'interaction de *MinE* avec *MinD* est requise pour la stimulation de l'activité ATPase, Ca^{2+} -dépendante, de *MinD*. Ce résultat relève ainsi quelques différences avec l'activation de l'activité ATPase de *MinD* chez les bactéries (Aldridge and Moller, 2005). La dissection de l'assemblage du complexe plastidial *MinD*-*MinE*, a révélé certains aspects concernant l'assemblage dynamique et spatiale de l'anneau FtsZ (Maple and Moller, 2007c). Les différences observées dans la structure des domaines reflètent sans aucun doute l'adaptation de ces protéines à leur nouvel environnement.

Tableau 4. Interactions entre les protéines de division des plastes. (+) Interactions observées par analyse double hybride (YTH, Yeast Two-Hybrid), fluorescence résonance énergie transfert (FRET, Fluorescence Resonance Energy Transfer) et complémentation de fluorescence biomoléculaire (BiFC: Bimolecular Fluorescence Complementation assays). (-) Pas observé par YTH.

| | FtsZ1 | FtsZ2 | MinD (ARC11) | MinE | ARC6 | ARC3 | GC1 (AtSulA) |
|-----------------|---|---|---|---|---------------------|---|--------------------|
| FtsZ1 | + | | | | | | |
| | YTH ⁽¹⁾ BiFC ⁽¹⁾ | | | | | | |
| FtsZ2 | + | + | | | | | |
| | YTH ⁽¹⁾ BiFC ⁽¹⁾ | YTH ⁽¹⁾ BiFC ⁽¹⁾ | | | | | |
| MinD (ARC11) | - ⁽¹⁾ | - ⁽¹⁾ | + | | | | |
| | | | YTH ⁽²⁾ BiFC ⁽¹⁾ | | | | |
| MinE | - ⁽¹⁾ | - ⁽¹⁾ | + | + | | | |
| | | | YTH ⁽¹⁾ BiFC ⁽¹⁾ | YTH ⁽¹⁾ BiFC ⁽¹⁾ | | | |
| ARC6 | - ⁽¹⁾ | + | - ⁽¹⁾ | - ⁽¹⁾ | + | | |
| | | YTH ⁽¹⁾ BiFC ⁽¹⁾ | | | BiFC ⁽³⁾ | | |
| ARC3 | + | - ⁽³⁾ | + | + | - ⁽¹⁾ | + | |
| | YTH ⁽³⁾ BiFC ⁽³⁾ | | YTH ⁽³⁾ BiFC ⁽³⁾ | YTH ⁽³⁾ BiFC ⁽³⁾ | | YTH ⁽³⁾ BiFC ⁽³⁾ | |
| GC1 (AtSulA) | - ^(4,5) | - ^(4,5) | - ⁽¹⁾ | - ⁽¹⁾ | - ⁽¹⁾ | - ⁽³⁾ | + |
| | | | | | | | YTH ⁽¹⁾ |

References: (1) (Maple et al., 2005); (2) (Fujiwara et al., 2004); (3) (Maple et al., 2007); (4) (Maple et al., 2004); (5) (Raynaud et al., 2004).

3.1.3. Les régulateurs indirects ARC3 et GC1 de formation de l'anneau Z

Dans ce nouvel environnement, de nouvelles protéines ont dû être conçues de manière à remplacer des protéines telles que MinC, ou pour remplir de nouvelles fonctions. Chez Arabidopsis, ARC3, une protéine chimérique composée d'une région N-terminale homologue à la protéine FtsZ, liée par une séquence unique à un domaine C-terminal contenant un domaine MORN (Membrane Occupation and Recognition Nexus) répété est l'exemple d'une telle protéine (Shimada et al., 2004). Le domaine MORN répété se trouve dans plusieurs protéines présentes dans presque toutes les espèces, y compris les cyanobactéries. Il est ainsi possible que ARC3 soit d'origine symbiotique, découlant de la fusion de FtsZ avec une protéine contenant le motif répété MORN. ARC3 est localisée au site de division des chloroplastes, et forme un anneau au début et au milieu du processus de division (Shimada et al., 2004). ARC3 n'est pas associée à la membrane externe comme cela avait tout d'abord été postulé (Shimada et al., 2004) mais se trouve dans le stroma (Maple et al., 2007). En accord

avec cette localisation, ARC3 interagit grâce à son domaine FtsZ en N-terminal avec la région C-terminale spécifique de FtsZ1 (tableau 4). Ce résultat indique que l'évolution d'une famille de protéines FtsZ1 distinctes dans les plastes verts a été une étape importante dans l'évolution de l'appareil de division chez ces organismes. En outre, l'interaction de ARC3, chez *Arabidopsis*, avec MinD et MinE (tableau 4) et l'observation dans les mutants *arc3* d'anneaux Z multiples au sein d'un seul chloroplaste géant, similaire au phénotype observé dans *arc11/MinD*, suggèrent son implication dans le placement correct de l'anneau Z (Glynn et al., 2007; Maple et al., 2007). Grâce à son interaction avec FtsZ1, ARC3 pourrait inhiber la polymérisation de FtsZ1, puisqu'il a été montré que FtsZ1 pouvait polymériser *in vitro* mais pas FtsZ2 (El-Kafafi et al., 2005), et ainsi empêcher la formation de l'anneau Z aux sites non désirés, comme MinC chez les bactéries (Maple and Moller, 2007b; Maple and Moller, 2007a).

GIANT CHLOROPLAST 1 (GC1, appelé aussi AtSulA) a été identifié comme un homologue de gènes de cyanobactéries (*slr1223* *Synechocystis* PCC en 7120, et *all2390* *Anabaena* PCC en 7120) annotés comme des homologues de la protéine SulA (Maple et al., 2004; Raynaud et al., 2004). Dans *E. coli*, SulA est un composant du système SOS, inhibant la division cellulaire en interagissant avec FtsZ jusqu'à ce que les lésions de l'ADN soient réparées. Aucune interaction entre GC1 et AtFtsZ1 ou AtFtsZ2 n'a été observée dans les analyses en système double-hybrides (Maple et al., 2004; Raynaud et al., 2004), GC1 étant uniquement capable de dimeriser. Quand la protéine All2390 est surexprimée dans *Anabaena*, aucune inhibition de la division cellulaire n'est observée, même si la modification de la morphologie des cellules est visible. Par contre, si dans les mêmes conditions, la protéine bactérienne SulA est exprimée dans *Anabaena*, SulA empêche la formation d'anneaux FtsZ et la division cellulaire est bloquée (Sakr et al., 2006). GC1 est ancrée à l'enveloppe interne côté stroma, (Maple et al., 2004). Des résultats contradictoires ont été publiés concernant les effets positifs ou négatifs de GC1 sur la division des plastes et des études supplémentaires sont nécessaires pour déterminer le rôle exact de la protéine dans la division. Il faut noter que la séquence annotée comme SulA dans les cyanobactéries ne partage qu'une faible homologie avec la séquence SulA de *E. coli*. Quand Slr1223 ou All2390 sont utilisées comme sonde pour rechercher des orthologues, des protéines de fonction inconnue, appartenant à la famille UPF0105, plutôt qu'à la famille sulA, sont identifiées. Ces protéines, dont YfcH dans *E. coli*, possèdent un domaine de fonction inconnue (DUF1323), présent dans la région C-terminale des protéines de la famille des épiméras/déshydratases NAD dépendantes. Fait intéressant, de nombreuses protéines dans lesquelles se trouve ce domaine sont impliquées dans la

division cellulaire, ce qui suggère que GC1 pourrait appartenir à cette nouvelle famille de protéines, dont la fonction reste à déterminer.

3.2. L'appareil de division provenant de la cellule hôte

En plus de l'anneau interne, PD-ring, et de l'anneau FtsZ observés côté stroma des chloroplastes, un anneau avait été également observé sur le côté cytosolique de l'enveloppe (voir le tableau 1), suggérant la présence d'un second appareil de division sur la surface extérieure du chloroplaste. ARC5 (tableau 2), le premier produit des gènes *ARC* à être identifié (Gao et al., 2003), partage des similarités avec la superfamille des dynamines, des GTPases qui permettent les fissions et les fusions de membranes chez les eucaryotes. Ces protéines sont impliquées dans l'endocytose et permettent la division des mitochondries (Praefcke and McMahon, 2004). Concomitamment à cette découverte, l'homologue de ARC5 a été découvert dans le génome nucléaire de *Cyanidioschyzon merolae*, par similitude avec les séquences de dynamines (Miyagishima et al., 2003). ARC5, rebaptisée DRP5B (Dynamin Related Protein 5B, (Hong et al., 2003)), est localisée dans le cytosol et forme un anneau au niveau du site de division des chloroplastes. Dans cette algue rouge, la protéine est associée avec les chloroplastes que seulement pendant la phase de division du plaste et ne forme un anneau qu'à la fin du stade de division. Comme dans l'endocytose, DRP5B peut générer la force mécanique externe permettant le pincement de la membrane des chloroplastes au stade final de la division. Chez *Arabidopsis*, au moins 16 dynamines ont été identifiées et regroupées en 6 sous-familles fonctionnelles (DRP1 à DRP6) sur la base de leur phylogénie et de la présence de motifs fonctionnels dans les séquences (Hong et al., 2003). Jusqu'à récemment, on supposait que DRP5B représentait la contribution de la cellule hôte dans l'appareil de division des chloroplastes puisque les dynamines étaient présentes uniquement dans les cellules eucaryotes. La découverte qu'une dynamine, BDLP, est aussi présente dans la cyanobactérie filamenteuse *Nostoc punctiforme* remettait en question l'origine des dynamines (Low and Lowe, 2006). L'alignement de BDLP avec les autres membres de la famille montrent que BDLP est plus étroitement liée à la mitofusine, une classe de dynamine qui comprend la protéine mitochondriale FZO chez la drosophile et la protéine chloroplastique FZL chez *Arabidopsis*. FZL s'est révélée être un déterminant de la morphologie des thylacoïdes dans les chloroplastes (Gao et al., 2006). Si BDLP a une fonction similaire chez *N. punctiforme*, on peut penser que cette fonction a été conservée après l'événement endosymbiotique. L'analyse phylogénétique montre que DRP5B est plus

proche des dynamines présentes chez l'homme et chez la levure (Hong et al., 2003) que de FZL chez *Arabidopsis* et de BDLP chez la cyanobactérie. Cette analyse confirme que DRP5B représente la contribution de la cellule hôte à l'appareil de division des chloroplastes.

Chez *Arabidopsis*, le recrutement au site de division de DRP5B est médié par PDV1 et PDV2 (Plastid DiVision protein 1 et 2) (Miyagishima et al., 2006). Ces deux protéines ont une seule hélice transmembranaire prédite et PDV1, comme DRP5B, est localisée au site de division en formant un anneau discontinu. DRP5B n'est pas requise pour l'assemblage de PDV1, et si l'anneau DRP5B est formé en absence de PDV1 ou de PDV2, il ne se forme pas lorsque les deux protéines sont absentes. PDV1 et PDV2 sont donc nécessaires à la bonne localisation de DRP5B au site de division, mais si une seule des deux protéines est suffisante pour la localisation de DRP5B, les deux protéines sont nécessaires pour une division correcte du chloroplaste (Miyagishima et al., 2006). La formation de l'anneau FtsZ n'est pas perturbée dans les plantes qui n'expriment aucune des protéines cytosoliques impliquées dans la division, suggérant que ces protéines agissent après la formation de l'anneau FtsZ.

4. L'assemblage de l'appareil de division

Un mécanisme séquentiel a été mis en évidence dans la division des chloroplastes, avec tout d'abord la formation de l'anneau FtsZ, puis des anneaux internes et externes (PD-ring) et enfin de la dynamine (Miyagishima et al., 2001c). Un mécanisme séquentiel a également été proposé pour la formation de l'appareil de division chez les bactéries, qui utilise un seul anneau FtsZ avec quelques rares exceptions, comme *Streptococcus pneumoniae* qui utilise deux anneaux : l'anneau FtsZ et un autre formé par les protéines PBPs (Penicillin-Binding-Proteins) de hauts poids moléculaires (Morlot et al., 2004). Dans les bactéries, l'assemblage de l'anneau se fait à partir de composants cytoplasmiques, de l'intérieur vers l'extérieur. La progression s'effectue par le recrutement au niveau de la membrane de protéines périplasmiques (Romberg and Levin, 2003; Margolin, 2005; Vicente et al., 2006). Chez *E. coli*, la nucléation de l'anneau de division est réalisé par l'assemblage de FtsZ et les autres protéines sont intégrées de façon séquentielle : Le flux est le suivant: FtsZ > [FtsA, ZapA, ZipA] > (FtsE, FtsX) > FtsK > FtsQ > (FtsB, FtsL) > FtsW > FtsI > FtsN > AmiC > EnvC, dans lequel les protéines entre crochets sont indépendantes les unes des autres mais dépendantes de FtsZ et celles entre parenthèses assemblent simultanément (Vicente et al., 2006) (Figure 7A).

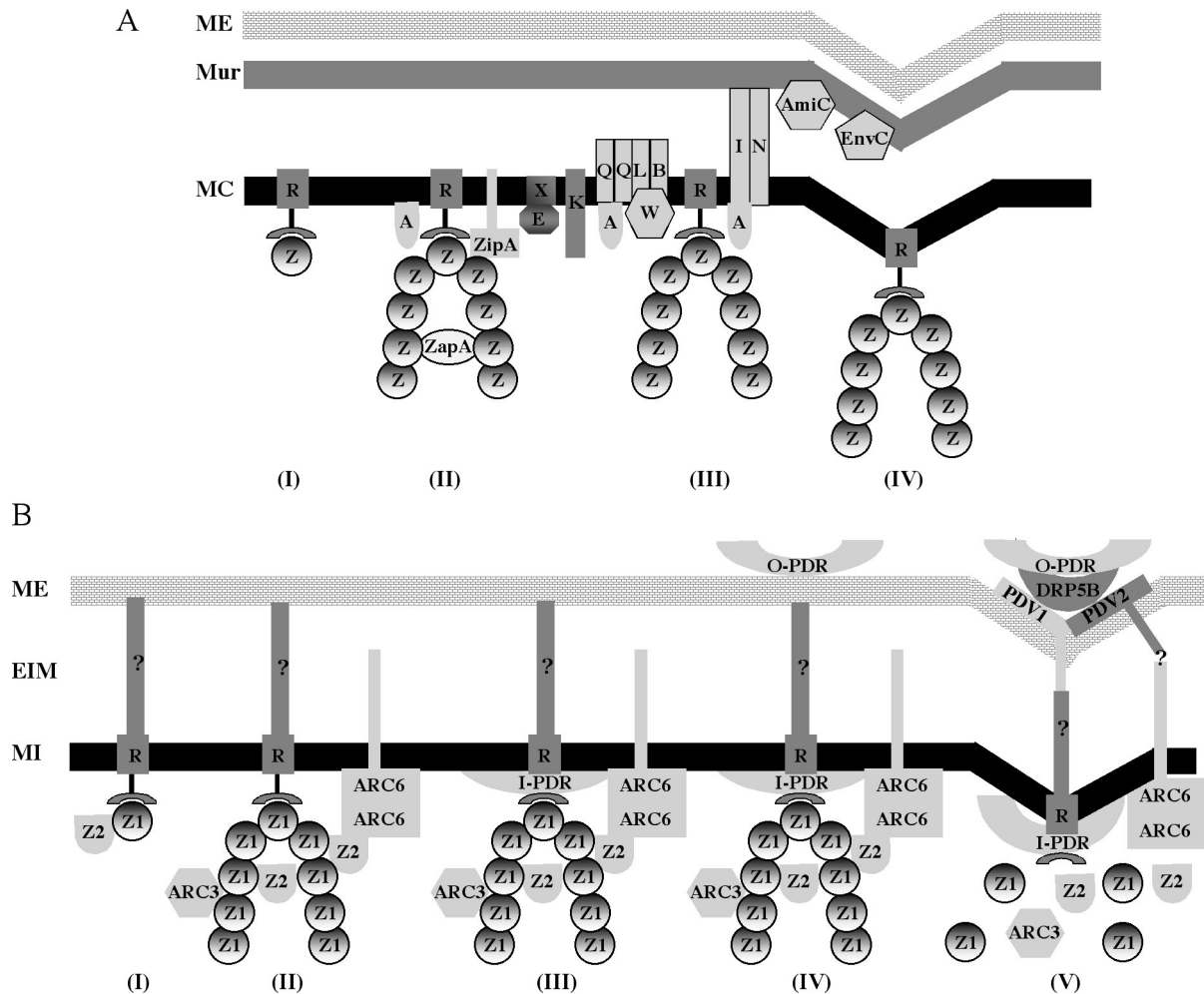


Figure 7. Modèles de mise en place des appareils de division des bactéries et des chloroplastes. (A) Séquence des événements chez *E. coli*. Etape I : FtsZ est localisée au niveau d'un récepteur (R, inconnu pour l'instant). Etape II : l'assemblage de l'anneau Z est dépendant de FtsA ou ZipA, ou les deux ensemble, ainsi que de ZapA. Etape III : Recrutement des protéines FtsE, FtsX, FtsK, FtsQ, FtsL, FtsB, FtsW et ensuite FtsI, FtsN, AmiC et EnvC. Etape IV : Cytodiérèse. Le nom des protéines a été écourté en supprimant le 'Fts'. ME : membrane externe, Mur : Muréine, MC : membrane cytoplasmique.

(B) Séquences des événements dans la division des chloroplastes. Etape I : FtsZ1, sans doute avec FtsZ2 est localisée au futur site de division au niveau d'un récepteur R de la membrane interne. Etape II : l'assemblage de l'anneau FtsZ1 se fait avec l'aide des protéines FtsZ2, ARC6 et ARC3. Etape III : L'anneau interne de division (I-PDR) est mis en place entre l'anneau FtsZ et la membrane. Etape IV : formation de l'anneau externe (O-PDR) sur la membrane externe. Etape V: Formation de l'anneau de Dynamine (DRP5B), constriction de la membrane et relargage de constituants de l'anneau Z interne pour aboutir à la cytodivision complète. Le récepteur inconnu de FtsZ1, et les interactions possibles entre ARC6 et PDV2

sont indiqués avec un point d'interrogation. ME : membrane de l'enveloppe externe, EIM : espace inter membranaire, MI : membrane interne.

Un schéma similaire, progressant à partir du stroma vers l'extérieur a été proposé pour la division des chloroplastes (Figure 7B). Le premier événement est la localisation de FtsZ (FtsZ1 et FtsZ2 dans les plastes verts), au niveau du futur site de division sous l'action concertée des protéines MinD, MinE et éventuellement ARC3, pour former l'anneau FtsZ. L'association de l'anneau à la membrane pourrait faire intervenir ARC6, une protéine bitopique de la membrane interne. La région N-terminale de ARC6 réside dans le stroma (Vitha et al., 2003) et interagit avec FtsZ2 mais pas FtsZ1 (tableau 4), grâce au motif C-terminal présent dans FtsZ2. L'association de FtsZ2, mais pas FtsZ1, avec la membrane, les interactions FtsZ2-FtsZ1 (tableau 4) et le rôle possible de FtsZ2 dans la polymérisation de FtsZ1 sont en faveur de ce modèle (El-Kafafi et al., 2005). Une fois l'anneau FtsZ assemblé, l'anneau interne (inner PD-ring) est formé entre l'anneau FtsZ et la membrane interne, puis c'est le tour de l'anneau intermédiaire (lorsque celui-ci existe, comme dans l'algue rouge), l'anneau externe (outer PD-ring) est ensuite mis en place à l'extérieur sur la membrane externe et la constriction du plaste peut débuter (Miyagishima et al., 2001a; Miyagishima et al., 2001c; Miyagishima et al., 2003). Vers la fin de la constriction, les protéines PDV1 et PDV2 se fixent sur la membrane externe et permettent la formation de l'anneau de dynamine entre la membrane externe et l'anneau externe. L'anneau supplémentaire présent dans l'espace inter-membranaire chez *C. merolae*, n'a pas été observé dans les chloroplastes des plantes. FtsZ2 pourrait remplir cette fonction dans les plastes verts puisque FtsZ2 a été trouvée associée à la membrane interne et à la membrane externe dans les chloroplastes d'épinards. FtsZ2 pourrait ainsi former un lien physique entre l'intérieur et l'extérieur du chloroplaste, permettant une coordination entre les deux appareils de division (El-Kafafi et al., 2005). Cette hypothèse a été confortée par l'isolement d'appareils de division qui contiennent les protéines FtsZ et dynamines, sans membrane, à partir de plastes de *C. merolae*, (Yoshida et al., 2006). Chez *Arabidopsis*, en plus de FtsZ2, d'autres protéines transmembranaires telles que ARC6 et PDV2 participeraient à ce continuum entre l'extérieur et l'intérieur du plaste. Les deux protéines ont toutes les deux une région présente dans l'espace transmembranaire, et l'analyse en double hybride montre une interaction possible entre elles (Glynn et al., 2007). Par analogie avec la séquence de mobilisation des protéines chez les bactéries, la séquence impliquée dans la division des plastes pourrait être la suivante: FtsZ1, FtsZ2 > ARC6, ARC3 > anneau interne > anneau extérieur > (PDV2, PDV1) > DRP5B, les protéines entre parenthèses

rentrant ensemble dans l'assemblage.

5. Mutants affectés dans la division des plastes.

Plusieurs mutants, en particulier chez *Arabidopsis*, présentent un phénotype caractérisé par un nombre différent de plastes s'accompagnant d'une variation de leur taille (tableau 5). Les gènes mutés codent des protéines qui ne sont pas directement impliquées dans l'appareil de division mais qui pour certaines d'entre elles participent à la régulation de la division des plastes. CRUMPLED LEAF (CRL) est un gène nucléaire qui code une protéine impliquée dans la morphogenèse de tous les organes de la plante et dans la division des plastes. Les analyses montrent que les défauts sont causés par des anomalies dans la division cellulaire et la différenciation (Asano et al., 2004). La protéine CRL de 30 kDa est localisée dans l'enveloppe du plaste. CRL est présente dans les plantes, fougères et cyanobactéries. CRL pourrait intervenir dans le couplage entre la division cellulaire, la division des plastes et la différenciation des plastes. La régulation entre les deux cycles de division a pu être confirmée avec l'implication de la protéine CDT1 qui est adressée à la fois dans le noyau et dans le plaste (Raynaud et al., 2005). CDT1 est une cycline-dépendante kinase qui participe à la formation du complexe de pré-replication de l'ADN nucléaire. Une diminution de l'expression de CDT1 entraîne une augmentation des endorépliquations dans les feuilles de rosettes, et une forte diminution du nombre de plastes. Par analyse en double hybride et par BiFC, il a été montré que CDT1 interagissait avec ARC6 (Raynaud et al., 2005).

CRL et CDT1 sont deux protéines qui semblent participer au couplage entre le cycle cellulaire et la division des plastes. Une telle régulation permet le maintien d'un nombre constant de plastes dans les cellules après la division cellulaire. Ces résultats sont en accord avec l'expression régulée des gènes *FtsZ* au cours du cycle cellulaire dans les cellules BY2 de tabac (El-Shami et al., 2002).

Le groupe de Meyerowitz (Haswell and Meyerowitz, 2006) a montré qu'une régulation de la division des chloroplastes était possible au niveau de chloroplastes individuels. Le double mutant d'insertion, *mssl2 x mssl3*, présente une forte inhibition de la division des chloroplastes puisque les cellules de feuilles n'ont que quelques gros chloroplastes. Les deux protéines appartiennent à la famille des canaux mécanosensibles de petite conductance (MscS) qui s'ouvrent sous des tensions moyennes. Les deux protéines sont dans le stroma à proximité de l'enveloppe, avec une localisation similaire aux protéines MinD et MinE. De fait, les deux protéines MSL2 et MSL3 ont été trouvées à proximité de MinE, sans qu'une interaction

directe n'ait été démontrée. Il a été suggéré que les deux protéines permettent le relargage d'ions du plaste au cours de la division.

Tableau 5. Mutants d'*Arabidopsis* affecté dans le nombre de plastes. ? non étudié.

| Gène | Phenotype | Localisation | références |
|--|--|-----------------------------|-------------------------------|
| <i>CRUMPLED LEAF (CLR)</i> | -Morphogenèse de tous les organes altérées. Division des plastes réduites | Enveloppe des chloroplastes | (Asano et al., 2004) |
| <i>Cyclin Dependent 1 CDT1</i> | Surexpression induit une augmentation des endoréplifications et une réduction du nombre de plastes | Noyau et plaste | (Raynaud et al., 2004) |
| <i>Canaux mécanosensibles MSL2, MSL3</i> | Chloroplastes géants dans le double mutant | Pôles du chloroplaste | (Haswell et Meyerowitz, 2006) |
| ⁽¹⁾ <i>CRINKLED LEAVES 8</i> | CpDNA répllication diminuée Division réduite | ? | (Garton et al., 2007) |
| <i>Fatty Acid Desaturase FAD</i> | Chloroplastes petits. Augmentation du nombre de plastes | ? | (McCourt et al., 1987) |

⁽¹⁾Le gène code la grande sous-unité de la nucléotide réductase qui intervient dans la production de dNTPs.

La répllication de l'ADN chloroplastique semble aussi jouer un rôle dans la division des plastes. Le mutant *crinkled leaves 8*, qui n'exprime plus la grande sous-unité de la ribonucléotide réductase présente des défauts dans le développement des feuilles et la division des chloroplastes (Garton et al., 2007). La synthèse des lipides de l'enveloppe des plastes semble aussi intervenir dans la division des plastes. En 1987, le groupe de Chris Somerville aux Etats Unis a publié le phénotype d'un mutant *fad* (fatty acid desaturase) marqué par une forte baisse des pourcentages des acides gras polyinsaturés α -linoléinique (C18:3) et haxadécatriénoïque (McCourt et al., 1987). Les cellules de ces plantes mutantes contiennent des chloroplastes de plus petite taille avec des granas moins empilés. En revanche, le nombre de plastes dans ces plantes est largement augmenté de façon à compenser la perte en taille. Les auteurs pensent que la mutation montre un lien direct entre la composition en acides gras et le nombre de plastes dans la cellule.

D'autres mutants ont été caractérisés dans d'autres plantes. C'est le cas du mutant *suffulta* de tomate qui présente un défaut de division des chloroplastes dans les tissus verts de la plante, mais dont le nombre de chloroplastes dans les cellules du fruit est normal. Ce phénotype montre qu'un autre mécanisme, du moins dans certains tissus, permet la division des plastes (Forth and Pyke, 2006). Des mutants de gènes intervenant dans la synthèse de peptidoglycane (ou muréine) ont été décrits dans la mousse *Physcomitrella patens*. Bien que les chloroplastes ne contiennent pas ce polymère, contrairement aux cyanelles (le plaste des glaucocystophytes qui a conservé ce polymère présent dans la cyanobactérie), des gènes de synthèse sont présents dans la mousse mais aussi chez *Arabidopsis*. Chez *P. patens*, l'absence d'expression des gènes MurE (Murein E) et Pbp (Penicilline binding protein) entraîne une diminution de la division des chloroplastes (Machida et al., 2006).

La caractérisation de ces mutants montre clairement que d'autres gènes codent des protéines qui, bien que non impliquées directement dans la division des plastes, sont cependant nécessaires au maintien du nombre de plastes dans les cellules.

6. Présentation du sujet de thèse

Les plantes supérieures utilisent pour diviser leurs chloroplastes les produits de deux familles de gènes *FtsZ1* et *FtsZ2* alors que les bactéries n'utilisent qu'une seule protéine. Ce résultat soulève la question de savoir :

Pourquoi les plantes supérieures possèdent deux protéines distinctes FtsZ1 et FtsZ2 pour réaliser la division des plastes ?

L'un des objectifs majeurs de ma thèse était donc de déterminer *in planta* les fonctions des protéines *FtsZ1*, *FtsZ21* et *FtsZ22* (il existe deux isoformes *FtsZ2* dans *Arabidopsis*). Mon travail de thèse a débuté en continuant les études préalablement menées sur le mutant *FtsZ1* d'*Arabidopsis thaliana* par Sayed El-Kafafi et en poursuivant le travail sur l'obtention des mutants *FtsZ21* et *FtsZ22*.

La caractérisation des mutants *nulls FtsZ1*, *FtsZ21* et *FtsZ22* ainsi que des doubles mutants et du triple mutant d'*Arabidopsis*, nous permet de suggérer des fonctions nouvelles pour les protéines *FtsZ* de plante.

MATERIELS ET METHODES

MATERIELS ET METHODES

1. Matériels et outils informatiques

1.1. Matériel végétal

Les plants d'*Arabidopsis thaliana* écotypes Wassilewskija (Ws) et columbia (Col) ont été utilisés pour ce travail. Les mutants étudiés ont été fournis par :

- Génoplante (<http://genoplante-info.infobiogen.fr>) mutant FtsZ1 (*A. thaliana* Ws)
- Salk Institut (<http://signal.salk.edu/>) pour les mutants FtsZ21 et FtsZ22 (*A. thaliana* Col)

Des graines d'épinard (*Spinacea oleracea*) géant d'hiver, qui est une plante de la famille des chénopodiacées sont achetées dans le commerce pour être cultivées. C'est un matériel permettant l'extraction de grandes quantités de chloroplastes nécessaires pour des analyses biochimiques.

Les cellules utilisées pour l'étude des interactions entre l'amidon et les protéines FtsZ au cours de ce travail sont les cellules de tabac (*Nicotiana tabacum* L.C.N) T-BY-2 (Tobacco Bright Yellow two). Ces cellules ont été obtenues à partir de cals de jeunes plantes par le "Tobacco Science Research Laboratoy, Japan Tobacco, Inc", (Kato *et al*, 1972) que nous remercions pour nous avoir laissé utiliser ces cellules. Les caractéristiques principales de ces cellules sont leur vitesse de croissance très élevée, l'absence de nicotine, l'absence de couleur verte qui résulte de la présence de proplastates et la facilité que l'on a pour effectuer des transitions de proplastates en amyloplastates.

1.2. Souches de bactéries

Deux souches d'*Escherichia coli* ont été utilisées :

XL1-Blue (Stratagene) : endA1 gyrA96(nalR) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F' [::Tn10 proAB+ lacIq Δ(lacZ)M15] hsdR17(rK- mK+).

M15[pREP4] (Qiagen) : NaI^S Str^S Rif^S Thi⁻ Lac⁻ Ara⁺ Gal⁺ Mtl⁻ F⁻ RecA⁺ Uvr⁺ Lon⁺ Δ(lacZ)M15 lacI kan^r.

Une souche d'*Agrobacterium tumefaciens* GV3121 résistante à la gentamycine et à l'ampicilline.

1.3. Vecteurs de clonage

pBluescript®SK(-/+)

Le plasmide pBluescript est un dérivé de pUC19. En plus de l'origine de réplication bactérienne, il possède une origine de réplication d'un phage filamenteux. Les – et + indiquent l'orientation du brin d'ADN qui est synthétisé lors de l'infection par un phage helper. Il contient le gène de la β -lactamase qui apporte une résistance à l'ampicilline aux bactéries transformées par ce vecteur. La cassette de clonage est située, en phase, au niveau de l'extrémité 5' du gène de la β -galactosidase. Ce dernier est placé sous le contrôle d'un promoteur inductible par l'IPTG. Cette organisation permet de réaliser l' α -complémentation, système de sélection des colonies ayant inséré un fragment d'ADN dans la cassette de clonage. En présence d'IPTG, la β -galactosidase est exprimée et est capable d'hydrolyser le X-gal (un analogue de son substrat naturel le β -galactose) rajouté dans le milieu de culture. Cette hydrolyse libère un produit bleu qui colore les colonies bactériennes. L'insertion d'un fragment d'ADN dans la cassette de clonage interrompt le gène de la β -galactosidase qui n'est plus produite. Ainsi en présence d'X-gal, les colonies resteront blanches. En plus, ce vecteur possède les promoteurs T3 et T7, situés de part et d'autre de la cassette de clonage. Ces promoteurs permettent la synthèse de transcrits *in vitro* en présence de l'ARN polymérase correspondante.

QiaXpress (pQE, Quiagen)

Les plasmides de la série pQE sont des vecteurs d'expression dérivés du pDS56/RBSII et du pDS781/RBSII-DHFRS.

Ce plasmide contient :

- Un élément promoteur-opérateur optimisé comprenant le promoteur T5 qui est reconnu par l'ARN polymérase d'*E. coli* ainsi que deux séquences opératrices lac qui augmentent la fixation du répresseur lac et permettent une répression efficace du promoteur T5. Cette répression est annihilée en présence d'IPTG.
- Un site de fixation du ribosome synthétique, RBSII pour augmenter les taux de traduction
- Une séquence codant pour une étiquette 6xHis
- Deux terminateurs de transcription forts pour éviter la translecture
- Le gène de la β -lactamase conférant la résistance à l'ampicilline

pFP101

Le vecteur pFP101 que nous avons utilisé dans cette étude offre une résistance à la spectinomycine (Sigma) aux clones d'*E. coli* ou d'agrobactéries transformés (50 µg/ml final). Il s'agit d'un vecteur permettant d'exprimer dans la plante un gène d'intérêt, cloné en aval d'un double promoteur 35S CaMV (voir plus loin 2.1.4 Transformation stable d'*Arabidopsis thaliana*). De plus, pFP101 comporte le gène *GFP* sous contrôle d'un promoteur « graine spécifique » At2S3 (protéine At2S3 étant une protéine de réserve de la graine d'*Arabidopsis*), il permet de sélectionner directement les graines transformées T0, sous lumière bleue (longueur d'onde d'excitation de la GFP dans le bleu à 450 nm) à l'aide d'une loupe (U-RFL-T, OLYMPUS). Les transformants d'*Arabidopsis* sont alors cultivés en terre.

1.4. Oligonucléotides

Les oligonucléotides synthétiques ont été fournis par Eurogentec, Sigma, Invitrogen.

1.5. Outils informatiques

Les analyses de restriction ont été réalisées à l'aide du logiciel *DNA STRIDER*[®].

Les principaux sites utilisés pour les recherches dans les bases de données et les alignements de séquences sont :

NCBI : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Site des mutants SALK : <http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>

Base de données d'*Arabidopsis*, TAIR : <http://www.arabidopsis.org/index.jsp>

MIPS : <http://mips.gsf.de/>

MPSS : <http://mpss.udel.edu/>

TIGR : <http://www.tigr.org/>

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

Outils protéomiques : <http://us.expasy.org/tools/>

Les logiciels de prédiction d'adressage aux organelles :

Predotar : <http://urgi.versailles.inra.fr/predotar/predotar.html>

TargetP : <http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>

ChloroP : <http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>

2. Méthodes

2.1. Méthodes concernant les plantes

2.1.1. Cultures en condition stérile d'*Arabidopsis thaliana*

Les graines sont stérilisées dans une solution d'hypochlorite de calcium. Une pastille de chlore actif INOV'CHLORE d'environ 1,5 g (INOV'CHEM) est dissoute dans 40 ml d'eau distillée. 10 ml de la solution sont ensuite ajoutés à 40 ml d'éthanol absolu. Toutes les étapes qui suivent ont lieu sous hotte à flux laminaire. Les graines sont stérilisées par agitation dans la solution de chlore en raison d'environ 500 graines/ml durant 10 min. Les graines sont ensuite lavées sous agitation dans de l'éthanol absolu durant 3 min puis mises à sécher sous la hotte à flux laminaire horizontal.

Les plantes sont cultivées sur milieu MSAR (koncz et al., 1990) constitué des milieux micro (1x) et macro (0,2x), de saccharose (0,5% m/v) et d'agar (0,6% m/v). Les milieux micro/macro (Murashige et Skoog Basal Salt Micronutrient/Macronutrient) sont vendus sous forme de poudre par *Sigma*. La kanamycine est utilisée à une concentration finale de 50 µg/ml pour la sélection des plantes mutantes. Après semis *in vitro*, les graines subissent une stratification au froid afin d'augmenter l'efficacité de la germination et sa synchronisation. Pour cela elles sont placées à une température de 4°C à l'obscurité durant 48 heures avant transfert en chambre de culture *in vitro*, réglée sous les conditions suivantes :

- Cycle jours longs (16 h lumière/ 8 h obscurité)
- Intensité lumineuse : environ 70 µmoles de photons/m²/s
- Température constante maintenue à 24°C
- Renouvellement de l'air permanent

2.1.2. Culture en terre ou avec vermiculite

Des graines peuvent être semées et cultivées sur du terreau (Nutrilon ou Hydro) imbibé d'eau et autoclavé (20 min à 120°C). Du Temik 10G (nématocide et insecticide systémique) est ajouté à la terre (environ une dizaine de granulés par petit pot) avant d'y placer les graines.

Les graines d'épinard peuvent être semées également sur de la vermiculite préalablement lavée avec de l'eau. Les graines sont directement semées en terre ou sur vermiculite sans stérilisation préalable. 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. Les graines subissent

également une stratification à 4°C pendant 48 h, avant d'être transférées en chambre de culture.

Généralement les plantules et plantes d'*Arabidopsis* sont cultivées en conditions de jours longs (16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité) :

- En salle de culture *in vitro*, l'intensité de la lumière est d'environ 70 μmoles de photons/ m^2/s , pour une température constante de 24°C. L'air y est renouvelé constamment et l'hygrométrie non contrôlée.

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

Les plantules d'*Arabidopsis* peuvent aussi être cultivées en jours courts (10 heures de lumières et 14 heures d'obscurité).

L'épinard est considéré comme une plante de jours courts. Les plantules et plantes d'épinard seront cultivées dans des luminicuves dans les conditions suivantes :

- 10 heures de lumière et 14 heures d'obscurité
- La température est de 21°C le jour et 18°C la nuit

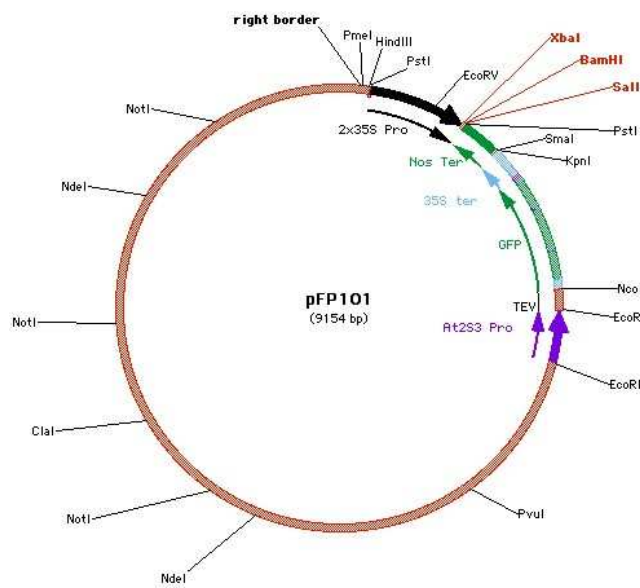
L'intensité lumineuse et l'hygrométrie sont les mêmes que dans la salle de culture en jours longs.

2.1.3. Les croisements chez *Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis thaliana est une plante à autofécondation stricte. Il est nécessaire de réaliser les croisements manuellement et sous la loupe à l'aide de pinces fines. Les croisements sont réalisés sur des plantes de 4 à 5 semaines possédant une hampe florale. Une fleur choisie comme parent femelle est émasculée puis fécondée par le pollen du parent mâle. Pour effectuer les croisements, les étamines d'un bouton floral sont excisés juste avant son ouverture (avant l'anthèse). Le pistil ainsi dégagé est fécondé avec le pollen mature d'une étamine du parent mâle. Les autres fleurs de la plante sont enlevées pour qu'il n'y ait pas d'autofécondation possible. Après 15 à 20 jours, les siliques contenant les graines matures sont récoltées. Ces graines pourront être semées une semaine plus tard.

2.1.4. Transformation stable d'*Arabidopsis thaliana*

Les plantes d'*Arabidopsis* sont transformées par immersion des fleurs dans une culture d'*Agrobacterium tumefaciens* contenant le plasmide Ti d'intérêt (Clough et Bent 1998). Une culture d'*A. tumefaciens* est amenée en phase stationnaire dans 200 ml de LB à 28°C (DO 600 nm de 1,3 à 1,5). Après centrifugation à 5 000g pendant 15 min à 4°C, le culot de bactéries est repris dans le milieu d'infiltration (saccharose 5%, détergent Silwet à 0,05%) à une DO finale de 0,6 à 600 nm. Les boutons floraux des plantes d'*A. thaliana* sont plongés dans la solution d'Agrobactéries pendant 5 à 10 secondes afin d'introduire l'ADN-T dans les gamètes. Les plantes sont ensuite recouvertes d'un film plastique pour limiter l'évaporation et sont laissées durant 24 heures dans une chambre de culture en évitant l'exposition directe à la lumière. Le vecteur pFP101 2x35S:XbaI-BamHI-Sall:NosTer que nous avons utilisé dans cette étude permet une expression de la GFP uniquement dans les graines grâce à un promoteur "graine spécifique", (voir schéma ci-dessous). Les plantes ayant intégré au moins un ADN-T sont repérées sous la loupe avec le filtre GFP. Les graines transformées sont ensuite semées en terre afin de générer les plantes transformées.



Carte du vecteur pFP101 2x35S:XbaI-BamHI-Sall:NosTer, construite par G. Lambert et F. Parcy (Institut des Sciences végétales, Gif sur Yvette).

(<http://www.isv.cnrs-gif.fr/jg/alligator/vectors.html>)

2.1.5. Dosage des pigments des feuilles d'*Arabidopsis thaliana* par HPLC

70 mg de feuilles fraîchement prélevées sont immédiatement refroidis sur la glace puis broyés en présence de 200 µl d'acétone contenant 10 µl de 1 M Tris pH7,5 (afin d'éviter l'acidification du broyat). Toutes les opérations s'effectuent à l'obscurité et au froid.

L'échantillon est incubé pendant 30 min à l'obscurité et au froid sous courant d'azote. Après centrifugation pendant 10 min à 12 000 rpm et 4°C, le surnageant est transféré dans un nouveau tube. Le culot restant est extrait une deuxième fois avec l'acétone en 'vortexant' (et en broyant de nouveau si nécessaire le culot) puis centrifugé. L'opération est répétée jusqu'à l'obtention d'un culot blanc. Les surnageants sont regroupés et le volume peut être réduit par évaporation complète sous vide (ou courant d'azote). Les pigments sont repris dans 200 µl de DiMéthylFormamide (DMF) à l'obscurité et au froid. Après avoir fait passer un courant d'azote sur l'échantillon la solution est centrifugée 2 fois pendant 15 minutes à 14 000 rpm à 4°C pour éliminer tout résidu insoluble (qui risquerait de colmater la colonne HPLC). 50 µl sont prélevés pour injection sur une colonne HPLC.

L'analyse est réalisée sur une chaîne Varian comprenant un passeur automatique ProStar 410, une pompe ProStar 240, et un détecteur à barrettes de diodes (modèle 330). Une colonne en phase inverse C30 de 5 microns (250 x 4,6 mm) de marque YMC (Kyoto, Japon ; Schermbeck, Allemagne) a été utilisée avec une pré-colonne de même type (20 x 40 mm) selon le protocole décrit par Fraser et al. (2000) avec quelques modifications mineures. La phase mobile comprend de l'eau/méthanol (20v/80v, en présence d'acétate d'ammonium à 0,2%) (A), du méthanol (B) et du tert-methyl-butyl-ether (C). L'élution consiste en 10 min de solvant A (5%) et B (95%), puis de 5% A, 80% B et 15% C suivi d'un gradient pendant 25 min jusqu'à obtenir une solution finale 5% A, 30% B, 65% C. Les flux sont de 1 ml/min et la température de la colonne est maintenue à 30°C. Les pigments sont identifiés par leur temps de rétention et leur spectre dans le visible par comparaison à des standards (logiciel PolyView 2000, Varian).

2.1.6. Mesure de l'efficacité du photosystème II (PSII)

La mesure de la fluorescence de la chlorophylle est effectuée sur des feuilles intactes en utilisant le PAM-2000 (Walz, Effeltrich, Germany). L'efficacité maximum du PSII est estimée après une adaptation des feuilles à l'obscurité pendant 30 min, avec le ratio F_V/F_{max} . F_V (Fluorescence variable de la chlorophylle) = $(F_{max} - F_0)$, F_0 est le niveau initial de la

fluorescence sous la lumière rouge (655 nm) modulé à 600 Hz, et F_{\max} est le niveau maximum de fluorescence induit par un pulse 800 millisecondes d'une forte lumière blanche avec une densité du flux des photons à $4\,000\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$.

2.2. Purification et fractionnement des chloroplastes

Les mêmes techniques sont utilisées pour la préparation des chloroplastes intacts et le fractionnement des compartiments plastidiaux chez *Arabidopsis thaliana* et l'épinard *Spinacia oleracea*.

2.2.1. Purification de chloroplastes intacts

Les chloroplastes des feuilles d'*Arabidopsis* ou d'épinard sont purifiés, selon la méthode de Douce & Joyard (1982). Toutes les étapes sont réalisées à 4°C. Les feuilles sont hachées en présence de tampon de broyage (0,4 M Sorbitol ; 40 mM Tricine pH 8 ; 5 mM EDTA, 1g/L BSA) dans un broyeur à hélice, 2 à 3 fois pendant 2-3 secondes (broyage à vitesse lente). Le broyat est ensuite filtré sur 4 couches de gaze puis sur une toile à bluter (50 μm de vide de maille). Le filtrat est centrifugé pendant 10 min à 3 500 rpm (rotor Beckman JA-10). Les culots, enrichis en chloroplastes, sont délicatement repris dans du tampon de lavage (0,4 M Sorbitol; 20 mM MOPS/KOH pH 7,8 ; 1 mM EDTA, 2 mM MgCl_2) et filtrés à nouveau sur une toile à bluter pour homogénéiser la suspension. Un gradient de Percoll (Pharmacia) est préalablement préformé par centrifugation dans le rotor Beckman JA-25-5 à partir de Percoll 50% (v/v), préparé dans du tampon de lavage, centrifugé à 18 000 rpm pendant 50 min. La suspension est déposée sur le gradient, puis centrifugée pendant 10 min à 7 500 rpm (rotor Beckman JS 7-5) afin de séparer les contaminants extraplastidiaux et les chloroplastes cassés des chloroplastes intacts. Après une centrifugation, les chloroplastes brisés et le matériel non chloroplastique pénètrent peu dans le gradient de Percoll et forment une bande supérieure. Les chloroplastes intacts bien démarqués forment une deuxième bande à l'intérieur du gradient préformé.

Afin d'éliminer le Percoll, les chloroplastes intacts sont dilués par 6 à 7 volumes de milieu de lavage et centrifugés 10 min à 3 500 rpm (rotor Beckman JA 25.5). Le culot est récupéré et un deuxième lavage est effectué à la même centrifugation mais seulement pendant 5 min. Les chloroplastes sont finalement remis en suspension dans un volume minimal de tampon de lavage.

2.2.2. Fractionnement des chloroplastes

Le fractionnement des chloroplastes est réalisé à partir du culot de chloroplastes intacts (Douce et al., 1973 ; Block et al., 2002). Les chloroplastes purifiés sont repris dans le tampon d'éclatement hypotonique (tampon R : 10 mM MOPS/KOH pH 7,8 ; 4 mM MgCl₂; additionné des inhibiteurs de protéases 1 mM acide caproïque ; 1 mM PMSF ; 1 mM benzamidine) induisant l'éclatement des chloroplastes. Les ions Mg²⁺ permettent le maintien de l'intégrité des membranes thylacoïdiennes et préviennent ainsi la contamination de l'enveloppe par des vésicules membranaires issues des thylacoïdes. La solution de chloroplastes éclatés est alors déposée sur un gradient discontinu de saccharose (0,6 M-0,93 M, soit 4 ml de chaque concentration de saccharose préparé dans le tampon R sans les inhibiteurs de protéases). Après centrifugation (rotor Aventis JS-24-15) 1 heure à 20 000 rpm (72 000g), trois fractions différentes sont récupérées :

- La couche supérieure du gradient qui contient les protéines solubles présentes dans le stroma.
- Le culot vert contenant les thylacoïdes.
- L'enveloppe des chloroplastes présente à l'interface des 2 couches de saccharose.

Le culot de thylacoïdes est remis en suspension dans le tampon R et homogénéisé avec un potter. Les enveloppes sont diluées par 3 volumes de tampon R et concentrées par centrifugation pendant 1 h à 24 000 rpm (rotor Aventis JS-24-15). Le culot est repris dans le tampon R et stocké à -80°C.

2.2.3. Isolation des grains d'amidon

Les cellules BY-2 de *Nicotiana tabacum* obtenues après culture sont homogénéisées en les broyant dans l'azote liquide à l'aide d'un mortier. L'homogénat est mixer vigoureusement avec le tampon d'extraction (10 mM MOPS/KOH pH 7,2 ; 5 mM EDTA ; 10% glycérol). La suspension est déposée sur du Percoll (pharmacia) 90% (v/v) préparé dans le tampon d'extraction, centrifugé 40 min 4°C à 10 000 g (microcentrifugeuse). Le culot d'amidon est lavé 6 fois dans l'eau distillée pour éliminer le Percoll ainsi que tous les autres contaminants cellulaires avec la même centrifugation pendant 10 min pour chaque lavage. L'amidon ainsi obtenu est stocké dans 20% éthanol à 4°C.

2.3. Méthodes concernant l'ADN

2.3.1. Extraction d'ADN à partir de plantes pour analyse par PCR

Le broyage des feuilles s'effectue à température ambiante. 25 à 50 mg de matière fraîche sont broyés dans un tube Eppendorf contenant 100 µl de tampon d'extraction (Tris-HCl pH 8 0,2 M ; NaCl 0,25 M ; EDTA 0,025 M ; SDS 0,5 % p/v) à l'aide d'un piston bleu (Polylabo). 100 µl de tampon sont de nouveau ajoutés et le broyage poursuivi. Le broyat est alors 'vortexé' puis centrifugé 5 min à 13-15 000 rpm, à température ambiante. Les acides nucléiques retrouvés dans le surnageant sont alors précipités en ajoutant 200 µl d'isopropanol. Après homogénéisation, un culot est obtenu par une centrifugation à 13-15 000 rpm pendant 5 min à 4°C. Le culot est alors rincé à l'éthanol 70 %, séché, puis remis en suspension dans 50 µl de tampon TE (10 mM Tris-HCl - 1 mM EDTA, pH 8). 2 µl de cette suspension sont alors utilisés pour effectuer un criblage par PCR (voir protocole PCR, ci-dessous). Les produits PCR sont séparés sur un gel à 1% d'agarose.

2.3.2. Electrophorèse sur gel d'agarose

Cette technique permet de séparer des molécules d'ADN selon leur taille. Du tampon de charge 50% (v/v) glycérol, 0,1 M EDTA, 0,1% (p/v) SDS, 0,05% (p/v) bleu de bromophénol, 0,05% (p/v) xylène cyanol est additionné à la solution d'ADN, qui est ensuite déposée sur un gel d'agarose (0,7 à 2%, selon la résolution désirée) dans lequel a été incorporé du bromure d'éthidium 0,5 µg/ml. L'électrophorèse est effectuée dans du tampon TBE 0,5x (0,045 M Tris-HCl ; 0,04 M borate ; 1 mM EDTA) à 100 Volts. L'ADN, coloré par le bromure d'éthidium intercalé entre les plateaux de bases, est visualisé sous ultraviolets.

2.3.3. Purification des fragments d'ADN issus de gels d'agarose

Des fragments de gel d'agarose contenant l'ADN d'intérêt peuvent être découpés sous UV. L'ADN est ensuite extrait à l'aide du kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen). L'agarose est solubilisé dans du perchlorate de sodium puis l'ADN est retenu par une membrane de silice. L'agarose et le tampon d'électrophorèse résiduels sont éliminés lors d'un lavage avec un tampon contenant de l'éthanol. L'ADN est finalement élué de la membrane par de l'eau stérile ou du TE (10mM Tris-HCl pH 8 ; 1 mM EDTA pH 8).

2.3.4. Digestion de l'ADN par des enzymes de restriction

La digestion d'ADN par une enzyme de restriction se fait selon les indications du fournisseur de l'enzyme. Une réaction de digestion contient 1-2 µg d'ADN, 1/10^{ème} de volume du tampon de restriction 10x approprié et quelques unités de l'enzyme de restriction. La réaction est placée 1 à 2 h à 37°C. Si une deuxième digestion par une enzyme utilisant un autre tampon de restriction doit être réalisée, l'ADN de la première réaction de digestion est extrait par un traitement au phénol/chloroforme 1/1 (v/v) puis précipité à l'éthanol.

2.3.5. Ligation de deux fragments d'ADN

Deux fragments d'ADN, digérés avec des enzymes de restriction donnant des extrémités cohésives, peuvent être reliés grâce à l'ADN ligase du bactériophage T4. La quantité d'ADN nécessaire est calculée selon la formule suivante (pour un fragment 1 plus petit que le fragment 2, excès molaire du plus petit fragment : 5 x) : quantité de fragment 1 (en ng) = 5 x quantité de fragment 2 (en ng) x (taille du fragment 1 / taille du fragment 2).

La réaction doit être effectuée dans un volume final minimum afin de faciliter le contact vecteur-insert (10 à 15 µl en général). Le volume est ajusté avec de l'eau distillée stérile et le mélange incubé à 15°C pendant une nuit.

2.3.6. Transformation des bactéries chimio-compétentes

Nous avons utilisé le protocole établi par Inoue *et al.*, (1990) : Une culture de bactéries (XL1 blue) est cultivée dans 250 ml de milieu SOB (20 g bactotryptone, 5 g bacto-yeast extract, 0.5 g NaCl) à 28°C sous agitation (200 rpm). Une fois arrivée à une absorbance de 0.6 à 600 nm, la culture est mise 10 min dans la glace avant centrifugation (10 min 2 500g à 4°C). Le culot est remis en suspension dans 80 ml de TB froid (PIPES 10 mM, pH6,7 ; MnCl₂ 55 mM ; CaCl₂ 15 mM ; KCl 250 mM). Après 10 min d'incubation, une centrifugation identique à la précédente est réalisée. Le culot est à nouveau repris dans 20 ml de TB (toujours à 4°C) et du DMSO est ajouté jusqu'à une concentration finale de 7%. Après une dernière incubation de 10 min à 4°C, la suspension est répartie en fractions aliquotes qui sont immédiatement congelées dans l'azote liquide avant d'être conservées à -80°C.

Les bactéries compétentes fraîchement décongelées sont mises en présence avec 10 ng de l'ADN plasmidique ou 10 µl d'une réaction de ligation. L'ensemble est placé pendant 30 min à 0°C. Le choc thermique a lieu pendant 60 secondes à 42°C puis les bactéries sont immédiatement transférées dans la glace pendant 10 min. Elles sont ensuite diluées dans

400 µl de milieu LB, avant d'être agitées 1 h à 37°C. 100 µl de cette suspension sont étalés sur une boîte de Pétri contenant un milieu LB-agar additionné de l'antibiotique et de X-Gal (40 mg/L) et d'IPTG (100 mg/L). Les boîtes sont alors placées à 37°C pendant la nuit. Les transformants (colonies blanches) seront ensuite sélectionnées et analysées.

2.3.7. Transformation par électroporation

Les bactéries *E. coli* ou *A. tumefaciens* (diluée au 1/100^{ème} à partir d'une préculture) sont cultivées dans 500 ml de milieu LB jusqu'à ce que la turbidimétrie atteigne une DO de 0,6 à 600 nm. La culture est refroidie sur la glace pendant 15 à 30 min avant d'être centrifugée à 4°C (4 000g, 15 min). Pour *E. coli* (Sambrook et al., 1989), le culot bactérien est remis en suspension dans un volume équivalent (500 ml) de glycérol 10% (v/v) froid. Plusieurs cycles de centrifugation sont effectués avec remise en suspension des bactéries dans des volumes successifs de 250, 10 puis 1 à 2 ml de glycérol 10% (v/v). Pour *A. Tumefaciens* (Ebert et al., 1987), les lavages des bactéries s'effectuent avec 3 remises en suspension successives dans l'eau (1/10 du volume de culture) puis 1 lavage dans du glycérol 10% (v/v) et enfin une remise en suspension dans 2 ml de glycérol 10% (v/v). Dans les deux cas, la suspension bactérienne est répartie en fractions aliquotes de 40 µl avant d'être congelée dans l'azote liquide puis stockée à -80°C.

Pour les deux souches bactériennes, 40 µl de la suspension de bactéries électro-compétentes sont mis en présence de 10 ng de plasmides contenus dans de l'eau distillée. Le mélange est transféré dans une cuve d'électroporation froide de 0,2 cm d'espacement d'électrodes. Les bactéries subissent une décharge électrique de 2,5 kV délivrée par un électroporateur (BioRad) calibré sur 25 µF de capacitance et respectivement 200 ohms de conductance pendant 4,5 millisecondes (ms) pour *E. coli* et 400 ohms pendant 9 ms pour *A. tumefaciens*. Les bactéries sont ensuite rapidement diluées dans 1 ml de milieu LB sans l'antibiotique, puis incubées pendant 1 h à 37°C (28°C pour *A. tumefaciens*). 50 ou 200 µl de culture sont étalés sur un milieu LB solide contenant l'antibiotique de sélection.

2.3.8. Extraction de l'ADN plasmidique

La purification de l'ADN plasmidique est effectuée selon le protocole de lyse alcaline (Birnboim et Doly, 1979). L'extraction est réalisée à partir de 1,5 ml d'une culture bactérienne. Les cellules sont centrifugées à 14 000 rpm pendant 30 sec. Le culot bactérien est remis en suspension dans 100 µl de GTE (Glucose 1 % (p/v), 25 mM Tris-HCl pH 8, EDTA 10 mM

pH 8, RNase A 0,01 % (p/v)). La lyse alcaline des bactéries est effectuée par addition de 200 µl de NaOH 0,1 N, SDS 0,5 % (p/v). Les protéines et l'ADN chromosomique sont précipités par addition de 150 µl d'acétate d'ammonium (AcNH₄ 7,5 M), suivie d'une centrifugation de 15 min à 14 000 rpm à 4°C. L'ADN plasmidique contenu dans le surnageant est précipité par addition de 1 ml d'éthanol 95%, suivi d'une centrifugation de 15 min à 14 000 rpm. Le culot, dissous dans 300 µl d'H₂O auxquels sont ajoutés 150 µl de NH₄Ac 7,5 M est ensuite incubé à -20°C durant 30 min pour éliminer de nouveau les protéines et centrifugé pendant 15 min à 4°C. L'ADN plasmidique présent dans le surnageant est précipité par addition de 1 ml d'éthanol 95 % suivi d'une centrifugation (14 000 rpm, 10 min). Le culot est rincé dans 1 ml d'éthanol 70%, brièvement séché et repris dans 40 µl de TE (10 mM Tris-HCl, pH 8,0 ; 1 mM EDTA).

2.3.9. Maxi préparation de plasmides

Les plasmides sont préparés en utilisant le kit Qiagen à partir de maxi-cultures bactériennes (200 ml). Après 12 heures de culture à 37°C, on récupère les bactéries par une centrifugation à 5 000 rpm pendant 15 min (rotor JA14, Beckmann). Le culot bactérien est repris dans 10 ml de solution P1 (50 mM Tris-HCl, pH 8,0 ; 10 mM EDTA ; 100 µg/ml RNase A). Les bactéries sont lysées par ajout de 10 ml de la solution P2 (200 mM NaOH ; 1% SDS (w/v), l'ensemble est mélangé avant une incubation de 5 min à température ambiante. Le chromosome bactérien est sélectivement précipité avec l'addition de 10 ml de la solution P3 (0.3 M acétate de potassium). On agite et place le tube pendant 20 min à 0°C dans la glace.

Après une centrifugation à 14 000 rpm (rotor JA25.5, Beckmann) pendant 30 min à 4°C, le surnageant récupéré est passé sur une colonne Qiagen (équilibrée par une solution d'équilibration : 750 mM NaCl ; 50 mM MOPS, pH7.5 ; 15% (v/v) isopropanol ; 0.15% (v/v) Triton X-100). La colonne est rincée deux fois avec 30 ml de la solution de rinçage (1 M NaCl ; 15% isopropanol ; 50 mM MOPS, pH 7,0). L'ADN est élué de la colonne par 15 ml de la solution d'éluion (1.15 M NaCl ; 50 mM Tris-HCl, pH8.5 ; 15% isopropanol). L'ADN plasmidique est précipité par l'addition de 10 ml d'isopropanol. Le culot de plasmide est obtenu après centrifugation à 14 000 rpm pendant 30 min à 4°C. Le culot est rincé par 5 ml d'éthanol 70%, suivi d'une centrifugation pendant 5 min (14 000 rpm à 4°C). Le culot rapidement séché à l'air est repris dans 100 µl de TE.

2.3.10. Réactions d'amplification en chaîne (PCR)

La PCR (Polymerase Chain Reaction) est une technique *in vitro* consistant à amplifier sélectivement une séquence particulière d'ADN par action répétée d'une ADN polymérase thermostable, Taq (*Thermus aquaticus*).

Pour les clonages, la Taq de chez FinnZymes (DyNAzyme EXT™ PCR Kit) a été utilisée car elle est non seulement correctrice d'erreur « proof reading » mais en plus permet le « TA cloning » c'est-à-dire l'addition de A aux extrémités 5' et 3' du fragment généré. Pour le criblage des plantes mutantes, c'est la Taq recombinante de chez *Bioline* (Taq DNA Polymerase recombinant) qui a été préférée, car moins chère.

Le mélange réactionnel standard comprend : Tris-HCl 50 mM pH 8,5 ; MgCl₂ 1,25 mM ; amorces 1 μM ; l'ADN matrice et la Taq polymérase 0,5 U. L'ADN est dénaturé à 94°C pendant 2 min puis soumis à une amplification de 30 cycles dans l'automate. Chaque cycle comprend une phase de dénaturation pendant 1 min à 94°C, une phase d'hybridation des amorces pendant 1 min à 55°C (cette température dépend de la T_m des amorces utilisées) et une phase d'élongation du brin d'ADN pendant 2 min à 72 °C. L'amplification est achevée par une incubation finale à 72°C pendant 10 min pour terminer la synthèse des fragments.

2.3.11. Séquençage d'ADN

La méthode utilisée est basée sur la technique de Sanger (Sanger et al., 1977). 1 μg d'ADN à séquencer doit être préparé dans un volume final de 5 μl . Les séquences sont obtenues grâce à l'utilisation du séquenceur automatique de type « ABI 373 XL stretched » (Applied Biosystems). L'ADN est amplifié par PCR à partir d'une amorce en présence de dNTP et ddNTP. Chacun des 4 ddNTP est couplé à un fluorophore spécifique. Cette étape est réalisée avec le kit « BigDye terminator » (Perkin-Elmer).

Les amorces choisies pour séquencer les divers fragments clonés sont localisées de part et d'autre de la cassette de clonage. Les produits de réaction sont séparés sur un gel d'acrylamide par électrophorèse. Un logiciel d'analyse permet d'associer le fluorophore, détecté par un système optique, au ddNTP correspondant marquant l'extrémité 3' du fragment.

2.4. Analyse de l'ADN génomique des plantes par hybridation moléculaire

2.4.1. Extraction de l'ADN génomique par CTAB

Broyer 1 g de feuilles dans de l'azote liquide, puis ajouter au broyat 7,5 ml de tampon CTAB (bromure d'hexadécyltriméthylammonium) : 2 % (p/v) CTAB, 2 % (p/v) polyvinylpyrrolidone 40, 2 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCL pH 8 et 5 % (v/v) β -mercaptoéthanol (ajouté juste avant l'utilisation sous hotte), préchauffer à 60°C et bien 'vortexer'. Incuber pendant une heure à 65 °C avec agitation, puis ajouter un volume (7,5 ml) de chloroforme : alcool isoamylique (24:1) dans la solution de feuille, broyer à température ambiante et agiter manuellement en inversant les tubes pendant 5 min. Le mélange est centrifugé pendant 10 min à 16 300 g à 4 °C pour accélérer la phase de séparation. Si nécessaire cette étape est répétée sur le surnageant pour clarifier la phase aqueuse. Récupérer le surnageant et ajouter 2/3 du volume prélevé d'isopropanol conservé à 4 °C, inverser les tubes doucement puis laisser précipiter au moins 30 min à -20 °C. Centrifuger pendant 5 min à 13 000 g à 4 °C, éliminer le surnageant et ajouter 10 ml de tampon de lavage (80 % d'éthanol, 10 mM d'ammonium acétate) puis placer sur un agitateur vertical pendant 30 min. Une nouvelle centrifugation a lieu pendant 5 min à 13 000 g à 4 °C, le surnageant est éliminé et l'ADN est séché à l'air libre pendant 20 min. Le culot d'ADN est suspendu dans 100 à 300 μ l de TE, puis incubé pendant 10 min à 60 °C. La solution est ensuite traitée avec la RnaseA 30 min à 37 °C. L'ADN extrait peut être stocké à 4 °C, après dosage au spectrophotomètre et migration sur gel d'agarose de 0,8% afin d'estimer la quantité

2.4.2. Digestion enzymatique de l'ADN

Les digestions de l'ADN génomique sont réalisées par des enzymes de restriction, des endonucléases, qui coupent l'ADN double brin en des sites spécifiques (site de restriction). La digestion enzymatique est réalisée pendant la nuit. Ces réactions sont réalisées dans un volume de 100 μ l dans les conditions suivantes :

| | |
|---------------------------------------|-------------|
| ADN génomique 5 μ g | X μ l |
| Tampon 10x | 10 μ l |
| Spermidine 100 mM | 2,5 μ l |
| Enzyme de restriction 10 (U/ μ l) | 2,5 μ l |
| H ₂ O (qsp) | 100 μ l |

Après la digestion, l'ADN est concentré par précipitation en ajoutant : 1/10 volume d'acétate de sodium (AcNa) 3 M pH 5,2 et un volume d'isopropanol. Après centrifugation pendant 10 min le surnageant est enlevé, le culot est rincé à l'éthanol 70%, puis séché pendant 15 min avant d'être repris par 25 µl de TE et 5 µl de solution de dépôt concentrée 6 fois (solution stock 6x : 0,25% xylène cyanol ; 0,25% bleu de bromophénol et 30% de glycérol).

2.4.3. Transfert sur membrane

Pour permettre le transfert et la fixation des ADN sur la membrane, Après migration de l'ADN, le gel d'agarose est traité de la façon suivante (à température ambiante) :

(1) *Dépurination de l'ADN* : 2 fois 15 min dans une solution HCl 0.25 N. Ce traitement à l'acide a pour conséquence de couper les grands fragments d'ADN et de faciliter leur transfert.

(2) *Dénaturation de l'ADN* : 2 fois 20 min dans la solution de dénaturation (1,5 M NaCl ; 0,5 M NaOH). La dénaturation permet l'hybridation avec la sonde.

(3) *Neutralisation du gel* : 2 fois 20 min dans la solution de neutralisation (1,5 M NaCl ; 0,5 M Tris-HCl pH 7.5 ; 1 mM EDTA).

Le transfert s'effectue par capillarité en présence du tampon 20x SSPE (1x : 20 mM EDTA ; 0,3 N NaOH ; 0,2 M NaH₂PO₄, pH 7,4). Le transfert est réalisé soit la nuit avec aspiration par capillarité avec des papiers absorbants, soit par aspiration avec une pompe (Vacuum Blotter, *Appligene-Oncor*) durant 1 heure. Après transfert, la membrane est rincée avec du tampon 2x SSPE puis placée à 80°C durant 2 heures. Le but de cette cuisson est de fixer l'ADN sur la membrane de nitrocellulose.

2.4.4. Marquage radioactif d'un fragment d'ADN par amorçage au hasard

Le marquage des fragments d'ADN est réalisé par un amorçage au hasard « random priming » en utilisant la méthode de Feinberg and Vogelstein (1983). Le but est de fixer au hasard sur l'ADN, rendu mono brin après dénaturation, des amorces de 8 nucléotides (désignées au hasard) et de synthétiser la matrice complémentaire en y incorporant des désoxynucléotides radioactifs grâce à une ADN polymérase. 25 ng d'ADN linéaire, repris dans un volume de 33 µl d'eau sans nucléase, sont dénaturés pendant 5 minutes à 100°C, puis immédiatement placés à 0°C durant le même temps. Après une centrifugation rapide, différents réactifs sont ajoutés : 5 µl de tampon de marquage 10x (contient les octadésoxyribonucléotides), 2 µl de dATP, dGTP et dTTP, 5 µL de ³²P-dCTP (3000 ci/mmol)

et 1 µl (soit 5 unités) d'ADN polymérase I (fragment Klenow). Le mélange est incubé pendant une heure à 37°C. La réaction est arrêtée grâce à l'adjonction de 5 µl d'une solution 0,2 M EDTA pH 8.

Les nucléotides radioactifs non incorporés sont éliminés pour diminuer le bruit de fond lors de l'hybridation sur le filtre. La sonde est purifiée par centrifugation au travers d'une micro-colonne (contenant des billes de séphadex G50 déposées sur un coussin de laine de verre, équilibrée dans du TE pH 7,5). Les nucléotides non incorporés sont piégés sur des billes tandis que les fragments marqués sont élués immédiatement. Aux 50 µl de sonde sont ajoutés 250 µl de tampon TE pH 8. L'ensemble est déposé sur la micro-colonne et l'éluat est récupéré dans un tube. Lorsque 300 µl sont récupérés, 3x 300 µl de TE sont ajoutés successivement et les 3x 300 µl d'éluat sont aussi conservés. 1 µl de chacun des 4 éluats est dosé au compteur à scintillation afin de déterminer la radioactivité en coup par minute (cpm) de chacun des échantillons. L'échantillon le plus radioactif étant celui qui contient le plus d'ADN marqué.

2.4.5. Pré-hybridation et hybridation des filtres

La solution de pré-hybridation va combler les sites libres sur les filtres et va empêcher la fixation non-spécifique de la sonde.

Les filtres sont pré-hybridés à 65°C pendant 2 h dans la solution de pré-hybridation suivante : 97 ml de 6x SSPE, 1 ml de 10% SDS (p/v), 1 ml d'un mélange de (2% polyvinylpyrrolidone (PVP), 2% ficoll et 0,02% NaN₃) et 1 ml de 50 µg/ml d'ADN de sperme de saumon dénaturé et soniqué. Le tampon d'hybridation contenant la sonde est constitué de 3x SSPE, tout le reste étant identique au tampon de pré-hybridation.

Les deux brins d'ADN de la sonde radioactive sont séparés par une dénaturation à 100°C pendant 5 min puis ajoutés au filtre. Les hybridations sont réalisées à 65°C dans un volume minimal de tampon d'hybridation. Le filtre est placé dans un cylindre dans une étuve à hybridation de type rôtisserie pendant 16 h sous rotation.

2.4.6. Lavage et autoradiographie des filtres

Le lavage a pour but de retirer l'excès des sondes non hybridées et d'éliminer les hybridations non spécifiques. Le nombre de lavages à 65°C donné ici est susceptible de varier en fonction de l'intensité de la radioactivité détectée avec le compteur Geiger.

| Nombre de lavages x durée | Tampon de lavage |
|---------------------------|----------------------|
| 1x 10min | 3x SSPE + 0.1% SDS |
| 2x 10min | 1x SSPE + 0.1% SDS |
| 2x 7.5min | 0,3x SSPE + 0.1% SDS |

Le filtre est ensuite scellé dans un sac plastique et mis au contact d'un film d'autoradiographie Kodak (BioMax Ms-1 Film ou MR-1) pendant plusieurs jours dans une cassette munie d'écrans amplificateurs (à -80°C).

2.5. Méthodes concernant les ARN

2.5.1. Extraction des ARN d'*Arabidopsis thaliana*

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

Les ARN sont extraits à partir d'organes aériens ou de racines. Ces organes sont broyés au mortier dans de l'azote liquide. 500 µl de poudre obtenue sont placés dans un tube Eppendorf 1,5 ml auquel un volume de tampon d'extraction (10 mM Tris-HCl pH 8 ; 100 mM NaCl ; 1 mM EDTA, 1 % SDS (p/v)) sont alors ajoutés et le mélange 'vortexé' jusqu'à homogénéisation. Un volume équivalent de phénol est ajouté afin d'éliminer les protéines, l'échantillon est ensuite 'vortexé'. Après une centrifugation de 5 min à 13 000 rpm, à température ambiante, la phase aqueuse est récupérée. L'extraction au phénol est répétée 2 fois, puis suivie d'une précipitation au chloroforme. Les acides nucléiques sont précipités par l'ajout à la phase aqueuse de 1/10 de TNE (200 mM Tris-HCl pH 7,5 ; 1 M-NaCl ; 10 mM EDTA) et de 2 volumes d'éthanol absolu froid suivi d'une incubation de 15 min à - 80°C.

Après une centrifugation de 5 min à 13 000 rpm, à 4°C, le surnageant est éliminé. Le culot est remis en suspension dans 100 µl d'H₂O et 100 µl de LiCl 4M, puis laissé précipiter pendant la nuit dans la glace. La suspension est alors centrifugée 15 min à 13 000 rpm et à 4°C. Le culot est finalement lavé à l'éthanol 70 % froid et séché avant d'être repris dans un petit volume d'eau distillée stérile. Les ARN peuvent être stockés à - 80°C.

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

La quantité d'ARN est déterminée en mesurant l'absorbance à 260 nm, une unité de DO 260 correspond à 40 µg/ml d'ARN.

2.5.2 Gel d'agarose dénaturant pour ARN

Il faut dénaturer les molécules d'ARN pour pouvoir les séparer selon leur taille. 20 µg et 30 µg d'ARN totaux sont déstructurés par un traitement à 65°C pendant 5 min dans 9 µl de tampon de dénaturation (5 µl formamide ; 2 µl formaldéhyde ; 1 µl de tampon de migration 10x). Ces ARN dénaturés sont ensuite chargés avec du tampon de dépôt (50% (v/v) glycérol ; 0,5 µg/ml bromure d'éthidium ; 0,4% (p/v) bleu de bromophénol) sur un gel d'agarose 1,2% (p/v) / formaldéhyde 6,6% (p/v) préparé dans le tampon de migration 1x (20 mM MOPS; 1 mM EDTA; 1 mM acétate de sodium pH 7). La migration est réalisée à 100 Volts et les ARN sont visualisés à 320 nm, grâce au BET.

2.5.3. Reverse transcription

Cette technique permet de synthétiser l'ADNc correspondant à un ARN grâce à une transcriptase inverse ou ADN polymérase ARN dépendante. L'ARN (2 µg) est dénaturé 5 min à 65°C en présence de 300 pmoles d'amorces (oligo-dT pour l'amplification des ARN contenant une queue poly(A), hexamères aléatoires pour l'amplification de tous les ARN ou amorce séquence-spécifique pour l'amplification d'un ARN particulier). Le mélange est ensuite immédiatement placé dans la glace et centrifugé brièvement. La réaction s'effectue dans du tampon RT (First strand buffer 5x : 250 mM Tris-HCl pH 8,3 ; 375 mM KCl ; 15 mM MgCl₂ ; 50 mM DTT), en présence de dNTP 0,4 mM, DTT 10 mM, et de 10 U de Transcriptase inverse SUPERSRIPT II (Invitrogen) pendant 2 h à 42°C. La réaction est arrêtée en chauffant 5 min à 95°C, 1/10ème de cette réaction est utilisée pour une réaction de PCR.

2.6. Méthodes concernant les protéines

2.6.1. Dosage des protéines

Un kit de dosage BioRad (BioRad : Dc protein assay), basé sur la méthode de Lowry (LOWRY et al., 1951), est utilisé. La concentration en protéine d'une solution est estimée en

mesurant son absorbance à 750 nm, et en comparant la valeur obtenue à une courbe standard obtenue avec des concentrations connues de BSA.

2.6.2. Concentration des protéines

Précipitation au TCA

Cette précipitation de protéines est réalisée avec une solution d'acide trichloracétique (TCA, 10% (v/v) final) pendant 1 h sur la glace. Après centrifugation 15 min à 12 000 rpm à 4°C, le culot est lavé avec de l'acétone 80% (v/v), puis séché à l'air. Les protéines sont reprises dans du tampon de charge 1x (tampon de charge 4x : 500 mM Tris-HCl pH 6,8 ; 12% SDS ; 20% glycérol ; 40 mM DTT ; 20 mM bleu de bromophénol) pour l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

Concentration (Centricon®, Millipore)

Le principe de ces concentrateurs est l'ultrafiltration sélective. Ces concentrateurs ont une taille limite de maille (10 ou 30 kDa, selon le modèle que nous utilisons) et les molécules de taille supérieure à cette taille limite sont retenues par la membrane hydrophobe tandis que les petites molécules, telles les sels traversent la membrane. Ainsi, ces concentrateurs peuvent être utilisés pour concentrer une solution protéique ou pour changer le tampon d'une solution. Les échantillons sont chargés dans le concentrateur et celui-ci est centrifugé à 3 500 rpm jusqu'à ce que la concentration désirée soit atteinte.

2.6.3. Extraction des protéines au phénol

Les protéines totales sont extraites au phénol selon la technique de Hurkman et Tanaka, (1986). Le matériel végétal est congelé dans l'azote liquide puis broyé dans un mortier jusqu'à l'obtention d'une fine poudre (250 à 300 mg). La poudre est remise en suspension dans le milieu Tanaka (0,7 M saccharose ; 0,5 M Tris-HCl pH 8 ; 5 mM EDTA ; 0,1 M NaCl ; 2% (v/v) β -mercaptoéthanol ; 2 mM PMSF) avant l'addition d'un volume de phénol (pH 8).

Après agitation durant 20 min à température ambiante, et centrifugation (14 000 rpm, pendant 5 min à 4°C), la phase phénolique (phase supérieure) est prélevée et 5 volumes de solution contenant de l'acétate d'ammonium 0,1 M dans du méthanol 100% (v/v) sont ajoutés. Après incubation (30 min à -20°C), les protéines précipitées sont récupérées par centrifugation (14 000 rpm, 10 min à 4°C), lavées deux fois dans le milieu acétate/méthanol et

deux fois dans l'acétone 80 %. Les culots sont remis en suspension dans le tampon suivant : 10% glycérol (v/v); 3% SDS ; 62,5 mM Tris-HCl pH 8.

La concentration des protéines est déterminée en utilisant le kit de BioRad.

2.6.4. Extraction rapide des protéines

Cette méthode est très rapide et efficace pour effectuer un simple contrôle du profil des protéines sur un gel dénaturant SDS-PAGE. Le matériel végétal est finement broyé dans un mortier à l'azote. La poudre obtenue est pesée et reprise dans un volume équivalent de tampon de charge 4x (500 mM Tris-HCl pH 6,8 ; 12% SDS (p/v) ; 20% glycérol (v/v) ; 40 mM DTT ; 20 mM bleu de bromophénol) L'échantillon est dénaturé pendant 10 min à 100°C, puis centrifugé 5 min à vitesse maximum (centrifugeuse Eppendorf 5417R). Le surnageant peut alors être utilisé pour une séparation électrophorétique.

2.6.5. Electrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)

Les gels utilisés en SDS-PAGE sont composés de deux parties : un gel de concentration (5% acrylamide/bisacrylamide 37,5/1, 0,125 M Tris-HCl pH 6,8, 0,2% (p/v) SDS, 0,1% (v/v) APS, 0,01% (v/v) TEMED) et un gel de séparation (x % acrylamide/bisacrylamide 37,5/1, 0,375 M Tris-HCl pH 8,8, 0,2% (p/v) SDS, 0,1% (v/v) APS, 0,008% (v/v) TEMED). Les gels de séparation utilisés sont soit des gels à concentration uniforme (10%, 12,5%, 15%) ou des gels gradients (10-17% ou 12-20%). Un volume de tampon de charge est ajouté aux échantillons et le tout est chauffé 5 min à 100°C. Le DTT va réduire les ponts disulfures et le SDS va dénaturer les protéines et, en se fixant sur les chaînes peptidiques, attribuer une charge nette négative qui va être fonction de la taille de la protéine. Ainsi les protéines sont séparées selon leur masse moléculaire. La migration est réalisée dans du tampon Laemmli (25 mM Tris-HCl pH 8,3 ; 250 mM glycine ; 0,2% (p/v) SDS) sous un voltage constant de 100 V ou ampérage constant de 25 mA.

2.6.6. Détection des protéines

Coloration au bleu de Coomassie

Après migration, les protéines séparées sur gel de polyacrylamide peuvent être fixées et colorées avec une solution de coloration (0,15% (p/v) bleu de Coomassie R250, 10% (v/v) acide acétique, 25% (v/v) Isopropanol) qui permet le marquage des acides aminés aromatiques et offre une sensibilité de détection allant jusqu'à 50-100 ng. Après une

incubation de quelques heures, l'excès de colorant est éliminé par deux lavages successifs : un premier lavage de 60 min dans du tampon de décoloration fort (éthanol 40% (v/v) ; acide acétique 10% (v/v)), et un bain de plusieurs heures dans un tampon de décoloration faible (éthanol 10% (v/v) ; acide acétique 7% (v/v) ; glycérol 5% (v/v)), jusqu'à obtenir une décoloration optimale du gel.

Coloration des protéines sur gel au nitrate d'argent

La coloration des protéines au nitrate d'argent est une méthode plus fine et sensible que la coloration au bleu de Coomassie (sensibilité de détection : 1-10 ng). Le protocole suivi est celui de (Swain et Ross, 1995). Chaque étape est réalisée à température ambiante sous une agitation douce. Le gel est rincé pendant 10 min dans un bain d'éthanol 40 % (v/v) ; acide acétique 10 % (v/v) afin de fixer les protéines (la fixation peut être prolongé sur la nuit). Le gel est rincé 10 min dans de l'eau distillée. Après fixation des protéines, la coloration est sensibilisée par une incubation de 5 min dans un mélange éthanol 40% (v/v), glutaraldéhyde 0,025% (v/v), formaldéhyde 0,01% (v/v). Le gel est alors rincé 20 min dans de l'éthanol 40% (v/v) et de l'eau distillée 60 % (v/v), puis de nouveau 20 min dans de l'eau distillée. Le gel est incubé 1 minute dans une solution de thiosulfate de sodium (0,02 % (p/v) dans l'eau distillée), puis rincé à deux reprises pendant une minute dans de l'eau distillée. Les protéines sont colorées 20 min dans une solution de nitrate d'argent 0,1% (p/v). Le gel est rincé 1 minute à l'eau. La coloration se développe par l'ajout d'une solution de carbonate de sodium 2,5% (p/v), formaldéhyde 0,04% (v/v) (déposer quelques ml sur le gel pendant 1 à 2 min afin d'éliminer l'excès de sels, puis changer le bain). Quand le contraste optimum est atteint, la réaction est arrêtée par l'ajout d'acide acétique 5% (v/v) pendant 5 min. Le gel peut être conservé dans de l'eau distillée ou dans une solution de carbonate de sodium 0,03% (p/v).

2.7. Analyse de la topologie membranaire

2.7.1. Décrochage des protéines des thylacoïdes intacts

Des thylacoïdes intacts fraîchement préparés subissent un traitement par les sels (NaCl) ou un traitement alcalin afin de déterminer le degré des forces d'interaction des protéines avec les thylacoïdes. Environ 100 µg de protéines totales de thylacoïdes (soit 20 µl d'une solution à 5 µg/µl de protéines) sont incubés séparément pendant 30 min à 0°C dans 300 µl des solutions suivantes : 10 mM MOPS, pH 7,8 ; 10 mM MOPS-1 M NaCl ; 0,1 M Na₂CO₃, pH 11 ; 0,1 N

NaOH. Après centrifugation 30 min à 13 200 rpm, les culots et les surnageants sont récupérés. Les culots sont remis directement en suspension dans le tampon de charge des protéines. Les protéines présentes dans le surnageant sont précipitées au TCA 10% (v/v) durant quelques heures dans la glace. Après centrifugation, le culot est lavé à l'acétone froid, puis remis en suspension dans le tampon de charge pour analyse en SDS-PAGE.

2.7.2. Traitements des thylacoïdes intacts par la thermolysine

La thermolysine est une protéase extraite de *Bacillus thermoproteolyticus* (Calbiochem) qui ne traverse pas la membrane du thylacoïde. Cette protéase a été utilisée pour déterminer si une protéine est présente (en partie ou complètement) à la surface des thylacoïdes. 100 µg de protéines totales de thylacoïdes intacts (20 µl d'une solution à 5 µg/µl de protéines) sont incubés durant 30 min à température ambiante sous agitation sur la roue à 15 rpm dans 300 µl du tampon : 10 mM MOPS-KOH, pH 7,8 ; 1 mM CaCl₂ ; additionné de différentes concentrations de thermolysine (100 à 300 µg/ml). L'incubation est réalisée en présence ou en absence de 10 mM EGTA, un agent chélatant qui inhibe l'activité de la thermolysine. La réaction est arrêtée par l'addition de 10 mM EGTA. La suspension de thylacoïdes traités est centrifugée 15 min à 13 000 rpm. Les culots sont remis en suspension dans du tampon de charge de protéines pour analyse en SDS-PAGE.

2.8. Extraction de protéines internes et externes du grain d'amidon

Les protéines associées aux grains d'amidon ou protéines externes d'amidon sont séparées des particules d'amidon par incubation de 5 mg d'amidon pendant 10 min à température ambiante dans 100 µl de tampon de charge de protéine contenant du SDS, la suspension est homogénéisée en vortexant. Une centrifugation de 13 200 rpm pendant 10 min permet de récupérer le surnageant qui contient les protéines externes du grain d'amidon (Morrison and Karkalas 1990, Mu-Forster et al., 1996). Pour extraire les protéines internes du grain d'amidon, le culot d'amidon obtenu précédemment est lavé 3 fois. Les grains sont remis en suspension dans un volume équivalent de tampon de charge (100 µl) et chauffés à 100°C pendant 5 min. Finalement, les échantillons sont centrifugés comme précédemment et les surnageants sont collectés. Les protéines internes et externes de 2,5 mg d'amidon sont utilisées pour les analyses biochimiques.

2.9. Surproduction des protéines dans *E. coli*

La souche d'*E. coli* M15 PREP4 (Qiagen) est utilisée car cette souche porte le gène *LacI* qui permet de surproduire le répresseur de l'opéron lactose. Ce répresseur évite ainsi une expression constitutive basale de la protéine recombinante qui pourrait être toxique et empêcherait une croissance bactérienne normale. Les bactéries sont rendues électro-compétentes, et la transformation s'effectue avec 10 ng de PQE31 contenant l'ADNc FtsZ21 et également 1 ng de PQE31 contenant l'ADNc FtsZ1. A partir d'une préculture en phase stationnaire pour chacune des bactéries recombinantes, 25 ml sont inoculés dans 1 litre de milieu LB avec 25 µg/ml de kanamycine et 100 µg/ml d'ampicilline. La croissance bactérienne s'effectue sous agitation à 37°C jusqu'à atteindre une DO à 600 nm de 0,6 environ. La production de la protéine recombinante est induite par addition d'IPTG (0,5 mM final) et la culture s'effectue pendant 3 h à 37°C. Les bactéries sont collectées par une centrifugation dans des pots de 250 ml pendant 10 min (7 000 rpm à 4°C). Les cellules peuvent alors être conservées à - 20°C jusqu'à leur utilisation.

2.10. Purification des protéines

2.10.1. Purification sur colonne d'affinité Ni-NTA Agarose

Pour l'expression des protéines, le vecteur PQE31 (Qiagen) avait été utilisé. C'est un vecteur d'expression qui porte le gène de résistance à l'ampicilline et qui possède, après un ATG d'initiation de la traduction, 6 codons codant des résidus histidine (his). L'étiquette his permet une purification de la protéine produite sur une matrice conjuguée à du nickel (Ni-NTA Agarose, Qiagen) qui fixe les histidines par liaison de coordination. La rupture de cette association peut se faire en condition dénaturante en présence d'urée de deux manières différentes, soit en baissant le pH ce qui déstabilise l'interaction nickel-histidine, soit en rajoutant de fortes concentrations d'un analogue de l'histidine, l'imidazole.

Purification en condition dénaturante par l'imidazole

Le culot de bactéries est repris dans 20 ml de tampon de lyse (20 mM NaH₂PO₄, 6 M urée, 20 mM Imidazole, 100 mM NaCl, pH 7,5) auquel on ajoute les inhibiteurs de protéase 0,5 mM PMSF, 1 µM pepstatine A, 4 µM leupeptine. L'échantillon est passé à la French Press puis centrifugé à 14 000 rpm pendant 30 min à 4 °C. Le surnageant est récupéré et filtré sur

filtre de 0,22 µm, puis sont alors ajoutés 500 µl de résine Ni-NTA agarose (Qiagen), pré-équilibrés dans du tampon de lyse, et l'ensemble est laissé sous agitation pendant 1 h à 4°C. Après incubation, la résine est déposée dans une colonne (BioRad), puis lavée avec 2 volumes colonne de tampon de lavage (20 mM NaH₂PO₄, 6 M urée, 20 mM Imidazole, 500 mM NaCl, pH 7,5).

Des éluions successives sont pratiquées grâce à l'addition de 6 fois 1 ml de tampon d'éluion (20 mM NaH₂PO₄, 6 M urée, 500 mM Imidazole, 500 mM NaCl, pH 7,5). On obtient ainsi des tubes contenant la protéine purifiée. La qualité de la purification ainsi que la quantité de protéine surproduite sont estimées par une électrophorèse sur gel de polyacrylamide 12,5 % en conditions dénaturantes, suivie d'une coloration du gel au bleu de Coomassie.

Purification en condition dénaturante par pH

Le protocole est sensiblement le même que celui de la purification avec l'imidazole, la différence se situe au niveau des tampons qui ont des pH différents (tampon de lyse : 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 8 M urée, pH 8 ; tampon de lavage : 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 8 M urée, pH 6,3). Une première série d'éluion de 6 fois 1 ml s'effectue avec un tampon à pH 5,9 (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 8 M urée, pH 5,9), suivie d'une deuxième série avec un tampon à pH plus acide (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 8 M urée, pH 4,5), ce qui permet de décrocher toutes les protéines associées à la matrice.

2.10.2. Utilisation de la FPLC (Fast Performance Liquid Chromatography)

La FPLC (AKTA pharmacia), permet une purification dans d'excellentes conditions des protéines par imidazole ou par pH en utilisant les mêmes tampons que précédemment et une colonne HisTrap (Amersham Pharmacia Biotech).

La pompe FPLC est utilisée également pour la purification de protéines natives ; pour cela après avoir chargé le surnageant de protéines sur la colonne de Nickel agarose de 1 ml haute capacité, la colonne est ensuite lavée par 50 ml d'un gradient d'urée 6 M-0.5 M réalisé dans le même tampon de lyse qu'en conditions dénaturantes avec imidazole. Un deuxième lavage s'effectue avec un tampon sans urée (20 mM NaH₂PO₄, 20 mM Imidazole, 500 mM NaCl, pH 7,5). Les protéines sont éluées avec le tampon d'éluion (20 mM NaH₂PO₄, 500 mM imidazole, 500 mM NaCl, pH 7,5; inhibiteurs de protéases). Les protéines éluées sont désalées sur colonne Hitrap desalting (Pharmacia) en utilisant un tampon PBS 1x. Les différentes fractions de protéines sont analysées par SDS-PAGE et conservées à - 20°C.

2.11. Méthodes immunologique

2.11.1. Obtention d'anticorps

Des anticorps polyclonaux ont été obtenus en immunisant des lapins par l'injection des protéines FtsZ1 et FtsZ2, ce travail a été réalisé par la société Interchim.

L'obtention de ces anticorps avait été également réalisée par la société Eurogentec lors du travail de thèse de Mahmoud El-Shami (El-Shami et al., 2000).

2.11.2. Purification des anticorps FtsZ1 et FtsZ2 par immunoaffinité sur colonne affigel

La matrice affigel 10-15 (BioRad) est constituée d'agarose-ester de N-hydroxysuccimide sur laquelle on peut fixer la protéine antigène. 1 mg de protéines purifiées, repris dans 1 ml de tampon de couplage (20 mM HEPES pH 8), est couplé à la matrice 4 h à 4°C sous agitation à la roue. L'ajout de protéine provoque la substitution du N-hydroxysuccimide et les amines primaires de la protéine vont former des liaisons covalentes stables avec le support d'agarose. Après lavage dans 5 ml de tampon de couplage, les sites restés libres sont bloqués par addition de Tris-HCl 1 M pH 8 pendant 2 h à température ambiante. La matrice est ensuite retenue sur une colonne (Bio-Rad) puis lavée avec 20 volumes colonne de tampon BC500 (20 mM Tris-HCl pH 7,2 ; 20% glycérol (v/v) ; 0,2 mM EDTA ; 500 mM NaCl ; 10 mM β -mercaptoethanol) pour éliminer les protéines non couplées, puis 10 volumes colonne PBS 1x pour équilibrer la colonne. Le sérum à purifier (2 ml), dilué 5 fois dans le tampon PBS 1x, est centrifugé à 15 000g pendant 10 min à 4°C, puis le surnageant est chargé sur la colonne. La matrice est à nouveau lavée avec 20 volumes colonne de tampon BC500, puis 10 volumes colonne PBS 1x. Les anticorps sont élués à pH acide avec 900 μ l de 0,1 M glycine pH 2,5 et six fractions sont recueillies dans des tubes contenant 100 μ l de Tris-HCl 1 M pH 8. La colonne est immédiatement neutralisée par 10 volumes colonne de 1 M Tris-HCl pH 8 et équilibrée avec la même quantité de PBS 1x. Les pH extrêmes fragilisent l'interaction antigènes-anticorps et permettent ainsi l'éluion des anticorps. Les anticorps lyophilisés sont repris dans un faible volume de PBS 1x et du glycérol 20% (v/v) final, puis conservés à – 20 °C

2.11.3. Purification sur colonne affigel 102 (Bio-Rad)

Les anticorps peuvent également être purifiés sur une colonne Affigel 102 (Bio-Rad) à partir du sérum de lapin immunisé. Le protocole établi par le fournisseur pour réaliser le couplage des protéines sur la matrice a été suivi. Il comprend deux étapes successives :

l'activation des groupes carboxyles et le déplacement de la liaison puis le relargage de l'EDAC (Carbodiimide) et des dérivés urée.

Pour le couplage, le gel est dilué avec le même volume d'eau distillée. Successivement, 1 à 2 mg de protéines par ml de gel sont ajoutés (pH ajusté à 4,5-5,0 avec HCl), puis 2 à 10 mg d'EDAC (pH ajusté immédiatement à 4,5-5,0). La réaction s'effectue pendant au moins trois heures à 4°C (ou pendant la nuit).

Après le couplage, le gel est introduit dans la colonne (le surnageant est récupéré pour doser les protéines non fixées). Environ 90% des protéines sont couplées. La colonne est lavée successivement par (volume de colonne) :

- 10 volumes de Tris-HCl 10 mM, pH 7,5.
- 10 volumes de glycine 100 mM, pH 2,5.
- 10 volumes de Tris-HCl 10 mM, pH 8,8.
- 10 volumes de TEA 100 mM, pH 11,5.
- Un lavage final avec du Tris-HCl 10 mM, pH=7,5 jusqu'à obtenir en sortie de colonne une solution à pH 7,5.

Le sérum (dilué 10x dans du Tris-HCl pH 7,5) est passé trois fois de suite sur la colonne pour bien fixer le maximum d'anticorps. Pour éliminer les fixations d'anticorps non spécifiques sur la colonne, des lavages sont effectués avec :

- 10 volumes de Tris-HCl 10 mM, pH 7,5.
- 10 volumes de NaCl 500 mM
- 20 volumes de Tris-HCl 10 mM, pH 7,5

Les anticorps sont élués à pH acide puis basique en passant :

- 10 volumes de glycine 100 mM, pH 2,5. Les fractions recueillies sont immédiatement neutralisées avec 1 volume de Tris 1 M pH 8,0.
- Tris-HCl 10 mM, pH 8,8 jusqu'à obtenir en sortie de colonne une solution à pH 8.
- 10 volumes de TEA (TriEthanolAmine) 100 mM pH 11,5 pour recueillir les fractions comme précédemment dans 1 volume de Tris 1M pH 8.

Les différentes fractions contenant les anticorps sont mélangées et dialysées contre du PBS (10,6 mM Na₂HPO₄ ; 1,5 mM KH₂PO₄; 136 mM NaCl ; 2,7 mM KCl ; pH 7,4) contenant

0,02% d'azide (un antibactérien). Les anticorps sont concentrés sur colonne Centricon. Les anticorps, après addition de glycérol 20% (v/v) final sont conservés à -20 °C.

2.11.4. Western blots

Les protéines séparées sur un gel dénaturant SDS-PAGE (Laemmli, 1971), sont transférées sur une membrane Immobilon-P (Millipore). La membrane est mouillée avec du méthanol 100% puis rincée dans du tampon de transfert (25 mM Tris base, 192 mM glycine, 0,04% SDS, 20% methanol). Un sandwich est formé avec, de l'anode vers la cathode, un Scotch Brite®, une feuille de papier filtre Whatman® 3 MM, la membrane, le gel, une autre feuille Whatman® 3 MM et un Scotch Brite®. L'électrotransfert est réalisé en milieu liquide dans un container (tank transfer system, Biorad) sous un voltage constant de 100 Volts pendant 75 min dans du tampon de transfert.

Après transfert, la membrane est séchée 1 h à 37°C puis saturée dans le tampon TBS-Tween 20 (TBS : 50 mM Tris-HCl, pH 7,4 ; 200 mM NaCl, avec 0,1% (v/v) de Tween 20) contenant 10% de lait. Le premier anticorps est incubé 1 heure ou la nuit à 4°C dans le même tampon, puis la membrane est lavée 5 fois pendant 5 min avec du TBS-T. L'anticorps secondaire est un anti-HRP (Horse Radish Peroxydase) de lapin utilisé à une dilution de 1/3 000. L'incubation s'effectue généralement 1 h à température ambiante. La membrane est lavée 5 fois 5 min avec du TBS-T. La révélation s'effectue grâce au système "ECL Western Blotting" (Amersham).

Dans certains cas, les membranes peuvent être réutilisées. Pour cela, les anticorps sont décrochés par incubation dans une solution contenant du Tris-HCl 1 M pH 6,8, du SDS 2% et du β -mercaptoéthanol 0,7%, 30 min à 50°C ou un tampon de déshybridation (Gene Bio-Application LTD). Les membranes sont lavées avec du TBS-T.

2.12. Méthodes concernant la microscopie

2.12.1. Préparation des tissus : fixation, inclusion et coupe pour la microscopie photonique

Nous avons choisi la méthode d'inclusion en paraffine car elle préserve l'intégrité des structures cellulaires au moment de la coupe (Dixon et al., 1995). La fixation des tissus est réalisée en présence de :

- paraformaldéhyde qui réalise un pontage covalent entre les groupements amines des protéines cellulaires

- d'alcool et d'acide acétique qui précipitent ces protéines complexées.

Les tissus végétaux sont prélevés sur des plantes cultivées *in terro* et immédiatement plongés dans le fixateur (paraformaldéhyde 4% (p/v) ; éthanol 50% ; acide acétique 5% v/v) sous vide ménagé pendant 4 h. Les échantillons fixés sont lavés dans 2 ou 3 bains de 10 min de tampon PBS. Ces tissus sont ensuite rincés dans l'éthanol 30% (30 min), puis déshydratés progressivement dans des bains (30 min, chaque bain) d'abord d'éthanol (successivement 50%, 75%, 95%, 2x 100%) puis de xylène (successivement xylène/alcool (1/3) ; xylène/alcool (1/1) ; xylène/alcool ((3/1) : 2x : xylène pur). De la paraffine (sous forme de copeaux) est ajoutée progressivement au dernier bain de xylène jusqu'à concentration saturante. Les tissus sont ensuite inclus dans de la paraffine pure, inclus à 58°C pendant 8 à 16 h, jusqu'à l'inclusion définitive dans la paraffine. Les blocs obtenus peuvent être conservés à 4°.

Des sections de 7 µm sont réalisées à l'aide d'un microtome (Stiassnie) et déposées sur des lames pré-traitées à l'aminopropyltriéthoxysilane (2% p/v dans l'acétone). Ces coupes sont conservées à température ambiante, à l'obscurité en présence de déshydratant.

Avant utilisation, la paraffine est éliminée par deux bains de xylène (2x 10 min) et les coupes sont re-hydratées par passages successifs des lames dans des bains d'alcool à concentration décroissante (5 min dans ; 2x alcool 100%; puis successivement dans l'alcool 95%, 75%, 50%, 30%, puis dans l'eau).

Les lames peuvent, à ce stade, être utilisées pour les immunodétections

2.12.2. Fixation puis inclusion dans l'Epon pour la microscopie électronique

Les échantillons sont fixés dans de la glutaraldéhyde à 2,5% dans le tampon phosphate 0,1 M (ou cacodylate de sodium 0,1 M, pH 7,2), à température ambiante pendant 2 heures. Les échantillons sont rincés par trois bains de tampon phosphate (ou cacodylate), post-fixés dans le tétraxide d'osmium à 2% dans l'eau pendant 1 heure à 4°C, puis déshydratés dans des bains d'éthanol de concentration croissante d'une durée de 20 min (1x 70% - 1x 95% - 3x 100%), et enfin imprégnés de résine dans deux bains d'une heure (successivement 1/3 d'épon et 2/3 d'alcool 100% - 2/3 d'épon et 1/3 d'alcool 100%). Les échantillons sont placés dans des moules d'inclusion à plat contenant l'Epon pure. La polymérisation dure 72 heures à 55°C.

Dans le cas de chloroplastes isolés, le culot de chloroplastes est remis en suspension dans 400 µl de tampon de fixation (glutaraldéhyde 2,5%-0,1 M cacodylate pH 7,2). La fixation

de 2 à 3 h à température ambiante. Les échantillons sont ensuite centrifugés pour obtenir un culot d'environ 2 mm d'épaisseur. Ce culot est lavé 3 fois avec 400 µl de 0,1 M cacodylate pH 7,2 (sans remise en suspension des culots). Puis 150 µl de ce tampon sont déposés sur le culot et celui-ci est conservé à 4°C avant inclusion.

2.12.3. Ultramicrotomie

Des coupes semi-fines et ultra-fines, d'une épaisseur de 1 µm et 90 nm, respectivement sont réalisées à l'aide d'un ultramicrotome (Leica Reichert Ultracuts) avec couteaux de diamant pour coupes semi-fines et ultra-fines. Les coupes semi-fines sont recueillies sur des lames de verre et colorées à chaud par du bleu de toluidine permettant ainsi de vérifier l'état des coupes.

Pour observation au microscope électronique, les coupes de 90 nm sont déposées sur des grilles de nickel pour les réactions d'immunodétections par les anticorps et sur des grilles de cuivre pour la coloration négative. La coloration des grilles de cuivre s'effectue 2 min à l'obscurité dans de l'acétate d'uranyl à 5% (filtré sur 0,22 µm). Les grilles sont ensuite rincées à l'eau, séchées avec un papier absorbant puis colorées 2 min par le citrate de plomb, rincées de nouveau, et séchées à température ambiante. L'observation peut être faite 24 h après la coloration.

Les coupes contre-colorées et non colorées sont observées à 80 kv à des grossissements variants de 3800, 15000 et 38 000.

Les négatifs de microscopie électronique sont scannés. Les images sont importées dans le logiciel "Analysis" pour être calibrées et montées en planches photographiques.

2.12.4. Immuno-détection avec les anticorps sur coupe

Avant utilisation, les grilles de Nickel sont traitées (etchning) à l'eau oxygéné à 10% pendant 10 min. Les lames ou les grilles sont incubées avec le tampon PBS 5%-BSA (1 h à température ambiante pour saturer les sites puis incubées avec l'anticorps primaire dans du tampon PBS 1%, la nuit à 4°C. Elles sont ensuite lavées dans le tampon PBS 0,1%-Tween 20 (5x 5 min), puis incubées 1 h à température ambiante avec l'anticorps secondaire (anti-IgG de lapin) couplé au FITC pour les lames et à l'or colloïdal (5 ou 10 nm) pour les grilles. Après lavage, les lames et les grilles sont observées au microscope photonique ou électronique, respectivement.

RESULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE I

**L'association des protéines de division FtsZ1 avec les
thylacoïdes
des chloroplastes est régulée au cours du développement
chez *Arabidopsis thaliana***

CHAPITRE I

L'association des protéines de division FtsZ1 avec les thylacoïdes des chloroplastes est régulée au cours du développement chez *Arabidopsis thaliana*.

Les plantes supérieures possèdent deux familles de protéines distinctes, FtsZ1 et FtsZ2, impliquées dans la division des chloroplastes, alors que les bactéries, en général, n'utilisent qu'une seule protéine FtsZ pour se diviser.

La présence de deux protéines soulevait la question de savoir pourquoi les plantes supérieures ont-elles besoin de deux protéines FtsZ pour effectuer la division des chloroplastes.

Afin de répondre à cette question, au cours d'un travail précédent, l'équipe avait montré que les protéines FtsZ1 et FtsZ2 avaient des fonctions biochimiques différentes (El-Kafafi et al. 2005). Les auteurs avaient montré que dans l'épinard les deux protéines présentaient des localisations différentes. Si les deux protéines sont dans le stroma, la protéine FtsZ2 se trouve aussi associée à la membrane interne et à la membrane externe. Au cours de cette étude, les auteurs ont comparé les propriétés biochimiques des protéines FtsZ. Ils ont montré que *in vitro*, dans les conditions requises pour que la protéine FtsZ bactérienne polymérise, seule la protéine FtsZ1 forme des filaments, alors que la protéine FtsZ2 ne polymérise pas (Figure 1)

Les deux protéines ont aussi des effets différents sur la division des bactéries. En effet, lorsque les protéines sont exprimées dans *E. coli*, la protéine FtsZ2 inhibe beaucoup plus fortement la division bactérienne que l'expression de la protéine FtsZ1 (Figure 2). Par des études de délétion de la région conservée présente dans la séquence FtsZ2 (cf. Figure 6 dans le chapitre introduction), ils ont montré que ce domaine est en partie responsable de l'effet observé et ce sans doute, par compétition avec la protéine bactérienne pour l'interaction avec les protéines FtsA et ZipA. Par cette dernière expérience, les auteurs montraient pour la première fois par des expériences *in vivo*, le rôle spécifique de ce domaine.

Suite à cette étude, la question à laquelle il fallait répondre était la suivante :

Ces différences de propriétés des protéines FtsZ impliquent-elles des fonctions différentes in planta ?

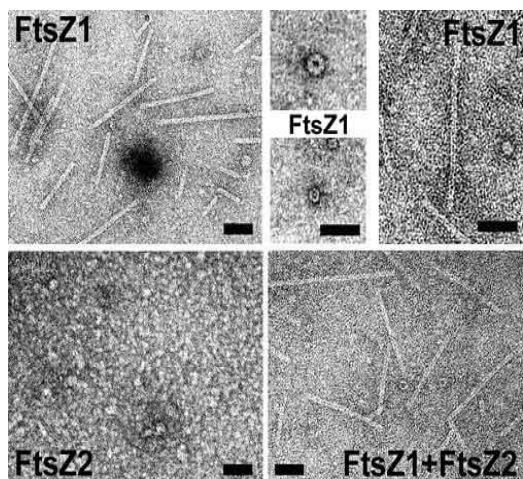


Figure 1. Images par microscopie électronique à transmission des produits de polymérisation. Polymères FtsZ formés *in vitro* par les protéines seules (FtsZ1 ou FtsZ2) ou ensemble (FtsZ1+FtsZ2) - Coloration négative ; barres : 50 nm. (El-Kafafi et al., 2005)

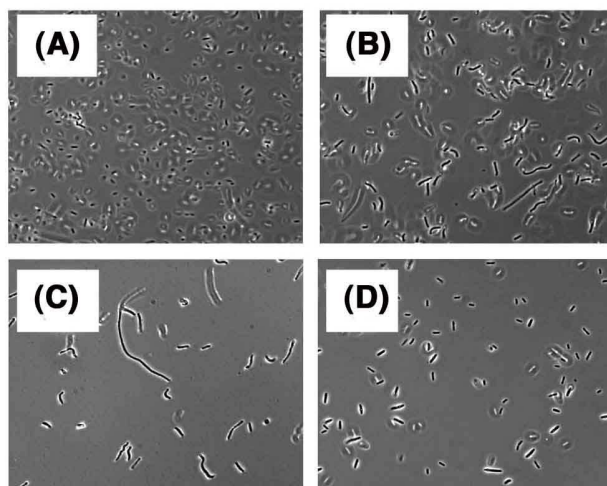


Figure 2. Effet de l'expression des protéines FtsZ1 et FtsZ2 sur la division de *E. coli*. Images de microscopie optique en contraste de phase de bactéries contrôles en absence d'IPTG (A) et de bactéries cultivées en présence d'IPTG et produisant FtsZ1 (B), FtsZ2 (C) et la forme tronquée de FtsZ2 délestée de sa région C-terminale (D). (Figure de El-Kafafi et al, 2005)

Pour répondre à cette question, nous avons entrepris la caractérisation des mutants knock-out FtsZ d'*Arabidopsis thaliana*. Dans cette plante, trois gènes FtsZ ont été identifiés. Un gène unique code la protéine FtsZ1, alors que deux gènes codent les protéines FtsZ2 (FtsZ21 et FtsZ22). L'alignement des séquences protéiques est présenté sur la figure 3.

Dans ce chapitre, nous présentons les résultats obtenus dans l'étude du mutant *ftsZ1*. Ce mutant présente un nombre réduit de chloroplastes de grande taille, preuve que la division des plastes est inhibée. Une faible expression de la protéine FtsZ1 dans ce mutant *null* restaure la division des plastes, on observe des plastes plus nombreux et de taille plus réduite. Une surexpression de FtsZ1 entraîne un phénotype drastique avec la présence d'un seul plaste par cellule. L'observation de l'ultrastructure des chloroplastes du mutant *FtsZ1* montre une altération de l'organisation des thylacoïdes. La surexpression de FtsZ1 provoque une altération encore plus accentuée de l'organisation interne avec des thylacoïdes distordues dans le chloroplaste. Nous montrons pour la première fois que FtsZ1 est associée aux thylacoïdes des chloroplastes de feuilles en plus de sa localisation dans le stroma. Cette association aux thylacoïdes est régulée en fonction du stade de développement car FtsZ1 est localisée dans les thylacoïdes des

plantes jeunes et absente des thylacoïdes des plantes âgées. Ces résultats suggèrent que FtsZ1 pourrait avoir une fonction durant le développement des feuilles dans l'organisation des thylacoïdes au cours de la biogenèse des chloroplastes de feuille.

```

FtsZ21 MATYVSPCFTPSDSRLLTVLRKNVLPENHLG-RLNSIRTID-SKKNRVVVAQKSESSPI
FtsZ22 MAAVYVSPCLTPPDSRVLTVLRKSVLPDHHLGTRVGCLRMSEGTTKRYRVVASHKYESSSI
FtsZ1 -----MAIPLAQLNELTISSSSSSFLTKS-----ISSHSLHSSCI
          :::: * : :. . . . . : : : . . . . . : : : *
FtsZ21 RNSPRHYQS---QAQDPFLNLHPEISMLRGEGETSTIVNPRKETSSGPPVEDFEEPSAPSN
FtsZ22 RNSLNSHSTSHFQSQDSFLNLHPEISML-----NPRKETSSVPITEDLDELSTPNT
FtsZ1 CASSR-----ISQFRG-----GFSKRRSDSTRSKSMRLRCSFSP
          * . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
FtsZ21 YNEARIKVIKVGSGGSSNAVNRMIEMSEMSGVEFWIVNTDIQAMRMSVLPDNRLQIGKELT
FtsZ22 YNEARIKVIKVGSGGSSNAVNRMIEMSEMSGVEFWIVNTDIQAMRISPVFPDNRLQIGKELT
FtsZ1 MESARIKVIKVGSGGSSNAVNRMISSGLQSVDFYAINQDSQALLQS--SAENPLQIGELLT
          :.*****.*****.* : .*: : * * * * * * * * * * * * * * * * *
FtsZ21 RGLGAGGNPEIGMNAATESKEAIEALYGS DMVFVTAGMGGGTGTGAAPVIAGIAKAMGI
FtsZ22 RGLGAGGNPEIGMNAATESKEAIEALYGS DMVFVTAGMGGGTGTGGAPIIAGVAKAMGI
FtsZ1 RGLGTGGNPLLGEQAEEESKDAIANALKGS DLVFITAGMGGGTGSGAAPVVAQISKDAGY
          ****:**** : * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
FtsZ21 LTVGIATPFSFEGRRRTVQAQEGLASLRDNVDTLIVIPNDKLLTAVSQSTPVTEAFNLA
FtsZ22 LTVGIATPFSFEGRRRALQAQEGIAALRDNVDTLIVNPNDKLLAAVVSQSTPVTEAFNLA
FtsZ1 LTVGVVTVYFSGFEGRRKRSLQALEAIEKLVNVDTLIVIPNDRLLDIADQTPAQDAFLLA
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
FtsZ21 DDILRQGVRGISDIITIPGLVNVDFADVRAIMANAGSSLMGIGTATGKSRARDAALNAIQ
FtsZ22 DDILRQGVRGISDIITIPGLVNVDFADVRAIMANAGSSLMGIGTATGKTRARDAALNAIQ
FtsZ1 DDVLRQGVQGISDIITIPGLVNVDFADVAVMKD SGTAMLG VGVSSSKNRAEEAAEQATL
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
FtsZ21 SPLLDIGIERATGIVWNITGGSDTLFEVNAAA EVIYDLVDPTANLIFGAVVDPALSGQV
FtsZ22 SPLLDIGIERATGIVWNITGGSDTLFEVNAAA EVIYDLVDPTANLIFGAVVDPVSYSGQI
FtsZ1 APLIGSSIQSATGVVYNITGGKDIITLQEVNRSQVVTSLADPSANIIFGAVVDDRYTGEI
          :*: . . * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
FtsZ21 SITLIATGFKRQEEGEGRTVQMVQADAASV GATRRPSS-SFRESGSVEIPEFLKKGSSR
FtsZ22 SITLIATGFKRQEEGEGRPLQATQADAS-MGATRRPSS-SFTEGSSIEIPEFLKKGGRSR
FtsZ1 HVTIIATGFSQSFQKTLTDPRAAKLLDKMGSSGQENKGM SLPHQKQSPSTISTKSSSP
          : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
FtsZ21 YPRV- 479 082533_ARATH
FtsZ22 YPRL- 474 Q93ZQ7_ARATH
FtsZ1 RRLFF 433 FTSZ_ARATH
    
```

Figure 3. Alignement des séquences FtsZ d'*Arabidopsis thaliana*

Le motif tubuline présent dans la région N-terminale des protéines FtsZ, ainsi que le motif de liaison FtsZ de *E. coli* avec la protéine ZipA présent dans la région C-terminale des protéines FtsZ21 et FtsZ22 (cf. figure 6 dans l'introduction) sont indiqués respectivement en jaune et en vert.

L'ensemble de ces résultats a fait l'objet d'un article qui vient d'être publié dans *Biochemical journal* et qui est inclus dans ce chapitre.

Developmentally regulated association of plastid division protein FtsZ1 with thylakoid membranes in *Arabidopsis thaliana*

El-Sayed EL-KAFALI^{*1,2}, Mohamed KARAMOKO^{*1}, Isabelle PIGNOT-PAINTRAND[†], Didier GRUNWALD[‡], Paul MANDARON^{*}, Silva LERBS-MACHE^{*} and Denis FALCONET^{*3}

^{*}Laboratoire Plastés et Différenciation Cellulaire, Université Joseph Fourier and CNRS, BP 53, F-38041 Grenoble Cedex 9, France, [†]CERMAV, UPR 5301-CNRS, BP 53, F-38041 Grenoble Cedex 9, France, and [‡]Département de Réponse et Dynamique Cellulaire, CEA, F-38054 Grenoble Cedex 9, France

FtsZ is a key protein involved in bacterial and organellar division. Bacteria have only one *ftsZ* gene, while chlorophytes (higher plants and green alga) have two distinct *FtsZ* gene families, named *FtsZ1* and *FtsZ2*. This raises the question of why chloroplasts in these organisms need distinct FtsZ proteins to divide. In order to unravel new functions associated with FtsZ proteins, we have identified and characterized an *Arabidopsis thaliana* *FtsZ1* loss-of-function mutant. *ftsZ1*-knockout mutants are impeded in chloroplast division, and division is restored when FtsZ1 is expressed at a low level. FtsZ1-overexpressing plants show a drastic inhibition of chloroplast division. Chloroplast morphology is altered in *ftsZ1*, with chloroplasts having abnormalities in the thylakoid membrane network. Overexpression of FtsZ1 also in-

duced defects in thylakoid organization with an increased network of twisting thylakoids and larger grana. We show that FtsZ1, in addition to being present in the stroma, is tightly associated with the thylakoid fraction. This association is developmentally regulated since FtsZ1 is found in the thylakoid fraction of young developing plant leaves but not in mature and old plant leaves. Our results suggest that plastid division protein FtsZ1 may have a function during leaf development in thylakoid organization, thus highlighting new functions for green plastid FtsZ.

Key words: *Arabidopsis thaliana*, chloroplast division, *FtsZ* gene family, plastid division, plastid localization, thylakoid membrane.

INTRODUCTION

FtsZ plays an essential role in bacterial and archaeal division [1–3], in chloroplast division [4–6] and, in some lower organisms (algae and slime moulds), in mitochondrial division [4,7]. FtsZ, the most conserved of the bacterial cell division proteins, shares structural homology with the eukaryotic tubulin element and may be a progenitor of tubulin [8]. Bacterial FtsZ polymerizes like eukaryotic cytoskeletal proteins and forms the so-called Z ring, which forms a scaffold for assembly of at least ten other division proteins [9]. The Z ring adheres to the inside of the bacterial membrane and constricts to form a preseptal ingrowth, which then invaginates further to mediate division. Proteins involved in the cell division complex or divisome are cytoplasmic, periplasmic and membrane-embedded proteins. No outer membrane protein has so far been linked to cell division.

While most bacteria (including cyanobacteria) have only one FtsZ protein, plastid FtsZ protein sequences form three clades, including green-plastid FtsZ1, green-plastid FtsZ2 and the red and chromophyte algal group [10,11]. Phylogenetic analysis suggests that *ftsZ* gene duplication occurred subsequent to the endosymbiotic event. In chlorophytes, the gene duplication giving rise to the *FtsZ1* and *FtsZ2* gene families occurred before green algae branched from the ancestor of land plants [10–12]. The duplication event raises the question of why plastids in these organisms need two different proteins in order to divide when the ancestral bacteria use only one protein.

The major difference between FtsZ1 and FtsZ2 in both chlorophytes and non-chlorophytes lies in their C-terminal sequences.

The C-terminal conserved motif, present in bacterial FtsZ, is required for direct interaction with ZipA and FtsA in *Escherichia coli* [13,14]. This domain is present in FtsZ2, but not in FtsZ1, in chlorophytes and in related sequences in non-chlorophytes. Homologues of ZipA and FtsA have not been identified in eukaryotic genomes, but the protein ARC6 (accumulation and replication of chloroplasts 6) in *Arabidopsis* shares homology with the cyanobacterial protein Ftn2 [15] and interacts with FtsZ2 via the C-terminal core domain [16], providing *in planta* evidence for a functional difference between the two FtsZ protein families in plants. The conserved N-terminal sequence is sufficient for bacterial FtsZ polymerization [17]. The major difference between FtsZ1 and FtsZ2 in higher plants concerns a single amino acid change in the conserved ‘tubulin signature motif’ [18].

In addition, FtsZ1 and FtsZ2 differ in their biochemical properties and subplastidial localization [19]. Expression of FtsZ1 and FtsZ2 in *E. coli* differentially affects division, and these different effects are related to the FtsZ2 C-terminal sequence. Only FtsZ1 is able to polymerize *in vitro* and forms GTP-dependent rod-shaped polymers and rings similar to the bacterial structures, but FtsZ2 can promote GTP-independent FtsZ1 polymerization. These results, together with other results showing the interaction of only FtsZ2 with ARC6 and an earlier expression of FtsZ2 during the cell cycle in BY2 cells [18], suggest that FtsZ2 and FtsZ1 fulfil different functions during chloroplast division [19].

In addition to being a key element in the chloroplast division machinery, plant FtsZ proteins may be involved either directly or indirectly in the co-ordination of cell division and plastid division.

Abbreviations used: ARC6, accumulation and replication of chloroplasts 6; FST, flanking sequence tag; GC1, giant chloroplasts 1; IEP37, inner envelope protein of 37 kDa; KARI, ketol-acid reducto-isomerase; OEP21, an outer envelope protein of 21 kDa; PSII, Photosystem II; SAM, shoot apical meristem; T-DNA, transfer DNA; TEM, transmission electron microscopy; WT, wild-type.

¹ These authors contributed equally to this work.

² Present address: IBIP (Institut de Biologie Intégrative des Plantes), UMR 5004 Agro-M/CNRS/INRA/UM2, Place Viala, 34060 Montpellier Cedex 1, France.

³ To whom correspondence should be addressed (email denis.falconet@ujf-grenoble.fr).

An FtsZ1 isoform in the moss *Physcomitrella patens* is localized both in chloroplasts and in the cytoplasm, assembling into rings in both cell compartments, and transfected cells expressing high amounts of the protein were impeded in cell division [20]. In higher plants, expression of both *FtsZ1* and *FtsZ2* genes seems to be cell-cycle-regulated [18], and in *Arabidopsis*, the pre-replication factor AtCDT1 is involved not only in nuclear DNA replication but also in plastid division by means of an interaction with ARC6 [21].

Here, we describe the characterization of an *Arabidopsis ftsZ1* mutant in which chloroplast division is strongly impeded but restored when FtsZ1 is expressed at a low level. FtsZ1 overexpression in both backgrounds [*ftsZ1* and WT (wild-type)] induces a strong phenotype with a drastic effect on chloroplast morphology and division. Both null and FtsZ1-overexpressing plants have an accelerated development. *ftsZ1*-deficient plants have an altered thylakoid membrane network, whereas FtsZ1 overexpression results in an increased network of twisting thylakoids and larger grana. We show that FtsZ1, in addition to being present in the stroma, is also found tightly associated with the thylakoid membranes and that this association is developmentally regulated.

EXPERIMENTAL

Plant material, transformation and growth

Arabidopsis, Wassilewskija ecotype (Ws), was used as WT plants for all experiments. The FtsZ1 T-DNA (transfer DNA) insertion mutant FST (flanking sequence tag) number 128A08 was obtained from the FLAGdb/FST initiative (<http://193.51.165.9/projects/FLAGdb+/HTML/index.shtml>). Genomic DNA was amplified with the Tag6 (5'-CTTTCATCTACGGCAATGTACCAGC-3') and Tag7 (5'-GTCGATAAGAAAAGGCAATTTGTAG-3') specific primers to detect the T-DNA. To follow the presence of the endogenous copy of the *FtsZ1* gene and identify homozygous lines, genomic DNA was PCR-amplified with specific couples of primers: FtsZ1/D-FtsZ1/R and FtsZ1/D-Tag6 (FtsZ1/D: 5'-ATGGCGATAATCCGTTAGCACA-3'; FtsZ1/R: 5'-AGGGGCACTCTGAAAAGAAGAT-3'). Homozygous lines were propagated by repeated self-pollination and the absence of *FtsZ1* expression was assayed by immunoblotting with polyclonal anti-FtsZ1 antibodies [18]. In order to exclude the presence of more than one T-DNA, Southern-blot analysis was performed. Nuclear DNA of the selected lines was digested with EcoRI, a restriction enzyme with a unique site in *FtsZ1* (within intron 1) and in the T-DNA. DNA fragments were fractionated on 0.8% agarose gels, denatured and transferred on to nitrocellulose membrane. The membrane was hybridized, under standard high-stringency, with a T-DNA internal probe. For complementation analysis, the *Arabidopsis* FtsZ1 cDNA was ligated into the pFP101 vector that allows for the selection of transgenic *Arabidopsis* seeds via the GFP (green fluorescent protein) expression driven by the At2S3 seed-specific promoter [22]. The construct was expressed in the FST number 128A08 mutant as well as in the WT plant. T1 plants were analysed by immunoblotting with polyclonal anti-FtsZ1 antibodies and by microscopy.

For plant growth, seeds were stratified at 4°C for 2 days before growth on soil at 23°C with a 16 h/8 h light/dark photoperiod at a light intensity of 60 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

Protein isolation, chloroplast protein fractionation, treatments and immunoblotting analyses

Total plant protein extracts were obtained following the Tanaka method [23]. Stromal, thylakoid and envelope proteins purified

from lysed chloroplasts were separated on a step gradient of 0.93 and 0.6 M sucrose in 10 mM Mops (pH 7.6) and 1 mM MgCl₂ by centrifugation as described in [24]. For high-salt, alkaline and EDTA washes, the purified thylakoid fraction (30 μg of protein) was incubated for 30 min at 0°C in 1.0 M NaCl, 0.1 M Na₂CO₃ (pH 11.5), 0.1 N NaOH or 5 mM EDTA. The mixtures were then centrifuged and the pellets were resuspended in SDS loading buffer. For protease treatment, thylakoids were incubated for 30 min at 22°C with 100 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ thermolysin (Sigma) in the absence or presence of 5 mM EGTA. Proteolysis was stopped by supplementing the assays with 20 mM EGTA; thylakoids were re-isolated by centrifugation, washed once and suspended in SDS loading buffer.

Protein concentrations were determined by using the Bio-Rad DC protein and BSA as the standard. When necessary, Coomassie-stained gels were used to calibrate loading. For immunoblot analyses, the proteins were separated by SDS/PAGE, blotted on to Immobilon-P membranes (Millipore) and incubated with antibodies as described previously [19].

Pigment analyses and chlorophyll fluorescence

For pigment analyses, leaf samples (70 mg fresh weight) were frozen in liquid nitrogen prior to grinding in DMF (dimethylformamide). The resulting extracts, after bubbling with nitrogen, were stored in the dark for 48 h at 4°C. Extracts were centrifuged at 12000 g for 5 min and pigment analyses were performed by HPLC using a 5 mm reverse-phase C₃₀ column (250 mm × 4 mm) coupled with a 20 mm × 4.6 mm C₃₀ guard (YMC) and a ProStar 330 photodiode array detector (Varian Analytical Instruments), as described previously [25]. Peak areas of the standards were determined using the Varian Poly View 2000 software supplied.

The maximal quantum yield of PSII (Photosystem II) photochemistry (F) with an F_v (variable fluorescence)/ F_{max} (maximum fluorescence) ratio was determined on attached leaves at room temperature (23°C) by chlorophyll fluorimetry using a PAM-2000 modulated fluorimeter (Waltz, Effeltrich, Germany) as described in [26].

Confocal microscopy, TEM (transmission electron microscopy) and immunogold electron microscopy

Chloroplasts in mesophyll and shoot cells were analysed by imaging the chlorophyll fluorescence by confocal laser scanning microscopy with a Leica TCS-SP2 operating system (Leica, Heidelberg, Germany). Chlorophyll was excited at 633 nm and the emitted fluorescence was detected between 643 and 720 nm.

For TEM and immunolocalization, leaf samples of 3-week-old plants were fixed in 2.5% (v/v) glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer for 2 h at room temperature. The samples were subsequently washed and post-fixed with 1% osmium tetroxide in water for 1 h at 4°C and then dehydrated in ethanol and infiltrated with an ethanol/resin mixture (2/3–1/3, 1/3–2/3 for Epon and 80–20, 60–40, 40–60, 20–80, 100, 100 last infiltration overnight for LR-White). Tissues were embedded in Epon for structural study and in LR-White for immunolocalization. Ultrathin sections (60 nm) were prepared with a diamond knife on a UC6 Leica ultramicrotome and collected on Formvar-coated 200 μm mesh nickel grids. Ultrathin sections were post-stained with 5% uranyl acetate in water and lead citrate before examining on a Philips CM200 electron microscope (Philips, Eindhoven, The Netherlands).

For immunolocalization, the sections were first incubated with 5% (w/v) BSA in PBS for 1 h at room temperature and then with anti-FtsZ1 antibodies (dilution of 1:4 in 1% BSA in

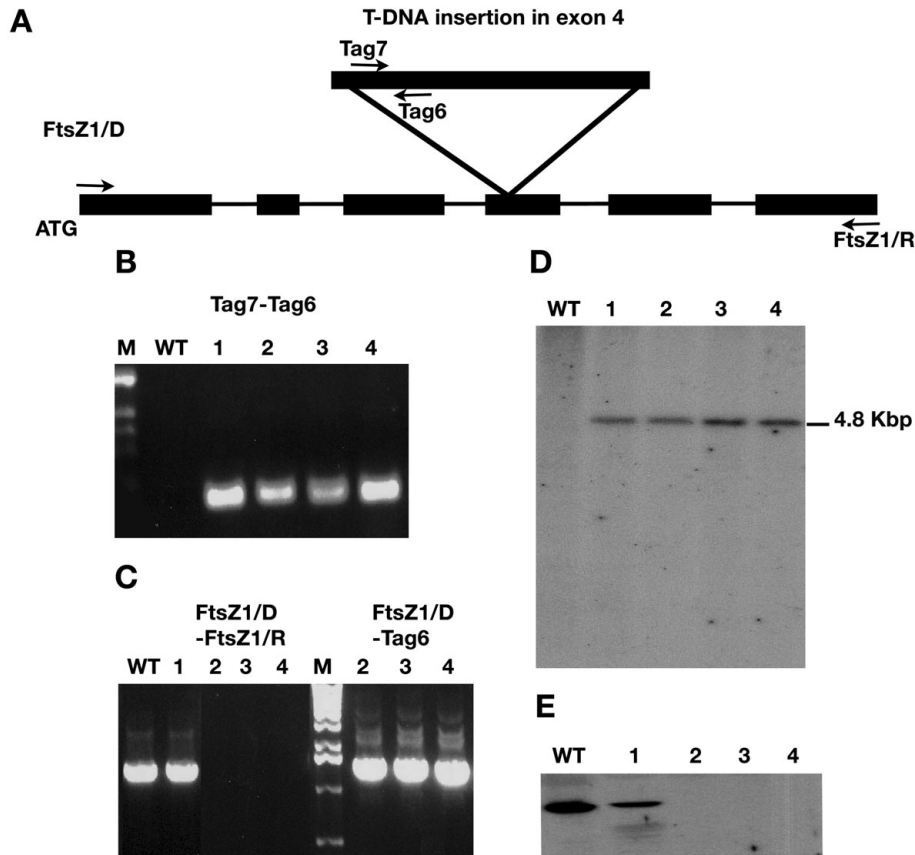


Figure 1 *ftsZ1* characterization

(A) Gene structure of *FtsZ1*. Black boxes, exons; lines, introns. The position of the T-DNA insertion in exon 4 is indicated together with the primer locations. (B, C) Identification of homozygous lines. PCR amplification with the indicated primers on genomic DNA extracted from WT and selected lines (1–4). 'M' indicates DNA size marker. (D) T-DNA insertion number in the mutant lines as analysed by Southern blot with the T-DNA internal probe. (E) Expression of FtsZ1 in the selected plants as analysed by immunoblotting with FtsZ1 antiserum.

PBS) overnight at 4 °C. Samples were then incubated with goat anti-rabbit IgG conjugated to 10 nm gold particles at a dilution of 1:20 in 1% BSA in PBS for 1 h at room temperature. Controls were performed by excluding the primary antibody. Finally, sections were post-stained with 5% uranyl acetate in water and lead citrate.

RESULTS

Phenotypic characterization of *ftsZ1*-deficient and *FtsZ1*-overexpressing plants

The *Arabidopsis* genome encodes a single FtsZ1 plastid division protein on chromosome 5 at the locus At5g55280. One *Arabidopsis* line containing a T-DNA insertion in exon 4 was identified by the Genoplante FLAGdb/FST initiative (Figure 1A). Plants homozygous for the mutant alleles were identified by PCR analysis of segregating plants (Figures 1B and 1C). Segregation values observed for kanamycin resistance (three-quarters resistant and one-quarter sensitive individuals after self-pollination of heterozygous plants) indicated that the mutant lines contained only one insertion of the T-DNA in their nuclear genome. The presence of only one T-DNA was also confirmed by Southern-blot analysis (Figure 1D). Only the 4.8 kbp *EcoRI* fragment, expected from the restriction data, was detected. Western-blot analysis confirmed the absence of FtsZ1 protein in the selected mutant lines (Figure 1E). Western blots showed FtsZ1 protein

expression in WT plants and in the heterozygous line 1, but no expression in the homozygous lines 2, 3 and 4.

Mature *ftsZ1* mesophyll and stem cells contained fewer, but larger chloroplasts than the corresponding cells in WT, although the cell sizes between the two plants were similar (Figures 2A, top panels, and 2B). The average chloroplast number at the equatorial plane decreased from 16 in WT mesophyll cells and 14 in WT stem cells to 7 and 4 respectively in *ftsZ1* cells. The mutant phenotype was rescued by low-level expression of the *FtsZ1* cDNA as shown by Western blotting, which did not alter the WT phenotype when expressed in WT plants (Figure 2A, middle panels). However, overexpression of *FtsZ1* had a drastic effect on chloroplast division in both the WT and *ftsZ1* backgrounds, with cells harbouring only few enlarged chloroplasts (Figure 2A, bottom panels). This corroborates previous results showing altered stoichiometry of FtsZ affecting chloroplast division [27]. As illustrated with the stem cells (Figure 2B), all cells of a given tissue were strongly affected by the absence or overexpression of the FtsZ1 protein. In all the mutant cells examined, the shape of the large chloroplasts was irregular, having lost the characteristic globular structure as observed in the WT plants. Compared with WT plants, *ftsZ1* and *FtsZ1*-overexpressing lines exhibited accelerated growth (Figure 2C) and began flowering approx. 1 week earlier, on average, than WT plants (2 weeks after germination for the mutant plants compared with 3 weeks for the WT plants). *ftsZ1* and *35S::FtsZ1* plants flowered with the same number of rosette leaves (an

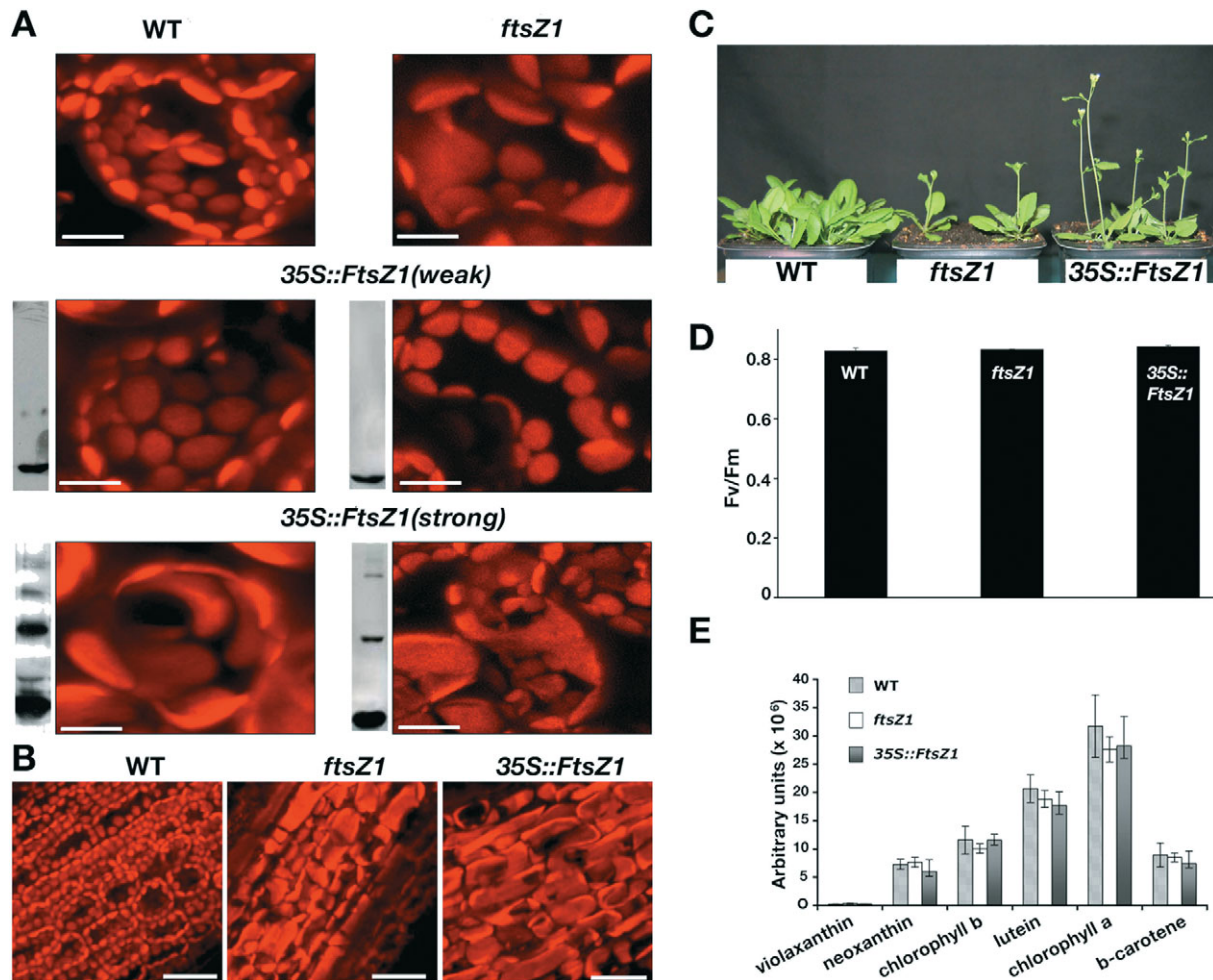


Figure 2 Phenotype of *ftsZ1* and *FtsZ1*-overexpressing plants

(A) Top panels: confocal micrographs of chloroplasts of WT (left column) and *ftsZ1* (right column) plant leaves. Middle and bottom panels: WT and *ftsZ1* plants expressing *FtsZ1* under the control of the 35S promoter. Relative *FtsZ1* expression levels are shown by immunoblots on the left side of each panel. Scale bar, 20 μm . (B) Confocal micrographs of hypocotyl cells from WT, *ftsZ1* and overexpressing (*35S::FtsZ1*) plants. Scale bar, 40 μm . (C) Phenotype of 4-week-old WT, *ftsZ1* and *35S::FtsZ1* plants. (D) Chlorophyll fluorescence was measured as described in the Experimental section. Error bars represent the S.D. for three measurements. (E) Accumulation of pigments indicated on the horizontal axis was measured as described in the Experimental section. Error bars represent the S.D. for three measurements.

average of 8 leaves) when the WT plants flowered with an average of 14 larger rosette leaves. After 6 weeks of growth, the size of the mutant plants was greatly reduced compared with the WT plants. Both mutant lines were able to produce viable seeds. Photosynthesis was investigated using pulse-amplitude-modulated chlorophyll fluorescence analysis and pigment content on 3-week-old plantlets. The F_v/F_{max} ratio was identical between the mutant plants and the WT plants (Figure 2D). This indicates that the PSII reaction centre was properly assembled and photochemically competent in both mutant plants. Equally, the amount of photosynthetic pigments was unaltered in both mutant plants (Figure 2E).

Chloroplast morphology and ultrastructure is affected in *ftsZ1* and *35S::FtsZ1* plants

Three-week-old rosette leaves were fixed for TEM and observed at different levels of magnification. In WT plants, individual ellipsoidal chloroplasts, aligned along the cytoplasmic membrane,

were observed at the cellular level (Figure 3A). These chloroplasts contained starch granules, and their internal structures, including evenly stacked granal thylakoids connected by stromal lamellae, were completely developed (Figures 3D and 3G). These lamellae are oriented along the convex side of the chloroplast facing the interior of the cell. In contrast, abnormally long chloroplasts were observed in the leaves of *ftsZ1* (Figure 3B) and *35S::FtsZ1* plants (Figure 3C). Although the long chloroplasts in the null plant were aligned along the plasma membrane, as was observed in the WT plant, the chloroplasts were detached from the plasma membrane at several points in the *FtsZ1*-overexpressing plant. Changes in thylakoid orientation were often observed in the null plant (Figure 3E; see also Supplementary Figure S1 at <http://www.BiochemJ.org/bj/409/bj4090087add.htm>), and membranes appeared less appressed (Figure 3H). Overexpression of *FtsZ1* induced an increased network of twisting thylakoids (Figure 3F) and an increased number of thylakoids per grana stack (Figure 3I). An increase in starch granule number was observed in the null mutants, but no starch granules were observed in *FtsZ1*-overexpressing plants.

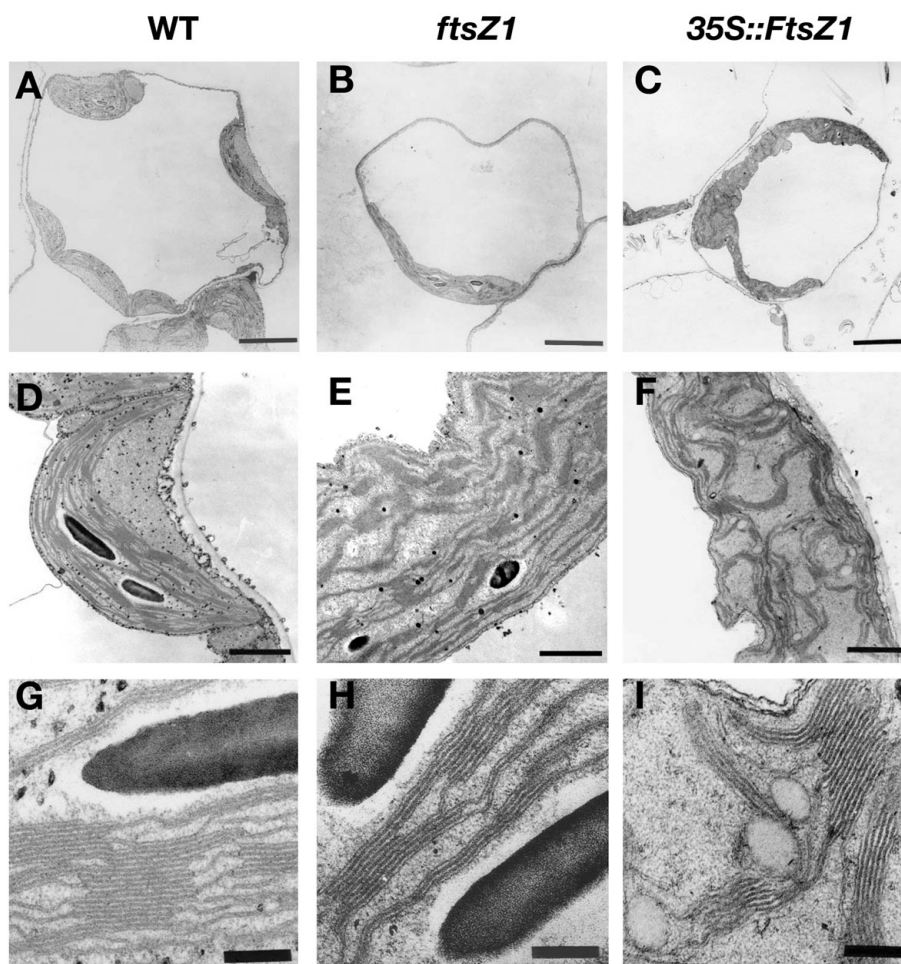


Figure 3 FtsZ1 affects chloroplast morphology and ultrastructure

Electron micrographs of rosette leaf mesophyll chloroplasts from 3-week-old WT, *FtsZ1* and *35S::FtsZ1* plants. (A–C) Overviews showing the chloroplast number and morphology within the cells (scale bar, 5 μm). (D–F) Inside chloroplast views showing the thylakoid arrangement (scale bar, 1 μm). (G–I) Higher magnification showing the grana stacking (scale bar, 200 nm).

FtsZ1 is localized within the stroma, but is also found associated with the thylakoids

The changes in thylakoid organization in *ftsZ1*-null and *ftsZ1*-overexpressing plants indicated a possible role of FtsZ1 in thylakoid integrity and therefore suggested an association or at least some contact between FtsZ1 and thylakoid membranes. In order to test this hypothesis, we investigated the localization of FtsZ1 proteins in WT *Arabidopsis* plants by suborganellar fractionation and Western blotting, using an anti-FtsZ1 antibody previously shown to react with proteins from purified chloroplast extracts [28] (Figure 4A). The stromal, thylakoid and envelope fractions were purified from lysed chloroplasts by sucrose-density-gradient centrifugation [24]. Blots were first probed with the anti-FtsZ1 antibody and subsequently probed with antisera against (i) KARI (ketol-acid reducto-isomerase), a stromal protein involved in the amino acid biosynthetic pathway [29], (ii) PsbB (CP47), a thylakoid-integrated subunit of the PSII reaction centre, (iii) IEP37, an inner envelope protein of 37 kDa [30], and (iv) OEP21, an outer envelope protein of 21 kDa [31]. An FtsZ1 signal co-localized with the stromal and thylakoid controls, but not with the envelope proteins, suggesting that FtsZ1 localizes to thylakoid membranes (Figure 4A). Purified thylakoids were next washed with 1 M NaCl, 0.1 M Na_2CO_3 (pH 11.5) or 0.1 M

NaOH to further characterize the association of FtsZ1 with the thylakoid membranes (Figure 4B). FtsZ1 was not released from the thylakoids by ionic extraction but was solubilized by alkaline extractions, indicating that it is peripherally associated with the membrane. The localization with the thylakoid membranes is independent of magnesium concentration because in the presence of EDTA, FtsZ1 is still detected in the thylakoid fraction (Figure 4B). As a control, release of PsbB from membranes was tested under identical conditions, but none was observed. It is therefore possible that FtsZ1 is associated with one leaflet of the membrane via lipid interaction.

To determine FtsZ1 topology, thermolysin proteolysis was performed with isolated thylakoids (Figure 4C). Under such a treatment, proteins on the stromal side of the thylakoid membrane are degradable, while lumen proteins, not accessible to thermolysin, are protected. FtsZ1 was accessible to thermolysin in the absence of EGTA, while the addition of EGTA inhibited the cleavage reaction, suggesting that FtsZ1 is located on the stromal-facing side of the thylakoid membranes.

To confirm the localization of FtsZ1 visually, immunoelectron microscopy was performed with 3-week-old *Arabidopsis* WT and *FtsZ1*-overexpressing plants (*35S::FtsZ1*). Small clusters and large clusters of gold particles in the WT and *35S::FtsZ1* plants respectively were observed in close association with the thylakoid

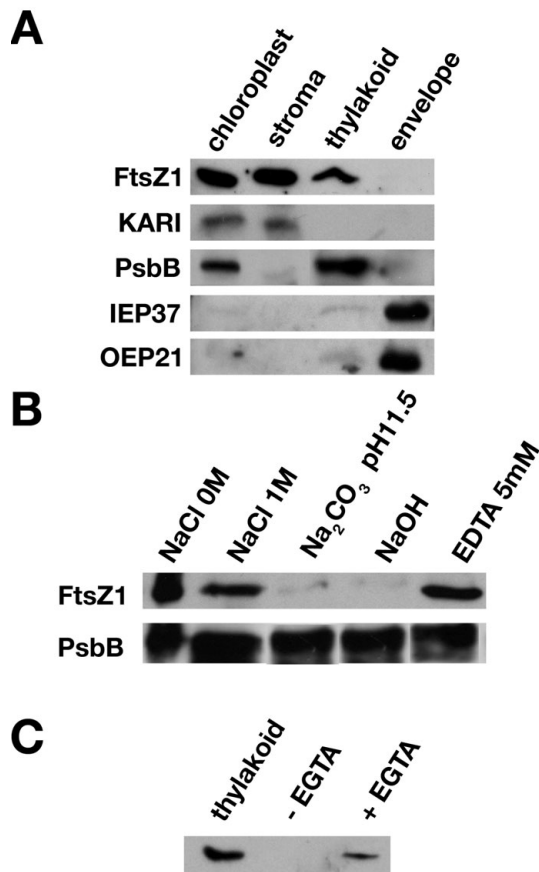


Figure 4 FtsZ1 is localized in the stroma and thylakoid membranes

(A) Immunoblots of protein fractions (30 μ g of each) isolated from chloroplasts, stroma, thylakoids and envelopes of 4-week-old plants were analysed with FtsZ1, KARI, PsbB (Agrisera, Vännäs, Sweden), IEP37 and OEP21 antisera. The faint signal in the thylakoid fraction observed with the envelope markers indicated a very low level of contamination of the thylakoids with envelope membranes. (B) Purified thylakoids (30 μ g of proteins) were incubated for 30 min in the indicated solutions, and the proteins present after centrifugation in the pellet were analysed by immunoblotting with either the anti-FtsZ1 or anti-PsbB antibodies. (C) Thylakoid fractions were incubated with thermolysin (100 μ g \cdot ml⁻¹) in the absence (-EGTA) or presence (+EGTA) of EGTA. The control (no thermolysin) proteins (thylakoid) and treated thylakoid proteins were analysed by immunoblotting with the anti-FtsZ1 antibody.

network (Figure 5). The large number of gold particles in the 35S::FtsZ1 plant are in agreement with the results observed by immunoblot analysis (Figure 2A).

Association of FtsZ1 with the thylakoids is developmentally regulated

FtsZ1 was reported previously to be a soluble protein found only in the stromal fraction [19,32], while our results suggest that FtsZ1 is also associated with thylakoid membranes. To understand this discrepancy, we investigated whether FtsZ1 association with the thylakoids differed at various points during plant development. To test this hypothesis, we examined developmentally associated changes in FtsZ1 protein amount and localization by Western blotting. Proteins from subplastidial fractions were obtained from plants grown for 22, 35 and 43 days. A strong FtsZ1 signal was observed in the thylakoid fraction as well as in the stromal fraction of plants grown for 22 days (Figure 6). After 35 days of growth, only a faint signal was observed in the thylakoid fraction, while a strong signal was observed in the stromal fraction. FtsZ1 is no longer detected in the thylakoid fraction, but is still

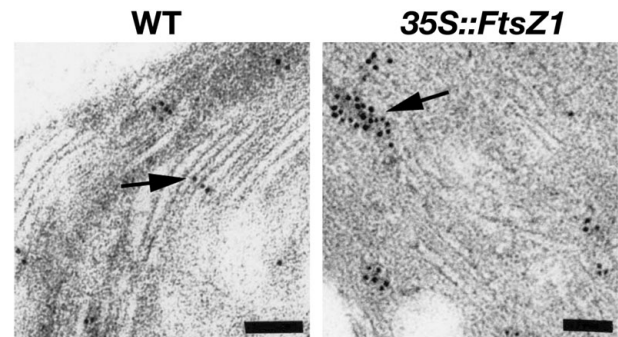


Figure 5 Immunolocalization of the FtsZ1 protein in association with *Arabidopsis* thylakoids

Ultrathin sections of chloroplasts from WT and overexpressing (35S::FtsZ1) plants were incubated successively with anti-FtsZ1 antibodies and goat anti-(rabbit IgG) secondary antibody conjugated to colloidal gold. Gold clusters in association with the thylakoids are indicated by the arrow in both panels (scale bar, 100 nm).

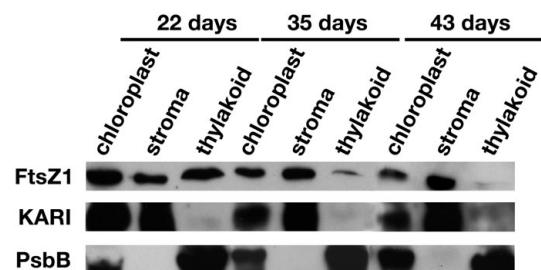


Figure 6 FtsZ1 association with the thylakoids is developmentally regulated

Immunoblot analysis of protein fractions (30 μ g of each) isolated from chloroplasts, stroma and thylakoids of 22-, 35- and 43-day-old plants respectively with FtsZ1, KARI and PsbB antisera.

strongly present in the stroma in plants grown for 43 days. As expected, KARI was present only in the stroma, whereas PsbB was found exclusively in thylakoids, indicating the purity of the two fractions. The correlation between the level of FtsZ1 in the thylakoid fraction and the developmental stage of the tissue demonstrated the regulation of FtsZ1 localization within the chloroplast.

DISCUSSION

In order to highlight new plant-specific functions for FtsZ1, we have characterized an *ftsZ1*-null mutant of *Arabidopsis*. As expected from previous reports using an antisense strategy [27], *ftsZ1* mutant cells contained fewer but larger chloroplasts than WT plants. Inhibition of chloroplast division is rescued by expressing FtsZ1 in these mutant plants, but the complementation is dose-dependent, since weak expression restores the WT phenotype, while a strong expression causes inhibition of chloroplast division and changes in chloroplast morphology, as previously shown [33]. Such a dose-dependent effect also occurs when FtsZ1 is expressed in *E. coli*, mimicking the expression of other bacterial *ftsZ* genes in *E. coli* [19]. These results confirm that a strict stoichiometry between subunits of the chloroplast division machinery is necessary for proper division. The overall life cycle of both *ftsZ1* plants and FtsZ1-overexpressing lines is not affected, confirming that impaired plastid division has no significant effect on plant growth and development [34], although these plants are smaller than WT controls, flower earlier and contain a reduced number

of rosette leaves. This phenotype is not a direct consequence of smaller cells and/or diminished photosynthetic yield, since the cell size and photosynthetic capacity, as determined by measuring the maximal photochemical efficiency of PSII and quantifying the photosynthetic pigments, are unaltered in both transgenic lines. Developmental variation in the rate of leaf initiation has been suggested to result from change in the rate of cell division in the SAM (shoot apical meristem) [35]. The phenotype observed in the mutant plants might be driven by changes in cell division in the SAM, thus connecting cell division and plastid division as suggested by a number of studies [18,20,21,36].

Mesophyll chloroplast ultrastructure is affected differently in the null and FtsZ1-overexpressing plants. FtsZ1 chloroplasts have frequent changes in their thylakoid orientation and fewer thylakoids per granal stack, while FtsZ1-overexpressing chloroplasts display a highly disturbed thylakoid network with an increase in granal stacking. Organizational changes of the thylakoid membranes within some, but not all, chloroplast division mutants have also been described. Granal stacks in *GCI* (giant chloroplasts 1)-deficient giant chloroplasts are more densely packed than in WT plants [37]. Thylakoids in *arc5* and *arc6* chloroplasts are also highly stacked when compared with WT chloroplasts and show increased stacking when plants are grown under high light [38]. Under the same conditions, a decrease is observed with WT plants. Interestingly, FtsZ1-overexpressing plants show an increased network of twisting thylakoids similar to those observed in *arc3* [38]. These results demonstrate that some proteins involved in plastid division also affect chloroplast internal structures. GCI is plastid-localized and is anchored to the stromal surface of the chloroplast inner envelope [37]. *Arc5* encodes a cytosolic dynamin-like protein and forms a cytosolic ring structure on the outside of the chloroplast [39]. *Arc6*, which encodes a J-domain protein and is a homologue of the cyanobacterial cell division protein Ftn2 [15], has been shown to be an integral inner envelope membrane protein. *Arc3*, a fusion of FtsZ and PIP5K (phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase) [40], has recently been shown to be located in the stroma [41]. None of these proteins have been found associated with thylakoids, suggesting that the effect on the thylakoid network in these mutants is indirect. The twisting thylakoids observed in *arc3*, resembling those observed in the FtsZ1-overexpressing plants, might result from the misplacement of FtsZ1. As a matter of fact, *Arc3* has been shown to interact specifically with FtsZ1, acting in division site placement [41].

The localization of FtsZ proteins in higher plants is more complex. Both FtsZ1 and FtsZ2 have been found in the chloroplast stromal compartment in *Arabidopsis* chloroplasts [32], but localization in the thylakoid fraction has not been addressed previously. We have shown that FtsZ1 and FtsZ2 are localized within the stroma in chloroplasts from mature spinach (*Spinacia oleracea*) leaves, but that FtsZ2 is also found associated with the chloroplast envelopes [19]. In the present study, we show that FtsZ1 is present in the stromal and thylakoid fractions from the chloroplasts of young *Arabidopsis* seedlings. Moreover, we demonstrate that the levels of FtsZ1 associated with the thylakoids decreases with the age of the plants. This result shows that FtsZ1 localization within the chloroplast is developmentally regulated and suggests that the protein fulfils specific functions at different stages of plant development. It is not known yet whether the difference in localization between spinach and *Arabidopsis* is a consequence of the different developmental stage and/or culture conditions of the analysed plants. In the previous experiments, spinach leaves, purchased from a local market, were grown under external conditions, while *Arabidopsis* plants in the present study were grown under strict controlled temperature and light

conditions. It is not known so far whether FtsZ1 association with the thylakoids is dependent on these growth conditions. Alternatively, it is possible that the discrepancy reflects species difference.

The thylakoid organization phenotypes associated with the absence or overexpression of FtsZ1 in the mutant plants corroborate the hypothesis that FtsZ1 is involved in determining thylakoid morphology. It is therefore conceivable that the organizational changes of the thylakoid membranes within the *arc* chloroplasts reflect an increased localization of FtsZ1 within the thylakoids in the absence of the ARC proteins. Interestingly, dynamin-like proteins, which are involved in plastid division [39], have also been shown to be a determinant in thylakoid morphology [42,43]. In *Arabidopsis*, FZL, which is related to FZO, a dynamin protein involved in mitochondrial morphology in fungi and animals, is distributed between the thylakoid and envelope membranes. *Fzl* mutants have abnormalities in the morphology and distribution of granal and stromal thylakoids [43]. The results presented in this paper suggest that the dynamic duo of FtsZ and dynamin, which has been shown to be involved in plastid division, participates in the remodelling of the thylakoid membranes. FtsZ1 and FZL are not involved in the early steps of thylakoid biogenesis since both *ftsZ1* and *fzo* chloroplasts have a preformed thylakoid network. Other proteins such as VIPP1 (vesicle-inducing protein in plastids 1) [44] and Thf1 (thylakoid formation 1) [45] have been implicated in chloroplast vesicle trafficking and have been shown to affect thylakoid formation. The association of FtsZ1 with the thylakoids during leaf expansion suggests that FtsZ1 might be involved in thylakoid membrane partitioning to daughter plastids during division and in the re-arrangement of the internal membrane structures when new thylakoid membranes are synthesized, thus highlighting specific functions for green plastid FtsZ.

We thank Catherine Albrieux (Physiologie Cellulaire Végétale, Grenoble, France) for help with the thylakoid purification; Maryse Block (Physiologie Cellulaire Végétale, Grenoble, France) for helpful comments on the chloroplast membrane system; Hélène Pesey, Jean-Pierre Alcaraz, Eliane Charpentier, Abder Lahroussi and Damien Nissou for technical assistance; Marcel Kuntz for help with the pigment analysis; Renaud Dumas (Physiologie Cellulaire Végétale, Grenoble, France) for the gift of the anti-KARI antibody; and Maryse Block (Physiologie Cellulaire Végétale, Grenoble, France) for anti-IEP37 and anti-OEP21 antibodies. We thank Livia Merendino and Stéphane Lobreaux for a critical reading of this paper prior to submission, and Thomas Bollenbach (Cornell University) for advice on improving the English in this paper. This work was supported by a grant (ACI-DRAB (Action Concertée Incitative-Dynamique et Réactivité des Assemblages Biologiques) 03/41, number 03 5 90 to D.F. and number 03 5 92 to I.P.-P.] from the CNRS and the MEN (Ministère de l'Éducation Nationale), by the Egyptian government (fellowship to E.-S.E.-K.), and by the Ivory Coast government (fellowship to M.K.).

REFERENCES

- Addinall, S. G. and Holland, B. (2002) The tubulin ancestor, FtsZ, draughtsman, designer and driving force for bacterial cytokinesis. *J. Mol. Biol.* **318**, 219–236
- Errington, J., Daniel, R. A. and Scheffers, D.-J. (2003) Cytokinesis in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**, 52–65
- Margolin, W. (2003) Bacterial division: the fellowship of the ring. *Curr. Biol.* **13**, R16–R18
- Osteryoung, K. W. and Nunnari, J. (2003) The division of endosymbiotic organelles. *Science* **302**, 1698–1704
- Miyagishima, S., Nishida, K. and Kuroiwa, T. (2003) An evolutionary puzzle: chloroplast and mitochondrial division rings. *Trends Plant Sci.* **8**, 432–438
- Maple, J. and Moller, S. G. (2005) An emerging picture of plastid division in higher plants. *Planta* **223**, 1–4
- Gilson, P. R. and Beech, P. L. (2001) Cell division protein FtsZ: running rings around bacteria, chloroplasts and mitochondria. *Res. Microbiol.* **152**, 3–10
- Lowe, J. and Amos, L. A. (1998) Crystal structure of the bacterial cell division protein FtsZ. *Nature* **391**, 203–206
- Goehring, N. W. and Beckwith, J. (2005) Diverse paths to midcell: assembly of the bacterial cell division machinery. *Curr. Biol.* **15**, R514–R526

- 10 Stokes, K. D. and Osteryoung, K. W. (2003) Early divergence of the FtsZ1 and FtsZ2 plastid division gene families in photosynthetic eukaryotes. *Gene* **320**, 97–108
- 11 Kiefel, B. R., Gilson, P. R. and Beech, P. L. (2004) Diverse eukaryotes have retained mitochondrial homologues of the bacterial division protein FtsZ. *Protist* **155**, 105–115
- 12 Miyagishima, S. Y. (2005) Origin and evolution of the chloroplast division machinery. *J. Plant Res.* **118**, 295–306
- 13 Ma, X. and Margolin, W. (1999) Genetic and functional analyses of the conserved C-terminal core domain of *Escherichia coli* FtsZ. *J. Bacteriol.* **181**, 7531–7544
- 14 Osteryoung, K. W. and McAndrew, R. S. (2001) The plastid division machine. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **52**, 315–333
- 15 Vitha, S., Froehlich, J. E., Koksharova, O., Pyke, K. A., van Erp, H. and Osteryoung, K. W. (2003) ARC6 is a J-domain plastid division protein and an evolutionary descendant of the cyanobacterial cell division protein Ftn2. *Plant Cell* **15**, 1918–1933
- 16 Maple, J., Aldridge, C. and Moller, S. G. (2005) Plastid division is mediated by combinatorial assembly of plastid division proteins. *Plant J.* **43**, 811–823
- 17 Wang, X., Huang, J., Mukherjee, A., Cao, C. and Lutkenhaus, J. (1997) Analysis of the interaction of FtsZ with itself, GTP, and FtsA. *J. Bacteriol.* **179**, 5551–5559
- 18 El-Shami, M., El-Kafafi, S., Falconet, D. and Lerbs-Mache, S. (2002) Cell cycle-dependent modulation of FtsZ expression in synchronized tobacco BY2 cells. *Mol. Genet. Genomics* **267**, 254–261
- 19 El-Kafafi, S., Mukherjee, S., El-Shami, M., Putaux, J. L., Block, M. A., Pignot-Paintrand, I., Lerbs-Mache, S. and Falconet, D. (2005) The plastid division proteins, FtsZ1 and FtsZ2, differ in their biochemical properties and sub-plastidial localization. *Biochem. J.* **387**, 669–676
- 20 Kiessling, J., Martin, A., Gremillon, L., Rensing, S. A., Nick, P., Sarnighausen, E., Decker, E. L. and Reski, R. (2004) Dual targeting of plastid division protein FtsZ to chloroplasts and the cytoplasm. *EMBO Rep.* **5**, 889–894
- 21 Raynaud, C., Perennes, C., Reuzeau, C., Catrice, O., Brown, S. and Bergounioux, C. (2005) Cell and plastid division are coordinated through the prereplication factor AtCDT1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 8216–8221
- 22 Bensmihen, S., To, A., Lambert, G., Kroj, T., Giraudat, J. and Parcy, F. (2004) Analysis of an activated ABI5 allele using a new selection method for transgenic *Arabidopsis* seeds. *FEBS Lett.* **561**, 127–131
- 23 Hurkman, W.-J. and Tanaka, C. K. (1986) Solubilization of plant membrane-proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis. *Plant Physiol.* **81**, 802–806
- 24 Block, M. A., Tewari, A. K., Albricieux, C., Marechal, E. and Joyard, J. (2002) The plant S-adenosyl-L-methionine:Mg-protoporphyrin IX methyltransferase is located in both envelope and thylakoid chloroplast membranes. *Eur. J. Biochem.* **269**, 240–248
- 25 Fraser, P. D., Pinto, M. E., Holloway, D. E. and Bramley, P. M. (2000) Technical advance: application of high-performance liquid chromatography with photodiode array detection to the metabolic profiling of plant isoprenoids. *Plant J.* **24**, 551–558
- 26 Klimyuk, V. I., Persello-Cartieaux, F., Havaux, M., Contard-David, P., Schuenemann, D., Meierhoff, K., Gouet, P., Jones, J. D., Hoffman, N. E. and Nussaume, L. (1999) A chromodomain protein encoded by the *Arabidopsis* CAO gene is a plant-specific component of the chloroplast signal recognition particle pathway that is involved in LHCP targeting. *Plant Cell* **11**, 87–99
- 27 Osteryoung, K. W., Stokes, K. D., Rutherford, S. M., Percival, A. L. and Lee, W. Y. (1998) Chloroplast division in higher plants requires members of two functionally divergent gene families with homology to bacterial *ftsZ*. *Plant Cell* **10**, 1991–2004
- 28 Osteryoung, K. W. and Vierling, E. (1995) Conserved cell and organelle division. *Nature* **376**, 473–474
- 29 Dumas, R., Biou, V., Halgand, F., Douce, R. and Duggleby, R. G. (2001) Enzymology, structure, and dynamics of acetohydroxy acid isomeroreductase. *Acc. Chem. Res.* **34**, 399–408
- 30 Block, M. A., Dorne, A. J., Joyard, J. and Douce, R. (1983) Preparation and characterization of membrane fractions enriched in outer and inner envelope membranes from spinach chloroplasts. I – Electrophoretic and immunochemical analyses. *J. Biol. Chem.* **258**, 13273–13280
- 31 Jouhet, J., Marechal, E., Baldan, B., Bligny, R., Joyard, J. and Block, M. A. (2004) Phosphate deprivation induces transfer of DGDG galactolipid from chloroplast to mitochondria. *J. Cell Biol.* **167**, 863–874
- 32 McAndrew, R. S., Froehlich, J. E., Vitha, S., Stokes, K. D. and Osteryoung, K. W. (2001) Colocalization of plastid division proteins in the chloroplast stromal compartment establishes a new functional relationship between FtsZ1 and FtsZ2 in higher plants. *Plant Physiol.* **127**, 1656–1666
- 33 Stokes, K. D., McAndrew, R. S., Figueroa, R., Vitha, S. and Osteryoung, K. W. (2000) Chloroplast division and morphology are differentially affected by overexpression of FtsZ1 and FtsZ2 genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **124**, 1668–1677
- 34 Pyke, A. K. and Leech, M. R. (1994) A genetic analysis of chloroplast division and expansion in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **104**, 201–207
- 35 Poethig, R. S. (2003) Phase change and the regulation of developmental timing in plants. *Science* **301**, 334–336
- 36 Asano, T., Yoshioka, Y., Kurei, S., Sakamoto, W. and Machida, Y. (2004) A mutation of the CRUMPLED LEAF gene that encodes a protein localized in the outer envelope membrane of plastids affects the pattern of cell division, cell differentiation, and plastid division in *Arabidopsis*. *Plant J.* **38**, 448–459
- 37 Maple, J., Fujiwara, M. T., Kitahata, N., Lawson, T., Baker, N. R., Yoshida, S. and Moller, S. G. (2004) GIANT CHLOROPLAST 1 is essential for correct plastid division in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* **14**, 776–781
- 38 Li, J. A. and Webber, A. N. (2005) Photosynthesis in *Arabidopsis thaliana* mutants with reduced chloroplast number. *Photosynth. Res.* **85**, 373–384
- 39 Gao, H., Kadirjan-Kalbach, D., Froehlich, J. E. and Osteryoung, K. W. (2003) ARC5, a cytosolic dynamin-like protein from plants, is part of the chloroplast division machinery. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 4328–4333
- 40 Shimada, H., Koizumi, M., Kuroki, K., Mochizuki, M., Fujimoto, H., Ohta, H., Masuda, T. and Takamiya, K. (2004) ARC3, a chloroplast division factor, is a chimera of prokaryotic FtsZ and part of eukaryotic phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase. *Plant Cell Physiol.* **45**, 960–967
- 41 Maple, J., Vojta, L., Soll, J. and Moller, S. G. (2007) ARC3 is a stromal Z-ring accessory protein essential for plastid division. *EMBO Rep.* **8**, 293–299
- 42 Park, J. M., Cho, J. H., Kang, S. G., Jang, H. J., Pih, K. T., Piao, H. L., Cho, M. J. and Hwang, I. (1998) A dynamin-like protein in *Arabidopsis thaliana* is involved in biogenesis of thylakoid membranes. *EMBO J.* **17**, 859–867
- 43 Gao, H., Sage, T. L. and Osteryoung, K. W. (2006) FZL, an FZO-like protein in plants, is a determinant of thylakoid and chloroplast morphology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 6759–6764
- 44 Kroll, D., Meierhoff, K., Bechtold, N., Kinoshita, M., Westphal, S., Voithknecht, U. C., Soll, J. and Westhoff, P. (2001) VIPP1, a nuclear gene of *Arabidopsis thaliana* essential for thylakoid membrane formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 4238–4242
- 45 Wang, Q., Sullivan, R. W., Kight, A., Henry, R. L., Huang, J., Jones, A. M. and Korth, K. L. (2004) Deletion of the chloroplast-localized Thylakoid formation1 gene product in *Arabidopsis* leads to deficient thylakoid formation and variegated leaves. *Plant Physiol.* **136**, 3594–3604

Received 23 April 2007/17 July 2007; accepted 28 August 2007

Published as BJ Immediate Publication 28 August 2007, doi:10.1042/BJ20070543

CHAPITRE II

Caractérisation des mutants *FtsZ2*

CHAPITRE II

Caractérisation des mutants *FtsZ2*

Les mutants pour les deux isoformes de la protéine *FtsZ2* chez *Arabidopsis*, à savoir *FtsZ21* et *FtsZ22* ont été obtenus dans la collection des mutants d'insertion d'*Arabidopsis* écotype Columbia (Col) du Salk Institut à San Diego (USA).

1. Caractérisation des mutants *FtsZ21* et *FtsZ22*

1.1. Criblage des plantes mutantes *FtsZ21* et *FtsZ22*

Nous avons reçu les graines T2 pour une seule lignée mutante pour le gène *FtsZ21* dans laquelle l'insertion de l'ADN-T est dans l'intron 3 (figure 1) et pour deux lignées mutantes pour le gène *FtsZ22* portant chacune une insertion de l'ADN-T dans l'exon 3 (mutant *FtsZ22A*) et dans l'exon 2 (mutant *FtsZ22B*). Les gènes *FtsZ21* et *FtsZ22* sont situés respectivement sur les chromosomes 2 et 3 d'*Arabidopsis*.

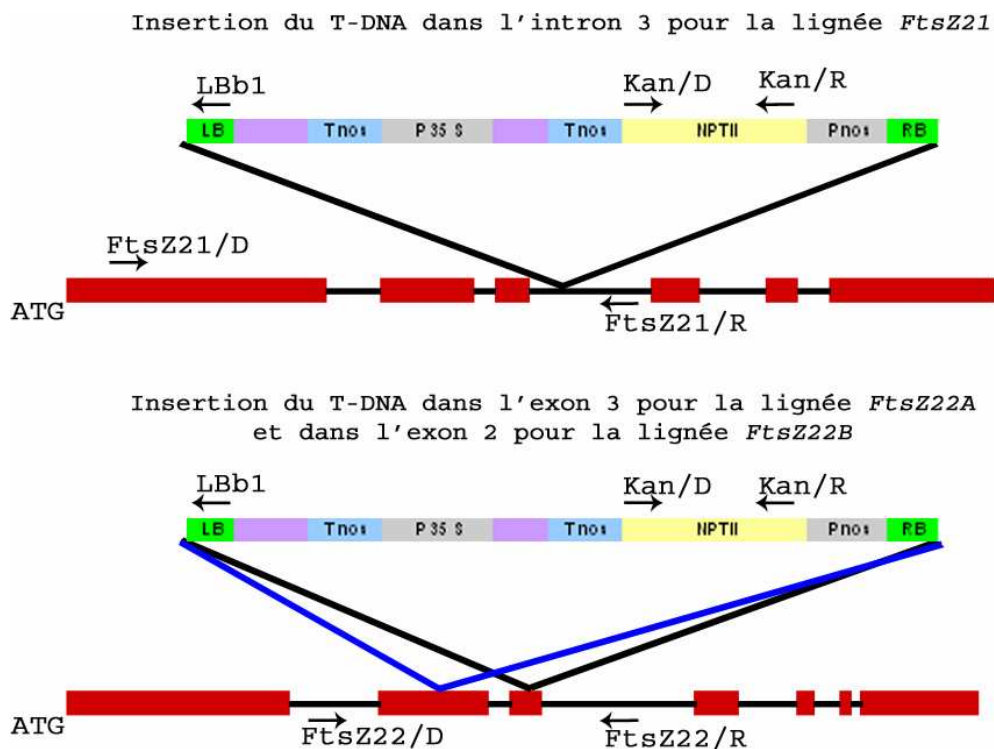


Figure 1. Structure des gènes *FtsZ21* et *FtsZ22*. Les exons sont indiqués avec des rectangles rouges et les introns avec les lignes noires. L'insertion de l'ADN-T ainsi que la localisation des amorces sont indiquées.

Après culture et fécondation, la descendance des lignées que nous avons reçues est propagée en serre, sans sélection, par un semis en terre. La stratégie utilisée pour s'assurer que les plantes que nous utiliserons dans nos analyses ne comportent qu'un ADN-T dans le gène d'intérêt est présentée dans la figure 2.

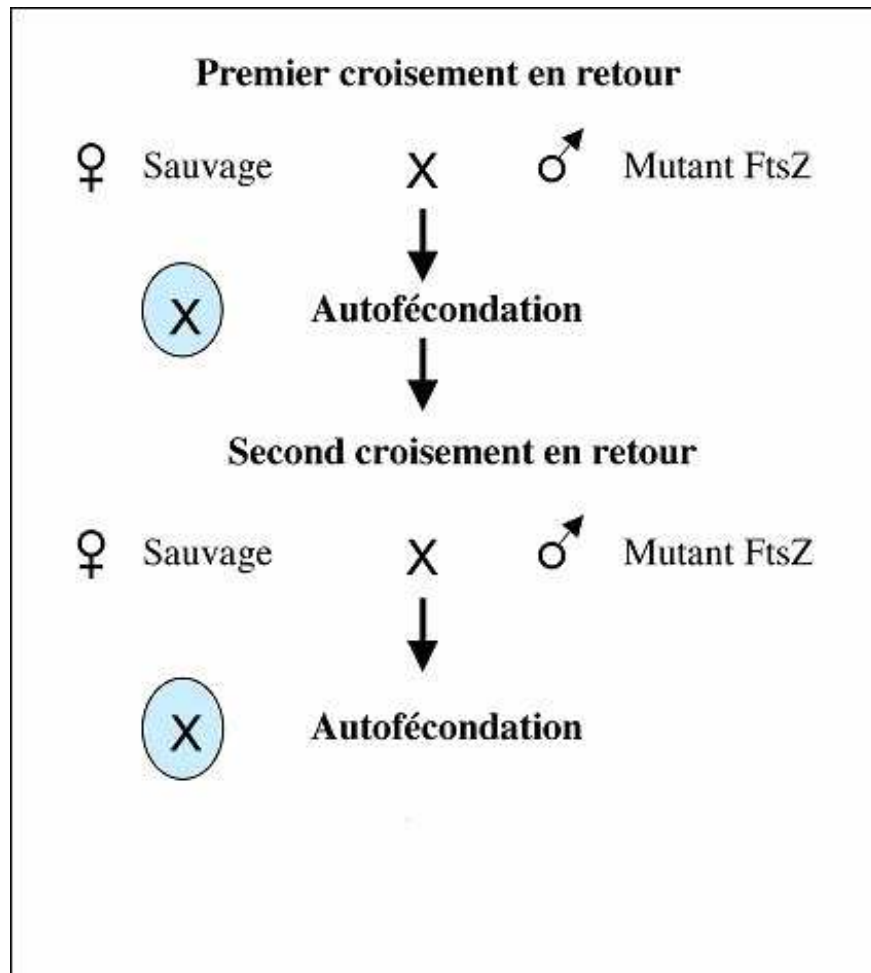


Figure 2. Stratégie utilisée pour l'obtention de plantes mutantes homozygotes

L'insertion de l'ADN-T dans les gènes *FtsZ2* a été suivie par PCR après chaque rétrocroisement en utilisant d'une part des amorces spécifiques de l'ADN-T et d'autre part des amorces spécifiques des gènes *FtsZ2* (Figure 1). Les amorces utilisées dans les amplifications PCR sont indiquées dans le tableau 1. Après le deuxième rétrocroisement, pour chacune des lignées mutantes nous avons observé par sélection sur la kanamycine un rapport mendélien 1/4S-3/4R suggérant une intégration unique de l'ADN-T.

Tableau 1. Amorces utilisées dans l'étude des mutants *FtsZ2*

| | |
|----------|-----------------------|
| Kan/D | AAGGCGATAGAAGGCGATGC |
| Kan/R | AATGAACTGCAGGACGAGGC |
| LBb1 | GCGTGGACCGCTTGCTGCAAC |
| FtsZ21/D | ATGCTTAGAGGTGAAGGGACT |
| FtsZ21/R | GAAAGAATCAGCACGTTGCA |
| FtsZ22/D | GCTGCCTCCATAGATTGACT |
| FtsZ22/R | ATGATGCAGCAGATAGAGCC |

La figure 3 présente les résultats obtenus pour le génotypage des plantes par PCR. Nous avons confirmé pour les trois plantes mutantes *FtsZ21* (Figure 3A), *FtsZ22A* (Figure 3B) et *FtsZ22B* (Figure 3C) la présence de l'ADN-T dans les mutants avec les amorces internes (Kan/D-Kan/R) du gène kanamycine présent sur le vecteur. Pour les trois plantes, un fragment de 600 pb est amplifié. La présence de l'ADN-T dans le gène d'intérêt est montré par les amplifications avec les amorces internes des différents gènes. Des fragments de 1291 pb et 629 pb sont amplifiés pour les gènes *FtsZ21* et *FtsZ22* dans les plantes sauvages, respectivement. Sur les trois lignées analysées et montrées dans la figure 3, pour chacun des mutants, deux plantes sont homozygotes pour la mutation car aucune amplification n'est observée pour les lignées 2 et 3 de chacun des mutants. Par contre les lignées 1 de chaque mutant sont hétérozygotes puisqu'une amplification est observée. Les amplifications effectuées avec une amorce spécifique de l'ADN-T (LBb1) d'une part, et des amorces des gènes *FtsZ21* (FtsZ21/D) et *FtsZ22* (FtsZ22/D) d'autre part, confirment l'intégration du vecteur dans les gènes en question. La taille du fragment de 1264 pb avec FtsZ21 confirme l'insertion dans l'intron 3. La taille des fragments, 675 pb pour le mutant *FtsZ22A* et 432 pb pour le mutant *FtsZ22B*, confirme l'insertion dans l'exon 3 pour le premier et dans l'exon 2 pour le second.

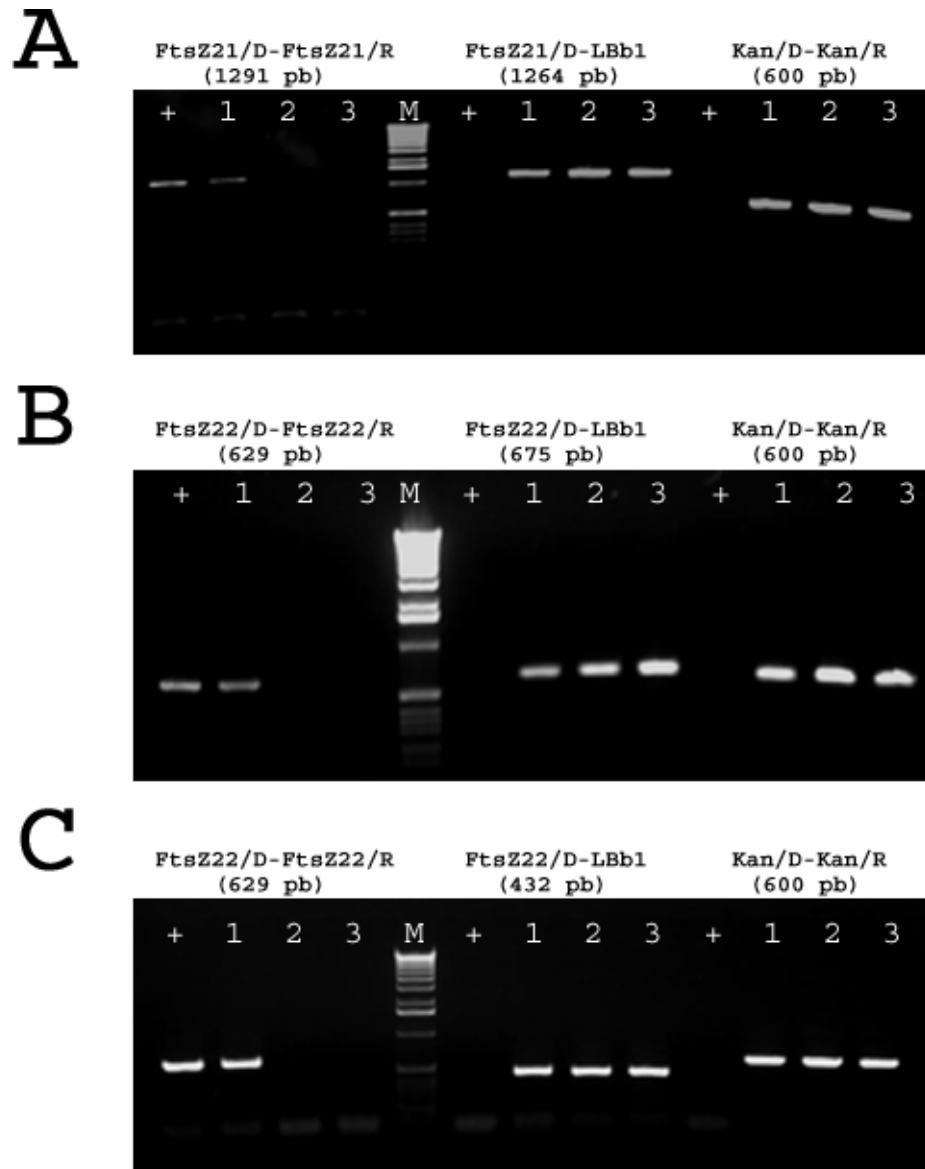


Figure 3. Génotypage des plantes résistantes à la kanamycine. Génotypage des plantes *FtsZ21* (A), *FtsZ22A* (B), et *FtsZ22B* (C). Test d'homozygotie en utilisant des amorces spécifiques du gène *FtsZ* concerné, suivi par la vérification de la bonne orientation de l'ADN-T avec une amorce interne de l'ADN-T et une amorce du gène étudié et enfin une vérification de la présence de l'ADN-T dans le gène *FtsZ* avec des amorces internes de l'ADN-T. (+) représente la lignée sauvage, (1) la lignée hétérozygote, (2 et 3) les lignées homozygotes. M : le marqueur de taille (1kb ladder).

1.2. Expression des protéines *FtsZ* chez les plantes mutantes *FtsZ21* et *FtsZ22*

L'absence d'expression des gènes *FtsZ21* et *FtsZ22* a été vérifiée par immunodétection avec les anticorps anti-*FtsZ2*, chez les plantes mutantes. Les bandes

détectées avec les extraits protéiques d'Arabidopsis, ont un poids moléculaire de 37 kiloDalton (kDa) pour l'anti-FtsZ1 et un doublet de 45-46 kDa avec l'anti-FtsZ2 (El-Shami et al. 2002). Cette étude a été faite sur les protéines totales de feuilles. Les résultats sont montrés sur la figure 4.



Figure 4. Expression des protéines FtsZ dans les plantes sauvages et mutantes.

Western blots avec les extraits protéiques totaux (30 µg) de plantes sauvages (WT) et de plantes mutantes homozygotes *FtsZ21*, *FtsZ22A*, *FtsZ22B* sondés avec les anticorps anti-FtsZ1 et anti-FtsZ2.

Comme attendu, une seule bande de 37 kDa pour FtsZ1 et un doublet de 45-46 kDa pour FtsZ2 sont détectés dans les plantes sauvages. Dans le mutant *ftsZ21*, le doublet a disparu et une seule bande de 45 kDa est détectée, indiquant qu'aucune protéine FtsZ21 n'est produite dans la plante mutante homozygote *FtsZ21* analysée. On constate par contre la présence d'une bande de 45 kDa qui correspond sans doute à la protéine FtsZ22 et une bande de 37 kDa montrant que l'expression de FtsZ1 dans ce contexte n'est pas perturbée. Chez les plantes homozygotes *FtsZ22A* et *FtsZ22B*, outre l'expression de FtsZ1, une forte expression avec la présence d'une forte bande à environ 45-46 kDa est observée et correspond sans doute à l'expression de la protéine FtsZ21. Les lignées mutantes *FtsZ22A* et *FtsZ22B* présentent le même profil. Nous utiliserons la lignée *FtsZ22B* pour les études ultérieures et l'obtention des doubles et du triple mutant et l'on parlera tout simplement de lignée *FtsZ22* dans la suite de ce rapport. La forte expression de FtsZ21 dans les mutants FtsZ22 semble indiquer que l'expression du gène FtsZ21 est augmentée en l'absence d'expression de FtsZ22. La figure 4 montre également la présence sans doute de deux polypeptides FtsZ21 dans les lignées *FtsZ22*.

La séparation des protéines sur un grand gel d'acrylamide a donc été réalisée afin de vérifier la présence éventuelle de plusieurs isoformes pour FtsZ2. Comme on peut l'observer sur la figure 5, si un seul polypeptide est détecté pour FtsZ1, plusieurs polypeptides sont détectés avec l'anticorps anti-FtsZ2 dans les plantes sauvages.

L'immunodétection réalisée sur les mutants indique que s'il existe une seule protéine pour FtsZ22 que l'on peut bien observer dans le mutant *FtsZ21*, au moins trois polypeptides FtsZ21 sont détectés dans le mutant *FtsZ22*. Nous ne savons pas pour le moment si ces isoformes de FtsZ21 sont induites par des modifications post-traductionnelles ou des dégradations spécifiques.

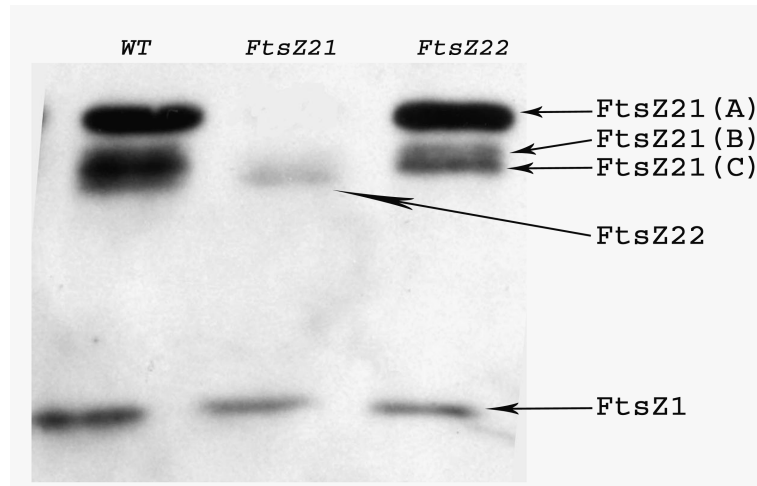


Figure 5. Détections de plusieurs isoformes FtsZ21 chez Arabidopsis. Western blots avec les extraits protéiques totaux (30 μ g) de plantes sauvages (WT) et de plantes mutantes homozygotes *FtsZ21* et *FtsZ22* sondés avec les anticorps anti-FtsZ1 et anti-FtsZ2.

1.3. Etudes morphologiques des plantes mutantes *FtsZ21* et *FtsZ22*

Les plantes sauvages et mutantes *FtsZ21* et *FtsZ22* ont été cultivées en terre dans des pots. Les plantes mutantes sont capables de se développer de manière autotrophe et de se propager normalement. Cependant elles ont un développement ralenti par rapport aux plantes sauvages. Les phénotypes des plantes sont montrés sur la figure 6. On observe que les plantes mutantes fleurissent moins vite que les sauvages avec un nombre de feuille de rosette plus élevé que le sauvage. En effet, le mutant *FtsZ21* fleurit à 25 jours avec 13 feuilles de rosette, le mutant *FtsZ22* à 26 jours avec 14 feuilles, tandis que l'apparition du bouton floral est à 20 jours pour le sauvage avec 11 feuilles de rosette. La hampe florale chez la plante mutante *FtsZ21* présente un diamètre plus réduit. Les lignées mutantes *FtsZ22A* et *FtsZ22B* ont le même phénotype (figure 6B).



Figure 6. Comparaison des différentes morphologies des mutants *FtsZ21* et *FtsZ22*.

(A) Les plantes sauvages (WT), et mutantes (*FtsZ21* et *FtsZ22*) sont montrées au stade 4 semaines (photo du haut) et au stade 5 semaines (photo du bas).

(B) Les plantes mutantes *FtsZ22A* et *FtsZ22B* ayant une insertion de l'ADN-T dans l'exon 3 et dans l'exon 2 respectivement, au stade 4 semaines (photo du haut) et au stade 6 semaines (photo du bas).

1.4. Observation par microscopie confocale des plantes *FtsZ21*

L'émission de fluorescence par la chlorophylle des chloroplastes, permet l'observation de ces derniers dans les cellules des organes verts de la plante par microscopie confocale. La chlorophylle émet un spectre situé entre 643 nm et 720 nm après une excitation à une longueur d'onde de 633 nm. Ainsi des observations sont effectuées sur des feuilles de rosette des mutants, afin de déterminer avec précision l'effet de la mutation sur la division des chloroplastes et leur arrangement à l'intérieur de la cellule. La figure 7 présente les résultats de cette observation au niveau des cellules de feuilles.

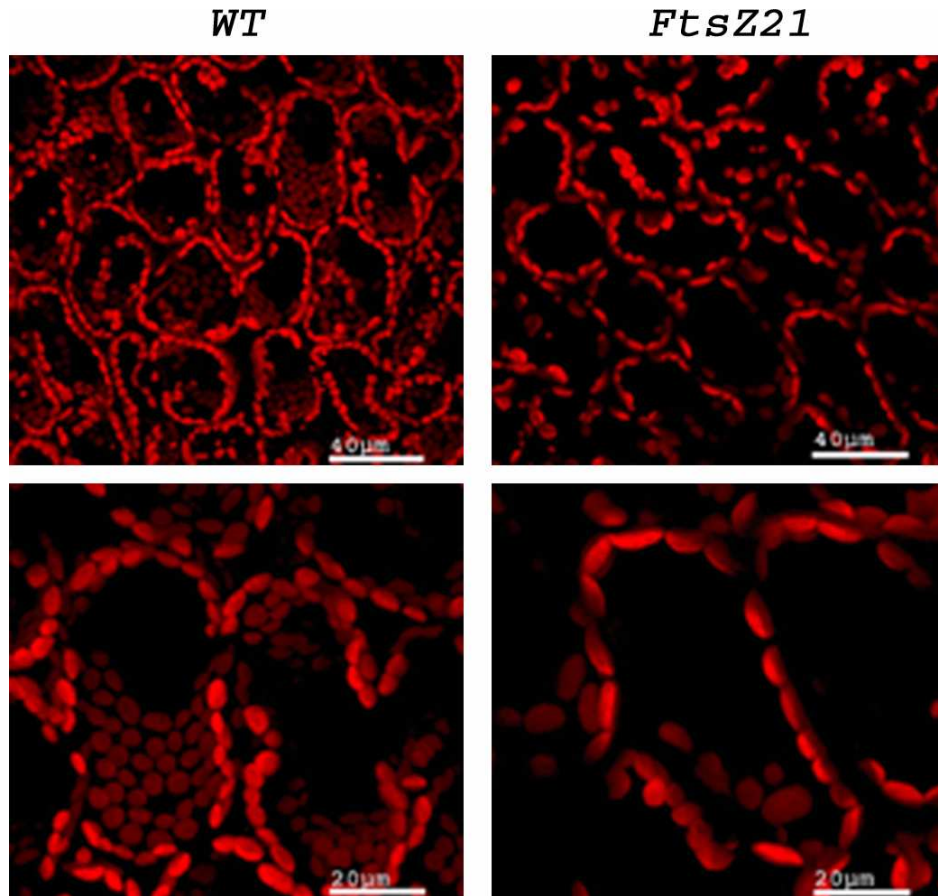


Figure 7. Phénotype des cellules et des chloroplastes des plantes d'Arabidopsis sauvages et mutantes. Observation en microscopie confocale de cellules du mésophylle chez les plantes sauvages (*WT*) et du mutant (*FtsZ21*).

L'absence de l'expression de la protéine FtsZ21 entraîne une inhibition partielle de la division des chloroplastes avec une réduction du nombre de chloroplaste par cellule et une augmentation de leur taille. Le phénotype observé est moins drastique que celui obtenu préalablement avec l'absence de l'expression de la protéine FtsZ1 (cf chapitre 1 de ce mémoire, El-Kafafi et al. 2008). On observe cependant un nombre réduit du nombre de rangées de chloroplastes à l'intérieur de la cellule. On constate également que les chloroplastes ont une forme plus aplatie suggérant une moindre résistance à la pression exercée par la vacuole.

1.5. Observation par microscopie confocale des plantes *FtsZ22*

Le phénotype observé en absence d'expression de FtsZ22 est également moins drastique que le phénotype du mutant *FtsZ1* (Figure 8).

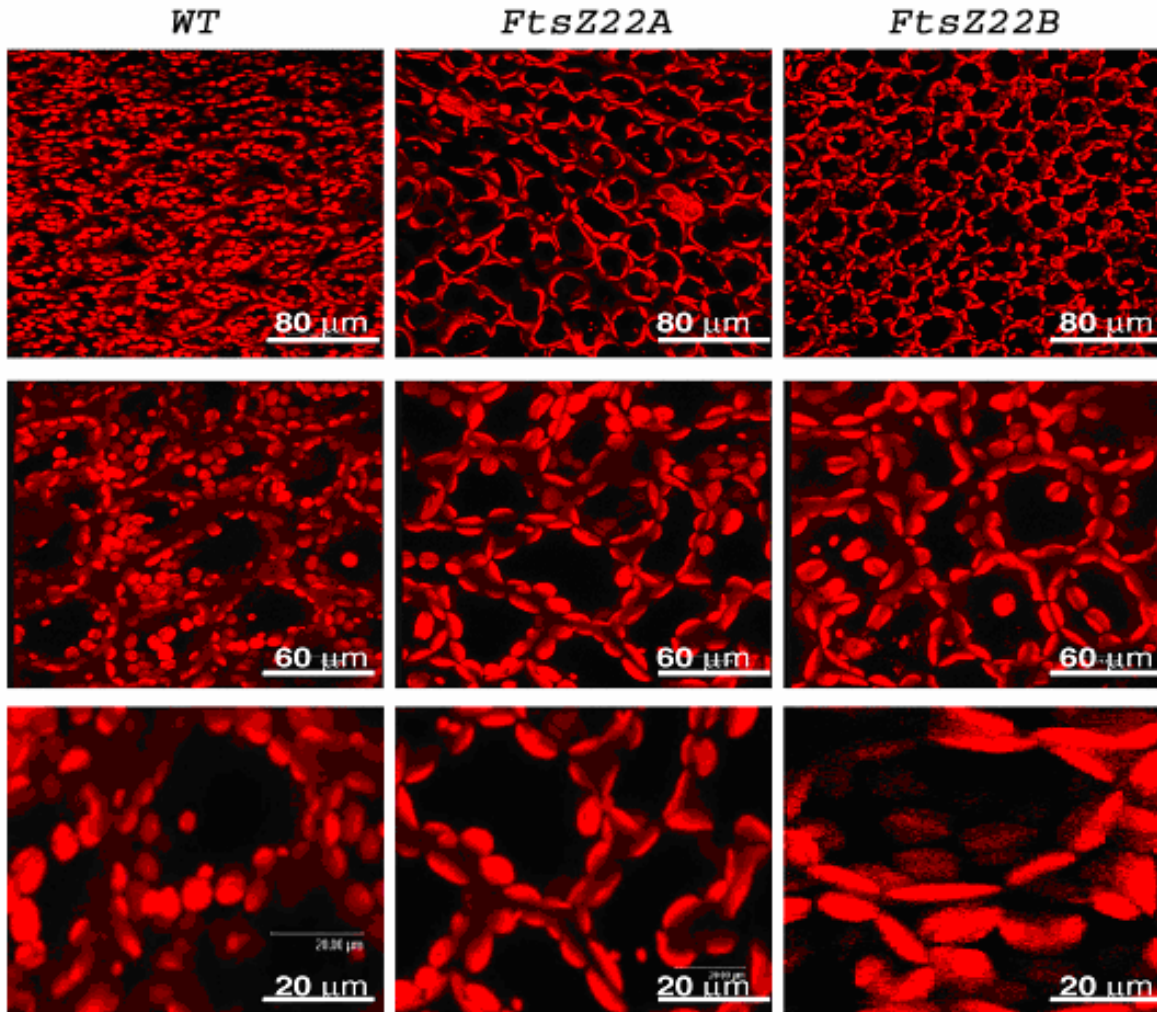


Figure 8. Observation par microscopie confocale du phénotype des chloroplastes des cellules du mésophylle des plantes d'Arabidopsis. Colonne de gauche : lignée sauvage : *WT* ; colonne du milieu : lignée mutante pour le gène *FtsZ22* portant une insertion de l'ADN-T dans l'exon 3 (mutant *FtsZ22A*) et colonne de droite : mutant *FtsZ22B* portant une insertion de l'ADN-T dans l'exon 2 du gène *FtsZ22*.

Comme précédemment avec le mutant *FtsZ21*, on observe la présence de moins de chloroplastes par cellules, mais avec une plus grande taille. Ces plastes en nombre réduit présentent une forme de « crêpe ». Ces données suggèrent aussi une résistance plus faible aux pressions exercées par la vacuole.

1.6. Complémentation des phénotypes mutants *FtsZ21* et *FtsZ22*

Nous avons utilisé la technique de transformation stable de végétaux par *Agrobacterium tumefaciens* pour insérer les gènes *FtsZ21* et *FtsZ22* sauvage dans le génome des plantes mutantes qui ne les expriment plus et également dans les plantes sauvages. Le but était de compléter ces lignées et d'obtenir des plantes qui surexpriment nos protéines. La complémentation permettra de confirmer que le phénotype observé résulte bien de l'absence d'expression du gène, surtout dans le cas du mutant *FtsZ21* pour lequel nous n'avons qu'une seule lignée mutante avec une insertion de l'ADN-T dans l'intron trois du gène.

Les ADNc *FtsZ21* et *FtsZ22* d'*Arabidopsis* ont été clonés dans le vecteur pFP101 2x35S:XbaI-BamHI-Sall:NosTer (cf. Matériels et Méthodes). Ce vecteur permet une sélection des plantes transformées grâce à l'expression de la GFP dans les graines. Les plantes ayant intégré au moins un ADN-T sont visualisées sous la loupe binoculaire avec le filtre GFP.

Nous avons étudié le niveau d'expression des protéines *FtsZ21* et *FtsZ22* sous le contrôle du promoteur 35S. Comme le montre la figure 9A, nous avons une expression, quantifiée par Western blot, de la protéine *FtsZ21* qui diffère selon les plantes transformées.

T21(1) et *T21(2)* sont des plantes mutantes *FtsZ21* transformées avec l'ADNc *FtsZ21*, tandis que *T21(3)* est une plante sauvage (Co) transformée par l'ADNc *FtsZ21*. Nous observons une expression des protéines *FtsZ21* dans *T21(1)* et *T21(2)*, avec une surexpression de la protéine pour le transformant *T21(1)*.

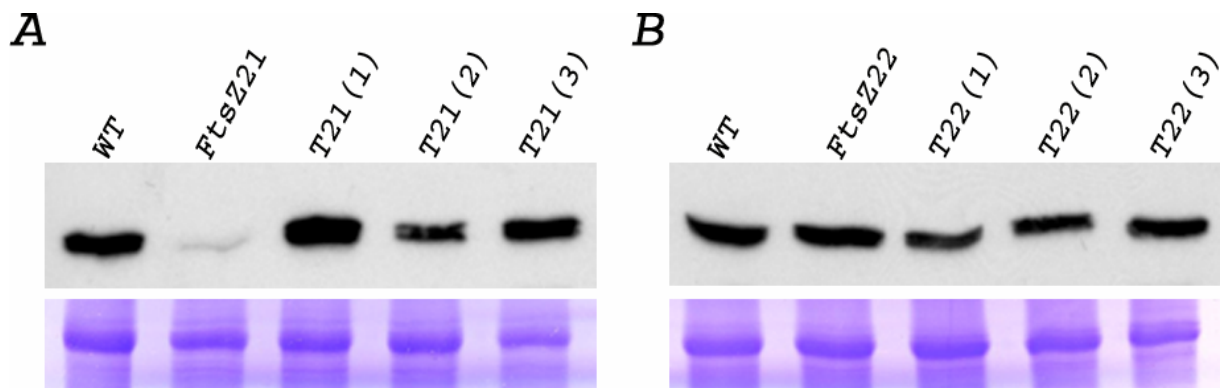


Figure 9. Vérifications par Western blots de la transformation des plantes mutantes et sauvages. Quantification de l'expression des protéines *FtsZ21* (A) et *FtsZ22* (B) par

western blots avec les protéines totales des plantes sauvages (WT) et mutantes *FtsZ21* et *FtsZ22*, ainsi que des différentes plantes mutantes et sauvages transformées (cf texte) sondées avec l'anticorps anti-FtsZ2. Un contrôle de charge est réalisé par coloration de la membrane au bleu de Coomassie.

La figure 9B montre les résultats obtenus pour la quantification de l'expression de FtsZ22. *T22(1)* et *T22(2)* sont également des mutants *FtsZ22* transformés avec l'ADNc *FtsZ22*, et *T22(3)* est un sauvage transformé par l'ADNc *FtsZ22*. Nous n'avons pas observé de surexpression de la protéine FtsZ22 par western blot. Cette protéine est généralement faiblement exprimée dans les cellules (comme observé dans la figure 5).

Une observation par microscopie confocale est réalisée sur les différentes plantes transformées. La figure 10 montre qu'une surexpression de FtsZ21 chez la plante *T21(1)* entraîne un phénotype se rapprochant à celui du mutant *FtsZ21*. Une augmentation du nombre de plastes est observée chez *T21(2)*, ces plastes ont des formes non aplaties ce qui indique que le mutant *FtsZ21* est partiellement complémenté. La faible expression de FtsZ21 dans un contexte sauvage chez *T21(3)* n'induit pas de modification au niveau cellulaire. Ces résultats confirment bien que le phénotype des plantes mutantes sur la division des chloroplastes est bien en relation avec l'intégration de l'ADN-T dans le gène *FtsZ21*.

Avec le mutant *FtsZ22*, on observe une complémentation partielle du phénotype pour les transformants *T22(1)* et *T22(2)*. Bien que le western de la figure 9B ne nous permette pas d'observer une surexpression de la protéine FtsZ22 chez le transformant *T22(3)*, une plante sauvage dans laquelle on exprime FtsZ22, on constate que cette plante a un phénotype présentant des plastes aplaties avec des tailles beaucoup plus grandes que ceux du sauvage. Les résultats obtenus avec *T22(3)* confirment des résultats déjà obtenus qui montrent qu'une modification de la stoechiométrie des protéines FtsZ affecte la division des chloroplastes (Osteryoung et al. 1998; El-Kafafi et al., 2005).

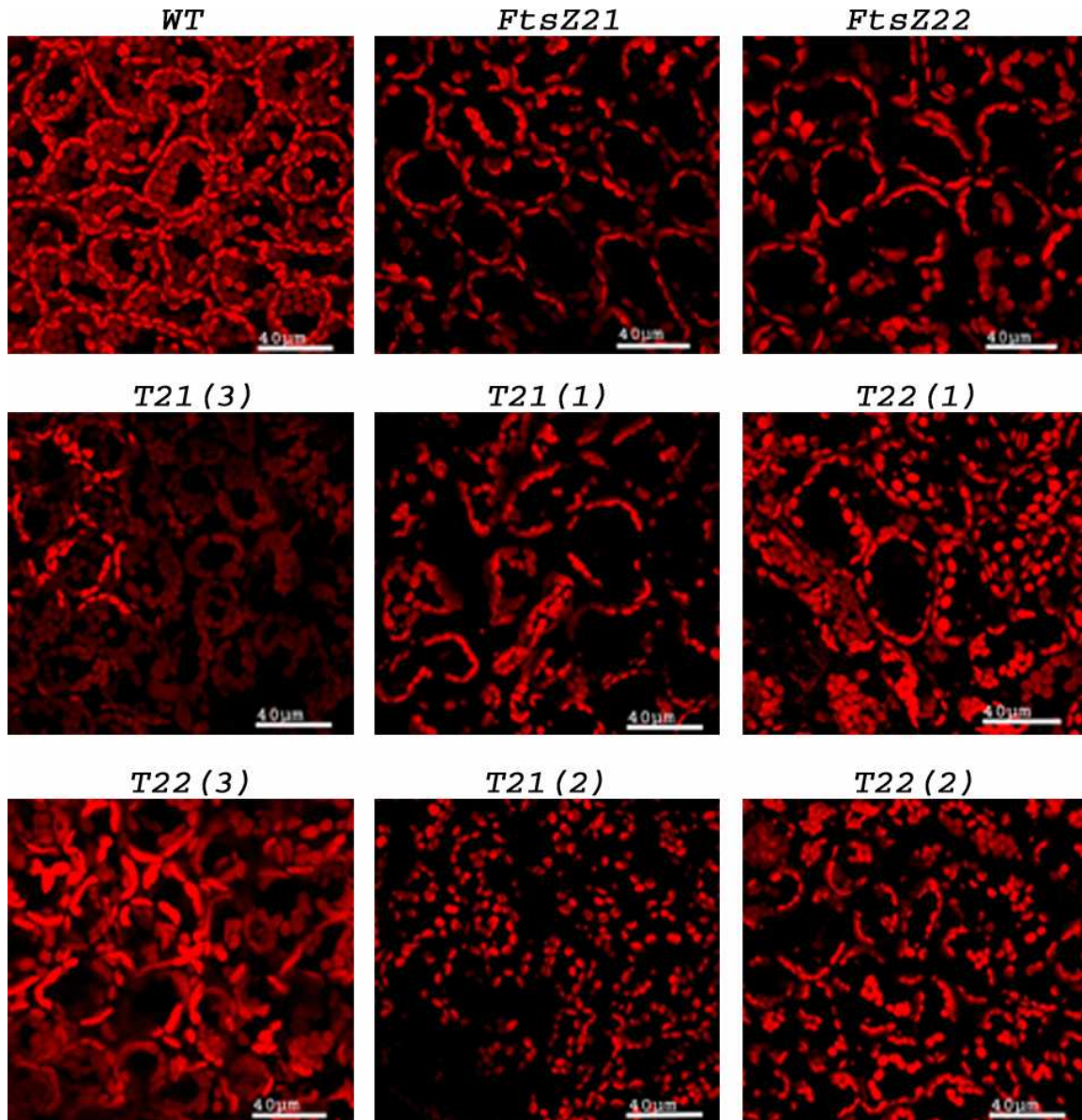


Figure 10. Observation du phénotype des plantes transformées avec les ADN_C FtsZ21 et FtsZ22. Colonne de gauche : plante sauvage : *WT*, plantes sauvages transformées par l'ADNc *FtsZ21* : *T21(3)*, et l'ADNc *FtsZ22* : *T22(3)*. Colonne du milieu : plante mutante *FtsZ21* et plantes mutantes transformées par l'ADNc *FtsZ21* avec différents niveaux d'expression de la protéine *FtsZ21* sous le contrôle du promoteur 35S : *T21(1)* et *T21(2)*. Colonne de droite : plante mutante *FtsZ22* et plantes mutantes transformées par l'ADNc *FtsZ22* avec différents niveaux d'expression de la protéine *FtsZ22* sous le contrôle du promoteur 35S : *T22(1)* et *T22(2)*.

1.7. Observation des ultrastructures des chloroplastes des plantes *FtsZ21* et *FtsZ22*

Les modifications observées au niveau cellulaire de la forme et du nombre de chloroplastes, pourraient avoir une incidence sur les structures internes des plastes. Le phénotype des chloroplastes des feuilles des plantes sauvages, des mutants *FtsZ21* et *FtsZ22* a été déterminé par microscopie électronique (collaboration avec Isabelle Paintrand, Cermav). La figure 11 présente les images de ces observations.

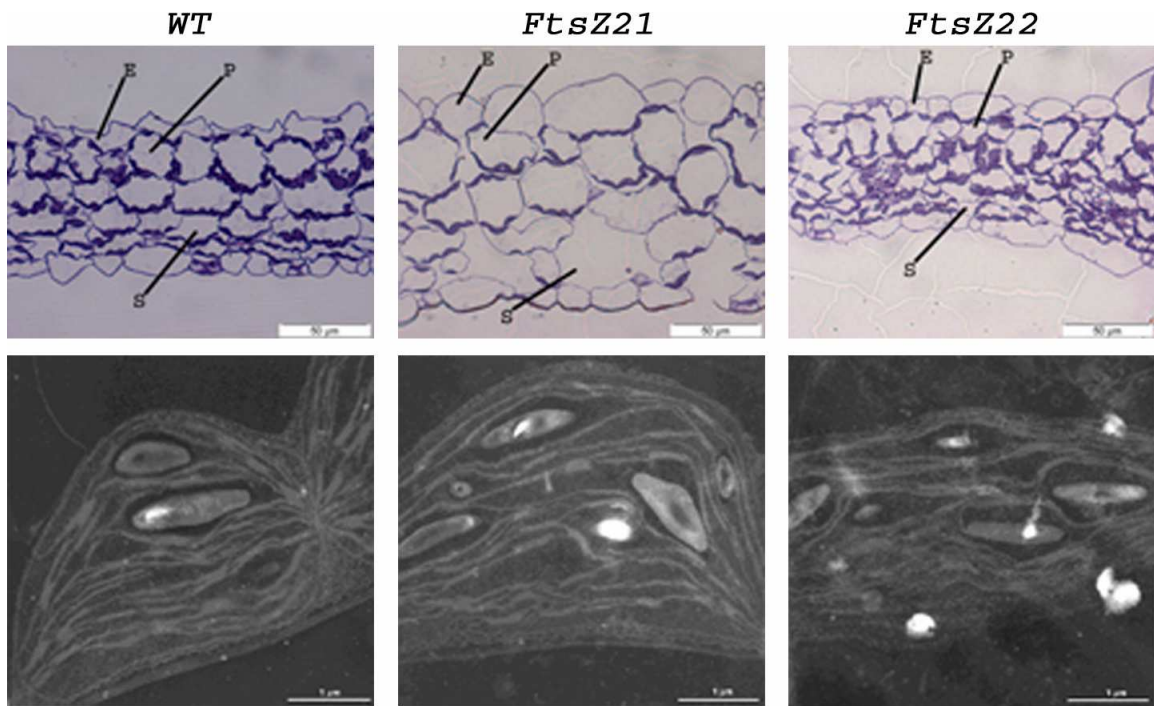


Figure 11. Observations des cellules et des chloroplastes de feuilles de rosette de plantes sauvages et mutantes. Les observations des plantes de 3 semaines sont faites sur des coupes semi-fines colorées (ligne du haut) et en microscopie électronique (ligne du bas). Les coupes semi-fines de 1 µm de section sont colorées au bleu de toluidine. E : cellules l'épiderme, P : parenchyme palissadique, S : parenchyme spongieux. La barre d'échelle correspond à 50 µm pour les coupes semi-fines et à 1 µm pour les observations en microscopie électronique.

Les observations histologiques préliminaires des coupes transversales des feuilles de rosette de 3 semaines du sauvage et des mutants *FtsZ21* et *FtsZ22*, montrent une organisation altérée des cellules avec la présence d'un nombre réduit de plaste de grande taille dans les cellules des mutants *FtsZ21* et *FtsZ22*. On observe également une

augmentation des espaces gazeux au niveau du parenchyme spongieux pour les deux mutants par rapport au sauvage. L'effet des mutations semble entraîner l'augmentation de la taille des cellules du mutant *FtsZ21* et la diminution de la taille des cellules du mutant *FtsZ22* par rapport au sauvage.

Les structures internes des chloroplastes chez le mutant *FtsZ21* sont peu perturbées par rapport à celles présentes dans les chloroplastes de plantes sauvages (figure 11). Les thylacoïdes du mutant *FtsZ22* présentent une organisation légèrement différente que celle du sauvage. Cette organisation pourrait résulter de l'aplatissement du chloroplaste qui résiste moins aux pressions exercées par la vacuole.

1.8. Caractérisation des doubles mutants et du triple mutant

1.8.1. Obtention des doubles mutants et du triple mutant

Des croisements entre les plantes mutantes *FtsZ21*, *FtsZ22* et *FtsZ1* ont été réalisés afin d'obtenir dans un premier temps les doubles mutants *FtsZ21 X FtsZ22*, *FtsZ1 X FtsZ21*, *FtsZ1 X FtsZ22* et ensuite le triple mutant *FtsZ1 X FtsZ21 X FtsZ22*.

Le génotypage des plantes obtenues après chaque croisement s'effectue par analyse PCR préalablement décrite pour chaque gène (figure 3A et 3C pour *FtsZ21* et *FtsZ22* ; chapitre I pour *FtsZ1*). Cette PCR confirme que l'ADN-T est bien présent simultanément dans les gènes *FtsZ21*, *FtsZ22*, *FtsZ1*.

Pour l'obtention des doubles mutants, l'analyse de la ségrégation des plantes F2 après autofécondation a donné en moyenne 5 plantes homozygotes pour une descendance de 80 plantes soit un rapport 1/16 caractéristique de la présence de deux inserts de l'ADN-T dans deux loci indépendants. Le triple mutant a été obtenu en croisant deux doubles mutants, *FtsZ1 X FtsZ21* et *FtsZ1 X FtsZ22*. La F1 était donc homozygote pour le gène *FtsZ1* et hétérozygote pour les deux autres gènes. Le criblage de la descendance de la F2 a concerné deux gènes *FtsZ21* et *FtsZ22*. La ségrégation des plantes F2 après autofécondation était caractéristique d'une hérédité de deux allèles indépendants avec 1/16 de plantes homozygote c'est-à-dire 5 plantes sur 80.

1.8.2. Expression des protéines dans les doubles mutants et le triple mutant

L'expression des protéines *FtsZ21*, *FtsZ22*, et *FtsZ1* a été testée par western blot pour les plantes doubles mutants et le triple mutant. La figure 12 présente les résultats de l'immunodétection sur les protéines totales extraites des feuilles des différents mutants.

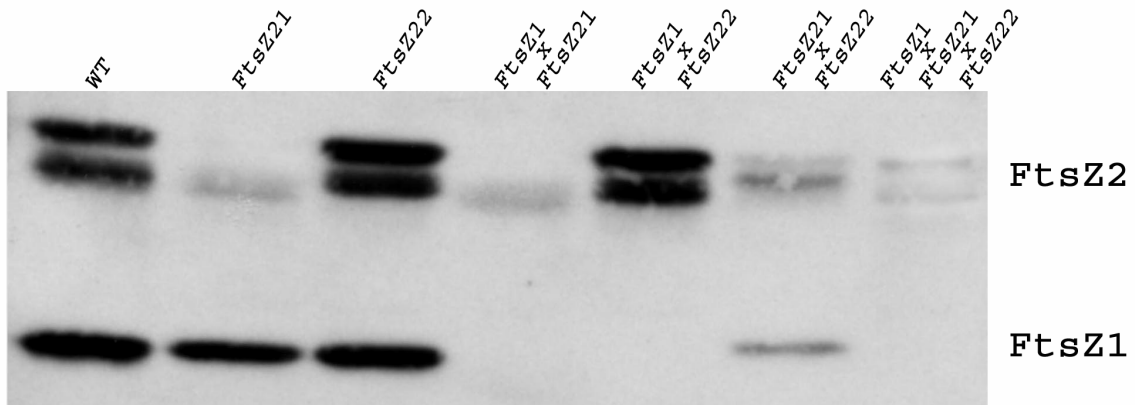


Figure 12. Immunodétection des protéines FtsZ1 et FtsZ2 dans les doubles mutants et le triple mutant (30 µg de protéine totale pour chaque puits)

Nous constatons que les doubles mutants *FtsZ1 X FtsZ21*, *FtsZ1 X FtsZ22*, tout comme le triple mutant *FtsZ1 X FtsZ21 X FtsZ22* n'expriment pas la protéine FtsZ1. En ce qui concerne les polypeptides FtsZ2, les doubles mutants *FtsZ1 X FtsZ21* et *FtsZ1 X FtsZ22* ont respectivement le même profil que les simples mutants *FtsZ21* et *FtsZ22*. La présence de faibles bandes FtsZ2 dans le double mutant *FtsZ21 X FtsZ22* et le triple mutant *FtsZ1 X FtsZ21 X FtsZ22* indique qu'il y a sans doute une légère fuite de l'expression du gène *FtsZ21*.

1.8.3. Morphologie des doubles mutants et du triple mutant

Les phénotypes de croissance des doubles mutants et du triple mutant sont montrés sur la figure 13. L'étude de la morphologie des mutants révèle une différence au niveau du nombre et de la taille des feuilles de rosette. La plupart des lignées mutantes présentent un retard de développement par rapport au sauvage Columbia. Seul le triple mutant tout comme le mutant *FtsZ1* ont une floraison précoce, mais ils se font très vite rattraper et dépasser par le sauvage.

Les données concernant le nombre de jours nécessaires pour l'apparition du bouton floral et le nombre de feuilles de rosette sont récapitulées dans le tableau II.

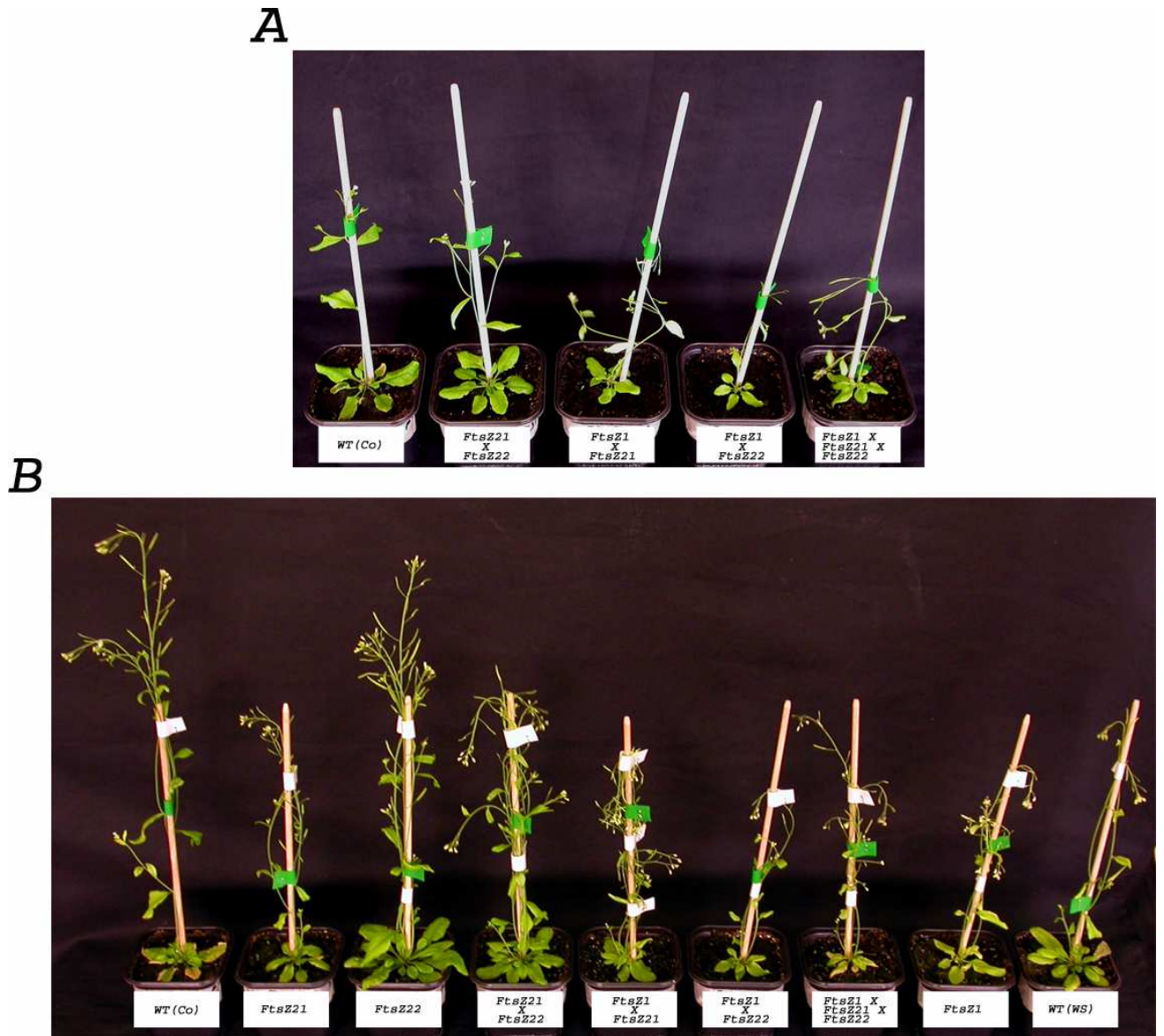


Figure 13. Morphologie des doubles mutants et du triple mutant à 4 semaines (A) et de tous les mutants d'insertion des gènes *FtsZ* d'*Arabidopsis* à 6 semaines (B).

Tableau II. Nombre de jours nécessaires à l'apparition du bouton floral et nombre de feuilles de rosette des lignées d'*Arabidopsis* étudiées. Etude réalisée sur 10 plantes d'une même lignée. Co : Columbia ; Ws : Wassilewskija.

| Lignées | Jours d'apparition du bouton floral | Nombre de feuilles de rosette |
|--------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|
| WT(Co) | 20 | 11 |
| <i>FtsZ21</i> (Co) | 25 | 13 |
| <i>FtsZ22</i> (Co) | 26 | 14 |
| <i>FtsZ21 X FtsZ22</i> | 24 | 12 |
| <i>FtsZ1 X FtsZ21</i> | 21 | 10 |
| <i>FtsZ1 X FtsZ22</i> | 24 | 11 |
| <i>FtsZ1 X FtsZ21 X FtsZ22</i> | 18 | 8 |
| <i>FtsZ1</i> (Ws) | 18 | 8 |
| WT(Ws) | 26 | 14 |

1.8.4. Observation phénotypique des chloroplastes des doubles mutants et du triple mutant par microscopie confocale

Des observations ont été effectuées par microscopie confocale sur les cellules de mésophylle des doubles mutants et du triple mutant. La figure 14 montre les résultats obtenus.

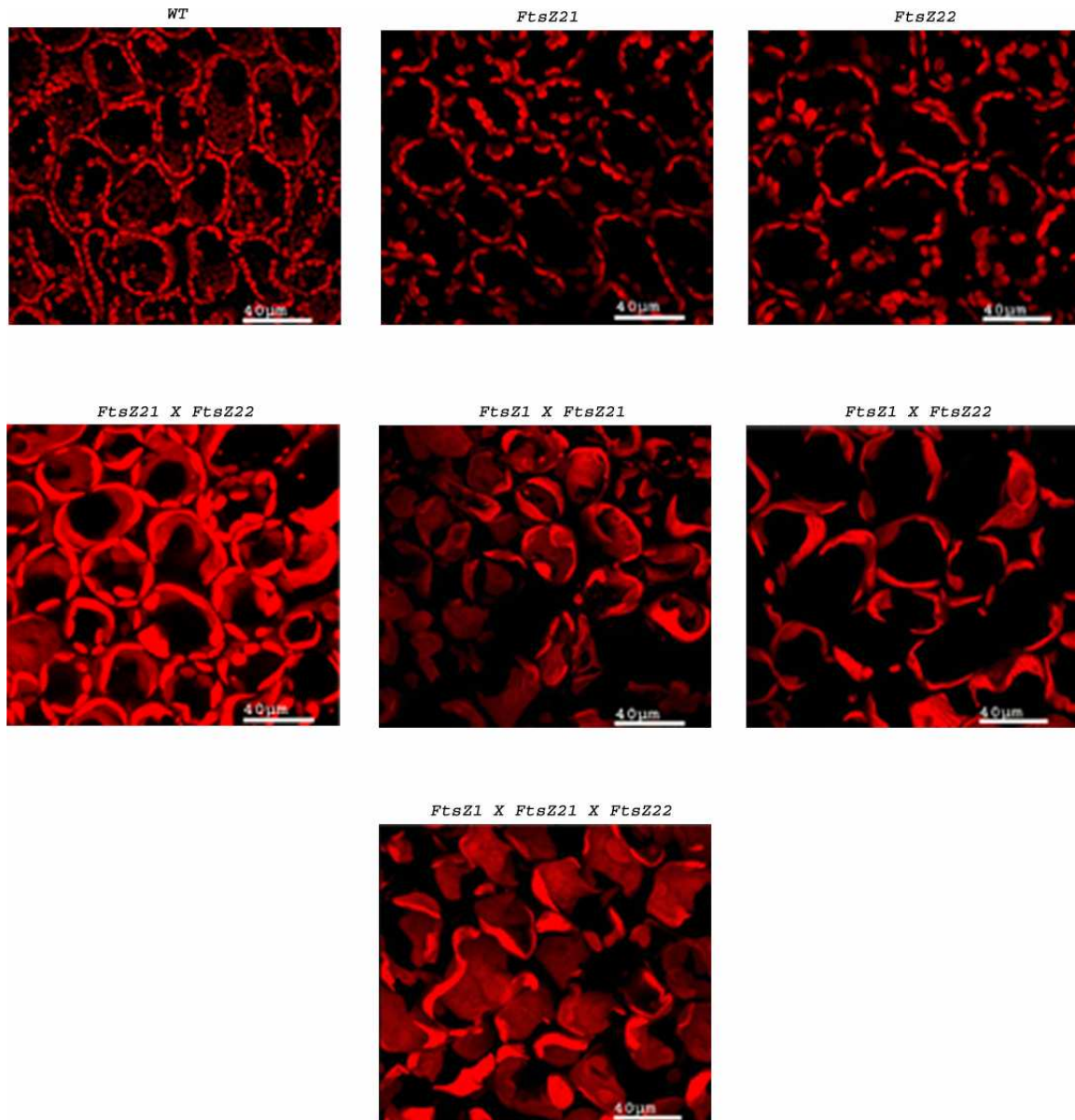


Figure 14. Observation en microscopie des phénotypes associés à l'effet additif des mutations *FtsZ21*, *FtsZ22* et *FtsZ1* par l'étude des doubles mutants et du triple mutant.

Nous observons un effet drastique par rapport aux simples mutants. L'inhibition de la division des plastes entraîne la présence d'un seul gros chloroplaste par cellule chez les

doubles mutants et le triple mutant . Ces chloroplastes présentent des formes pas très bien définies, sans doute du fait d'une faible résistance aux forces exercées par la vacuole. La sévérité des phénotypes indique clairement la présence d'un effet additif lorsque plusieurs gènes *FtsZ* sont mutés.

1.8.5. Observation des ultrastructures par microscopie électronique des chloroplastes des doubles mutants et du triple mutant

L'ultrastructure des chloroplastes des feuilles de rosettes de 3 semaines des plantes doubles mutantes et du triple mutant a été observée par microscopie électronique. Une observation préliminaire des coupes sémi-fines a été effectuée (Figure 15).

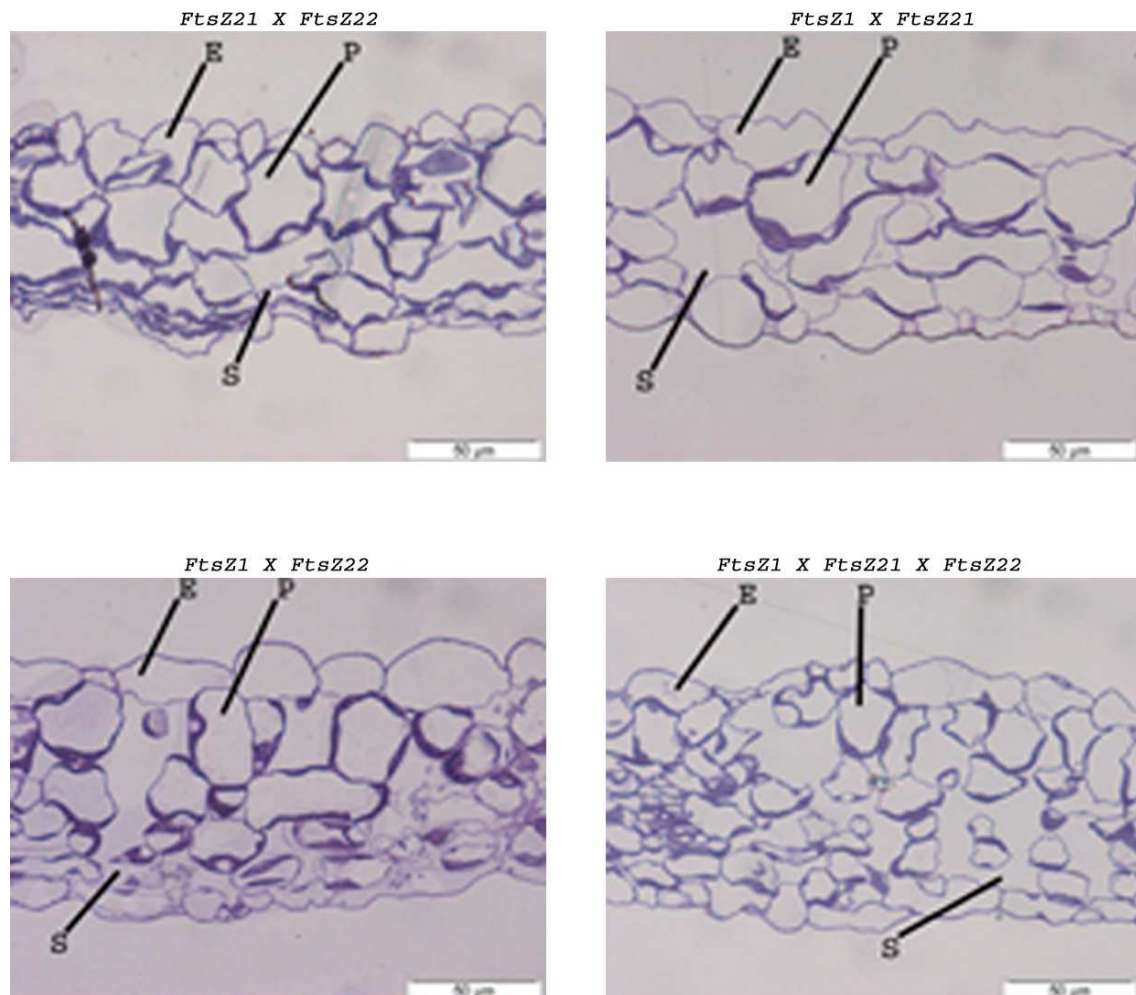


Figure 15. Observations des cellules et des chloroplastes de feuilles de rosette de plantes mutantes. Les observations des plantes de 3 semaines sont faites sur des coupes semi-fines colorées. Les coupes semi-fines de 1 µm de section sont colorées au bleu de toluidine. E : cellules de l'épiderme, P : parenchyme palissadique, S : parenchyme spongieux. La barre d'échelle correspond à 50 µm.

Les cellules des doubles mutants *FtsZ21 X FtsZ22*, *FtsZ1 X FtsZ21*, *FtsZ1 X FtsZ22* et du triple mutant *FtsZ1 X FtsZ21 X FtsZ22* montrent une organisation beaucoup plus altérée que celle des simples mutants *FtsZ21* et *FtsZ22* avec la présence d'un seul chloroplaste de grande taille aplati contre la membrane plasmique et qui présente parfois des zones de décollement à cette membrane. Ces mutants ont une augmentation importante des espaces gazeux au niveau du parenchyme spongieux, avec une accentuation de ce phénotype pour le triple mutant. L'organisation des thylacoïdes de ces chloroplastes a été observée par microscopie électronique (figure 16).

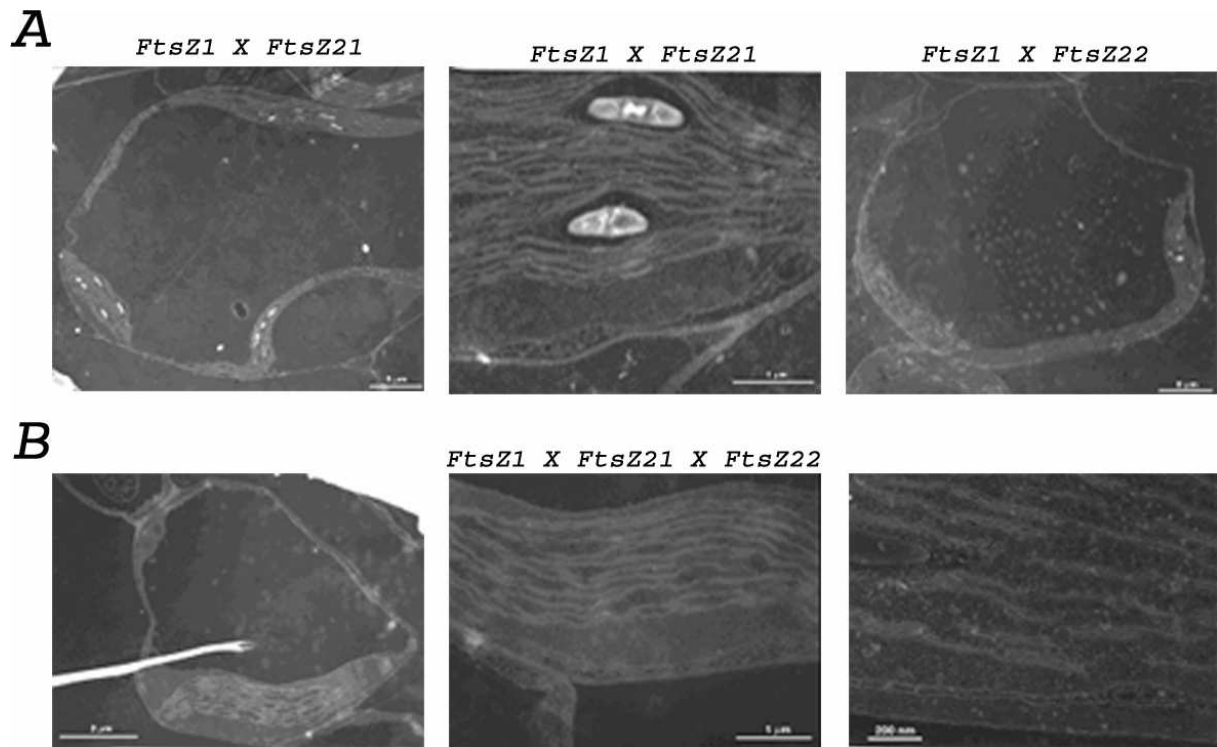


Figure 16. Observation en microscopie électronique des plastides des doubles mutants et du triple mutant. (A) Les plastides des plantes *FtsZ1 X FtsZ21* sont observés à deux grossissements différents (échelles de 5µm et 1µm), et ceux du double mutant *FtsZ1 X FtsZ22* à 5µm. (B) Le triple mutant *FtsZ1 X FtsZ21 X FtsZ22* est observé à trois grossissements différents (échelles de 2 µm, 1 µm et 200 nm).

Des observations par microscopie électronique de tous nos mutants sont en cours. Pour le moment nous ne disposons que de quelques images récentes qui nous permettent d'observer l'ultrastructure de plastides du double mutant *FtsZ1 X FtsZ21* et du triple mutant *FtsZ1 X FtsZ21 X FtsZ22* (Figure 16).

Bien que le réseau membranaire interne soit constitué de thylacoïdes simples et empilés en grana, des différences apparaissent avec les chloroplastes sauvages. En particulier chez le triple mutant, on observe des thylacoïdes qui ne forment pas un réseau continu avec une alternance régulière de grana et de thylacoïdes intergranaires. Les zones d'empilement sont composées au maximum de 3 thylacoïdes, donnant l'impression d'une organisation ondulée des thylacoïdes dans le chloroplaste.

2. Localisation des protéines FtsZ2 chez *Arabidopsis*

2.1. La protéine FtsZ2 est associée aux thylacoïdes en plus d'être présente dans le stroma

Nous avons déjà montré que FtsZ1 était associé aux thylacoïdes chez *Arabidopsis* et cette localisation variait en fonction du stade de développement (El-Kafafi et al. 2008). Les mêmes expériences ont été réalisées afin de localiser la protéine FtsZ2 à l'intérieur du plaste et de donner une fonction possible à cette protéine

Nous avons purifié les chloroplastes de plantes sauvages d'*Arabidopsis*. Les chloroplastes préalablement éclatés sont fractionnés sur gradient de saccharose (Block et al. 2002). Après fractionnement, nous avons séparé le stroma, les thylacoïdes et les enveloppes de ces chloroplastes. Ces différentes fractions chloroplastiques ont été testées par immunodétection avec successivement les anticorps anti-FtsZ2 et anti-FtsZ1. Les anticorps KARI (ketol-acid reducto-isomerase) une protéine spécifique du stroma impliquée dans la voie de biosynthèse des acides aminés, PsbB (CP47) une sous-unité spécifique du photosystème II intégré dans le thylacoïde, IEP37 une protéine spécifique de la membrane interne de l'enveloppe du plaste de 37 kDa, et OEP21 une protéine spécifique de la membrane externe de l'enveloppe du plaste de 21 kDa. La figure 17 montre les résultats obtenus.

Les expériences d'immunodétection avec l'anticorps KARI montrent que les thylacoïdes et les enveloppes ne sont pas contaminées par le stroma. PsbB ne présente aucun signal avec les enveloppes et le stroma, preuve que ces fractions plastidiales ne sont pas contaminées par les thylacoïdes. De même IEP37 et OEP21 montrent l'absence de contamination des thylacoïdes par l'enveloppe. Ces contrôles montrent la bonne qualité des fractions subplastidiales obtenues.

La protéine FtsZ2, tout comme FtsZ1, se trouve à la fois dans le stroma et les thylacoïdes. Nous ne trouvons pas FtsZ2 associée aux enveloppes d'*Arabidopsis*

contrairement aux résultats précédents (El Kafafi et al. 2005) obtenus avec des fractions d'épinard. Inversement dans l'épinard, les protéines FtsZ n'avaient pas été localisées avec les thylacoïdes.

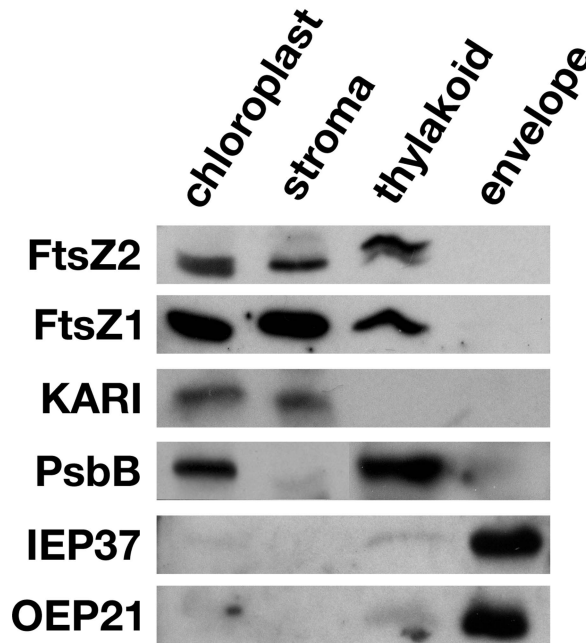


Figure 17. Localisation des protéines FtsZ2 dans les chloroplastes de plantules d'Arabidopsis. Western blots avec les protéines (30 µg) de chloroplastes, stroma, thylacoïdes et enveloppes sondées avec les anticorps anti-FtsZ2, anti-FtsZ1, KARI (marqueur du stroma), PsbB (marqueur des thylacoïdes), IEP37 et OEP21 marqueurs de la membrane interne et externe, respectivement.

2.2. Topologie et régulation de l'association de FtsZ2 aux thylacoïdes en fonction du stade de développement de la plante

Afin de déterminer si FtsZ2 est également associée au thylacoïdes en fonction du stade de développement, des protéines de fractions subplastidiales ont été obtenues à partir de plantes âgées de 23, 35 et 43 jours. Une analyse par western blot des différentes fractions plastidiales en fonctions du stade développement à été effectué. (Figure 18A).

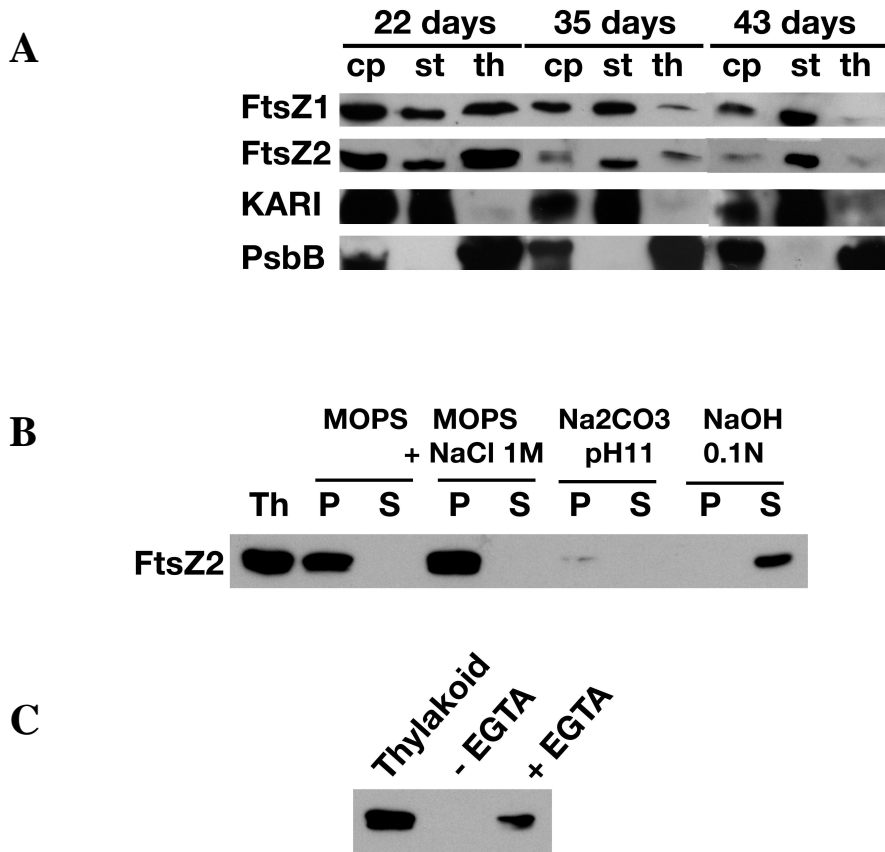


Figure 18. Localisation des protéines FtsZ2 en fonction du stade de développement des plantes d'Arabidopsis. (A) Immunodétection des fractions protéiques (30 µg par puits) de chloroplastes, stroma et thylacoïdes de plantes âgées respectivement de 22, 35 et 43 jours avec les anticorps FtsZ1, FtsZ2, KARI et PsbB. (B) Les thylacoïdes purifiés (30µg de protéines) ont été incubés pendant 30 min dans les solutions indiquées, les culots (P) et les surnageants (S) ont été analysés par western blot avec l'anticorps anti-FtsZ2. (C) Les fractions thylacoïdiennes ont été incubées avec la thermolysine (100 µg/ml) en absence d'EGTA (- EGTA) et en présence d'EGTA (+ EGTA). Le contrôle (protéines thylacoïdiennes non traitées à la thermolysine) et les protéines des thylacoïdes traitées sont analysées par immunoblot avec l'anticorps anti-FtsZ2.

FtsZ2, tout comme FtsZ1, présente un fort signal dans les thylacoïdes et le stroma pour les plantes de 22 jours. Après un développement de 35 jours, un faible signal est observé dans les thylacoïdes, par contre on observe un fort signal dans la fraction du stroma. A 43 jours, les protéines FtsZ2 ne sont plus associées aux thylacoïdes, mais sont fortement présentes dans le stroma. Cette corrélation entre le stade de développement et

la quantité de protéines FtsZ2 dans les thylacoïdes indique que FtsZ2, tout comme FtsZ1, présente une localisation régulée au cours du développement dans le chloroplaste.

Pour déterminer le type d'association de FtsZ2 avec les thylacoïdes, différents traitements ont été effectués en lavant les thylacoïdes purifiés avec 1 M NaCl, 0,1 M Na₂CO₃ pH11 et 0,1 M NaOH, respectivement. Une analyse d'immunodétection avec l'anticorps anti-FtsZ2 a été réalisée sur les protéines extraites des culots et des surnageants, après les différents traitements (Figure 18B). FtsZ2 n'est décrochée des thylacoïdes que par les traitements alcalins (0,1 M Na₂CO₃ pH11 et 0,1 M NaOH), ce qui indique une localisation périphérique avec la membrane par des interactions lipidiques.

Afin de déterminer la topologie de cette association, un traitement à la thermolysine a été réalisé avec les thylacoïdes isolés (Figure 18C).

Dans nos conditions expérimentales, la thermolysine ne peut dégrader que les protéines des thylacoïdes situées sur la face en contact avec le stroma, les protéines situées dans le lumen des thylacoïdes ne sont pas accessibles par la protéase. L'EGTA est un chélateur du magnésium, ce dernier est nécessaire à l'activité enzymatique de la protéase. FtsZ2 est accessible à la thermolysine en absence d'EGTA, alors que l'addition d'EGTA inhibe la réaction de clivage. Ces résultats suggèrent que FtsZ2 est localisée sur la face du thylacoïde en contact avec le stroma.

2.3. Localisation des isoformes FtsZ2 dans les thylacoïdes d'Arabidopsis

Les analyses d'immunodétection précédentes avec les fractions subplastidiales (stroma, thylacoïdes) ont permis de montrer la présence d'une seule forme de protéine FtsZ2 dans le stroma et d'un doublet dans les thylacoïdes (figure 17 et 18). Ces résultats suggèrent une différence de localisation des isoformes de la protéine FtsZ2 (FtsZ21 et FtsZ22) dans le plaste. Pour identifier les formes présentes dans le stroma et les thylacoïdes une analyse par western blot a été effectuée dans des conditions de migrations permettant une meilleure séparation des bandes (Figure 19).

Les résultats d'immunodétection montrent que seule la forme de la protéine FtsZ21 de masse supérieure (FtsZ21 (A) voir figure 5), est majoritairement présente dans les thylacoïdes.

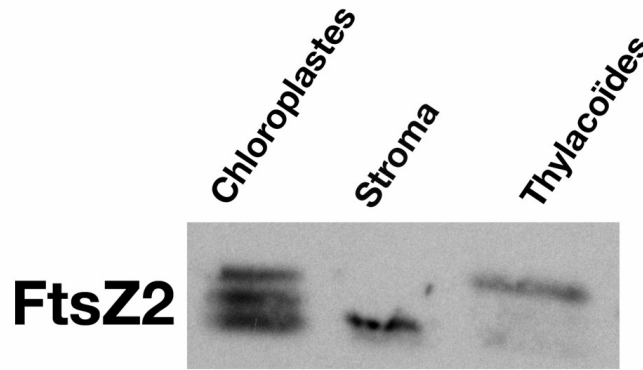


Figure 19. Localisation des protéines FtsZ2 dans le stroma et les thylacoïdes. Western blots avec les protéines (30 µg) des fractions indiquées sondées avec les anticorps anti-FtsZ2.

Nous constatons également qu'il n'y a qu'une seule forme majoritaire de protéine FtsZ2 dans le stroma (une légère bande semble aussi être détectée). Le fractionnement des chloroplastes des mutants *FtsZ21* et *FtsZ22* devrait nous permettre d'identifier la ou les formes présentes dans le stroma.

3. Conclusion

L'identification et la caractérisation de mutants *nulls FtsZ21* et *FtsZ22* d'*Arabidopsis thaliana*, a montré un effet sur la division des plastes et une légère désorganisation des thylacoïdes pour chacune de ces plantes mutantes. Les phénotypes observés sont moins drastiques que ceux du mutant *FtsZ1* (cf. chapitre I et El-Kafafi et al. 2008). La complémentation par une faible expression de *FtsZ21* rétablit partiellement le phénotype sauvage, avec une diminution de la taille et une augmentation du nombre de plastes. Cette complémentation du phénotype est observée chez des plantes mutantes *FtsZ22* transformées et qui exprime à nouveau la protéine FtsZ22. Les plantes sauvages transformées par l'ADN_C *FtsZ22* présentent une altération des chloroplastes. Ce phénotype indique qu'une faible modification de l'expression de la protéine FtsZ22 dans les plantes sauvages induit un changement de phénotype important, indiquant qu'un changement dans la stoechiométrie des protéines FtsZ affecte la division des chloroplastes.

Nous avons montré pour la première fois que FtsZ2, tout comme FtsZ1 est associée aux thylacoïdes, et cette association est régulée au cours du développement. FtsZ2 est associée aux thylacoïdes des chloroplastes de jeunes feuilles et non aux thylacoïdes des

plastés de feuilles matures. Ce résultat pourrait indiquer également une fonction possible de FtsZ2 dans la mise en place et l'organisation des thylacoïdes au cours du développement des feuilles.

L'étude des mutants d'*Arabidopsis* nous a permis de montrer l'existence de trois formes de la protéine FtsZ21, Nous ne savons pas pour le moment si ces formes sont dues à des modifications post-traductionnelles ou à une dégradation spécifique. Il n'existe qu'une seule forme FtsZ22.

L'obtention des doubles mutants et des triples mutants a révélé des phénotypes plus drastiques que ceux des simples mutants avec la présence dans la plupart des cas d'un seul gros chloroplaste par cellule et des thylacoïdes présentant une désorganisation plus accentuée que les simples mutants. Ces résultats montrent un effet additif des mutations. Des analyses d'immunodétection sur ces mutants ont révélé une fuite de FtsZ21 dans le double mutant *FtsZ21 X FtsZ22* et le triple mutant *FtsZ1 X FtsZ21 X FtsZ22*. Cette fuite, difficilement identifiable chez le simple mutant *FtsZ21* et le double mutant *FtsZ1 X FtsZ21* suggère que l'absence de FtsZ22 favoriserait cette expression de FtsZ21 dans le double mutant *FtsZ21 X FtsZ22* et le triple mutant. Nous ne connaissons pas pour le moment l'origine de ce phénomène de compensation.

Nous montrons pour la première fois des localisations différentes des protéines FtsZ2. Nous avons pu montrer que la forme FtsZ21 de grande taille (46 kDa) se trouve majoritairement associée aux thylacoïdes, et que l'on ne retrouve qu'une seule forme de protéine FtsZ2 dans le stroma. Nous ne savons pas pour l'instant si c'est FtsZ21 ou FtsZ22 qui est présente dans le stroma. Nous avons trouvé que FtsZ2 n'était pas associée aux enveloppes d'*Arabidopsis*, contrairement aux résultats obtenus avec l'épinard (El-Kafafi et al. 2005). Cette différence dans l'association de FtsZ2 aux enveloppes n'est pas encore élucidée. Une possibilité est que la localisation de FtsZ2 varie en fonction des différents stades du cycle de division du chloroplaste (Osteryoung et al. 2007). Cette variation pourrait aussi être dépendante des conditions de culture (lumière, longueur du jour) mais également de la différence entre les plantes (El-Kafafi et al. 2008).

Afin d'élucider cette variation de l'association de FtsZ2 aux membranes de l'enveloppe, une collaboration est en cours avec Maryse Block (CEA-Grenoble) et Juliette Jouhet (Cambridge, GB). Des résultats obtenus avec des fractions plastidiales du pois ont confirmé la localisation de FtsZ2 mais pas de FtsZ1 aux enveloppes dans cette plante.

CHAPITRE III

**Les protéines FtsZ sont elles impliquées dans le
métabolisme de l'amidon ?**

CHAPITRE III

Les protéines FtsZ sont elles impliquées dans le métabolisme de l'amidon ?

1. Introduction

L'analyse de l'ultrastructure des chloroplastes du mutant *null FtsZ1* et du surexpressueur *35S::FtsZ1*, avait montré la présence de grain d'amidon de petite taille chez le mutant *FtsZ1* et l'absence de grain d'amidon visible sur les coupes réalisées avec le surexpressueur (El-Kafafi et al. 2008). La surexpression de FtsZ1 dans la pomme de terre avait déjà montré un effet sur la taille du grain d'amidon avec une augmentation significative de cette taille (de Pater et al., 2006). Ces observations pourraient indiquer une fonction possible de FtsZ1 dans le métabolisme du grain d'amidon. Une collaboration avec Christophe d'Hulst (Université de Lille) et Jean-Luc Putaux (Cermav, Grenoble) a été initiée pour aborder cette problématique.

2. L'amidon dans les mutants *FtsZ* d'*Arabidopsis*

Nous avons effectué une coloration au lugol des feuilles de rosette âgées de 3 semaines de plantes sauvages d'*Arabidopsis* ainsi que des mutants *FtsZ1* et du surexpressueur (Figure 1).

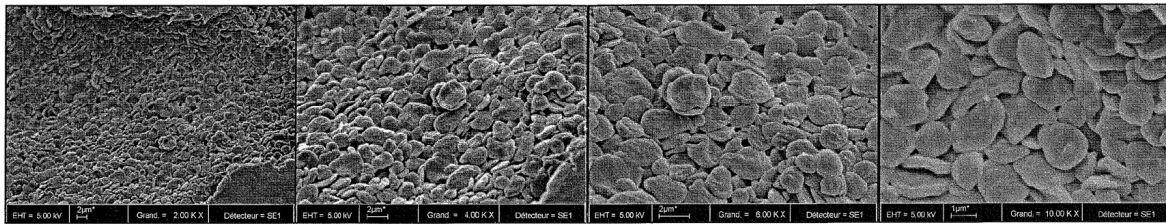


Figure 1. Coloration à l'iode des feuilles de rosette âgées de 3 semaines de plantes sauvages (*WT*), du mutant *null* (*FtsZ1*) et du surexpressueur (*35S::FtsZ1*)

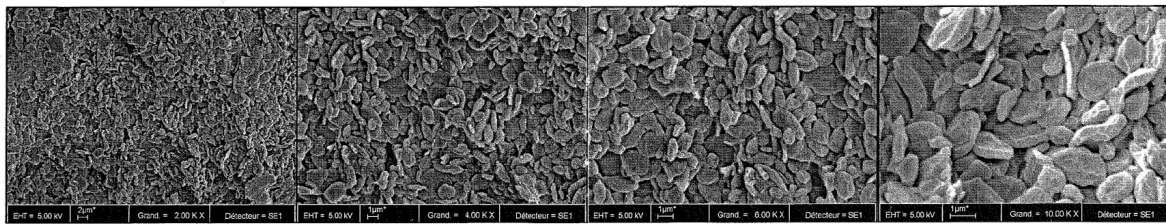
Le lugol (solution de I₂ + KI) colore l'amidon en brun; la coloration que l'on obtient varie avec l'agrégation de l'amidon.

La figure 1 montre que le mutant *null* tout comme le surexpresser sont bien capables de synthétiser le grain d'amidon, les feuilles de ces mutants sont d'ailleurs plus colorées que celles du sauvage. Des observations en microscopie électronique par balayage (MEB) des grains d'amidon, de ces plantes ont été réalisées par le groupe de Lille (Figure 2).

Sauvage : WT FtsZ → A1-AtWT-L071105



KO FtsZ → A2-AtKO-L071105



Mutant *surexpresser* : 35S FtsZ → A3-At35S-L071105

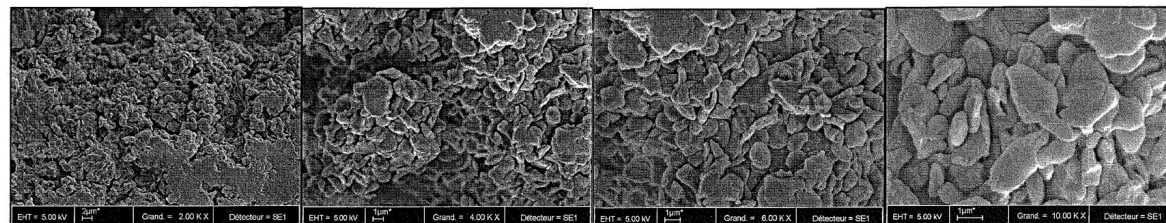


Figure 2. Observation en microscopie électronique à balayage des grains d'amidon de plantes sauvages (WT), du mutant *FtsZ1* (KO FtsZ), et du surexpresser 35S::*FtsZ1* (35S FtsZ) d'*Arabidopsis*

Nous observons que les grains d'amidon des plantes sauvages ont une forme bien définie avec des contours réguliers. Le mutant *FtsZ1* présente des grains d'amidon avec une forme aplatie et de taille hétérogène par rapport à ceux du sauvage. Le surexpresser 35S::*FtsZ1* a de gros grains d'amidon avec des formes amorphes. Ces résultats suggèrent que la protéine FtsZ1 pourrait avoir un lien direct avec la synthèse du grain d'amidon. La protéine FtsZ22 pourrait aussi avoir un effet sur cette synthèse car une augmentation de

150% de la quantité d'amidon est observée en fin de journée dans le mutant FtsZ22 (Christophe d'Hulst et Fabrice Wattebled, communication personnelle).

3. Expression des protéines FtsZ lors de la transition proplaste-amyloplaste dans les cellules BY-2 du tabac

3.1. Choix du matériel biologique

Afin de déterminer si la protéine FtsZ1 joue un rôle dans le métabolisme du grain d'amidon, nous avons décidé d'étudier l'expression des protéines FtsZ lors de la biogenèse des amyloplastes. Les amyloplastes sont des plastes non chlorophylliens qui contiennent les réserves d'amidon des plantes, on les retrouve dans les racines et les tissus de réserve tels que les cotylédons, l'endosperme et les tubercules.

Les cellules BY-2 du tabac sont utilisées comme matériel biologique pour cette étude. Ces cellules sont disponibles au laboratoire et ont été déjà utilisées lors de plusieurs études dont l'expression des gènes *FtsZ* au cours du cycle cellulaire (El-Shami et al., 2002). Les cellules BY-2 de tabac sont avantageuses pour plusieurs raisons. Il s'agit de cellules végétales qui ont une forte croissance, la population cellulaire est relativement homogène et sans agrégat. L'un des avantages de ces cellules est l'obtention de cultures synchronisées pour le cycle cellulaire par un traitement à l'aphidicoline. L'avantage essentiel pour nous est la possibilité d'induire la transition proplaste-amyloplaste par simple changement du milieu de culture de ces cellules. En effet, conventionnellement les cellules BY-2 sont cultivées en milieu liquide contenant de l'auxine (acide 2,4-dichlorophenoxyacétique), quand les cellules BY-2 en phase stationnaire sont transférées dans un milieu de culture sans auxine mais supplémenté avec la cytokinine (benzyladenine), la formation d'amyloplaste est induite et synchronisée pendant deux jours (Miyazawa et al., 1999).

3.2. La transition proplaste-amyloplaste

Les cellules BY-2 de tabac sont cultivées dans 80 ml de milieu de culture stérile Murashige et Skoog (KH_2PO_4 200 mg/L, Thiamine HCl 1 mg /L, Myoinositol 100 mg/L, Saccharose 30 g/L, pH 5,8) enrichit avec l'auxine (acide 2,4-dichlorophenoxyacétique 0,2 mg/L). La culture s'effectue à l'obscurité, à 27°C et sous une agitation de 130 rpm,

l'absence de couleur verte de ces cellules résulte de la présence de proplastes. Pour induire la formation d'amyloplastes, 4 ml de suspension de cellules en phase stationnaire sont transférés dans 80 ml d'un milieu supplémenté avec 1 mg/L de cytokinine. Des prélèvements journaliers sont effectués pendant 5 jours après changement de milieu pour analyses.

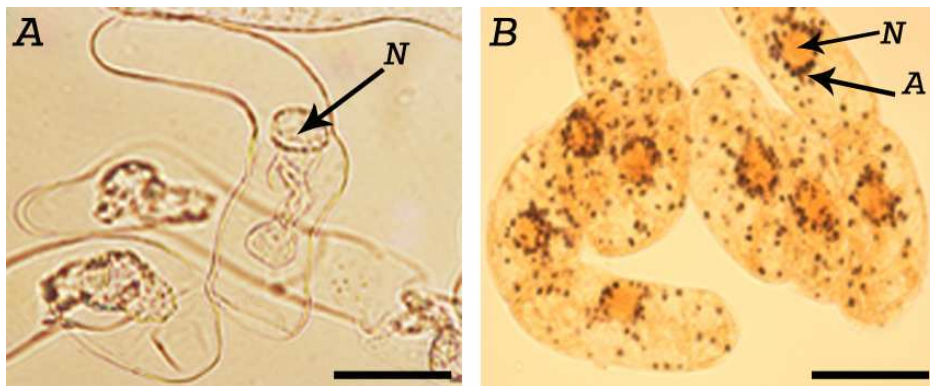


Figure 3. Photomicrographie des cellules BY-2 colorées au lugol après 6 jours de culture en milieu avec auxine (A), et 1 jour de culture dans le milieu avec cytokinine (B). N : Noyau, A : grain d'amidon. La barre d'échelle représente 50 µm.

Nous observons dans la figure 3, la présence de nombreux grains d'amidon, localisés essentiellement autour du noyau après coloration au lugol des cellules BY-2 cultivées pendant 24 heures dans un nouveau milieu avec cytokine par rapport aux cellules cultivées pendant 6 jours dans un milieu avec auxine.

Ces observations montrent bien que le transfert des cellules BY-2 dans un milieu de culture supplémenté de cytokinine permet d'induire la formation d'amyloplastes qui stockent des réserves d'amidon dans les cellules.

3.3. Expression des protéines FtsZ lors de la transition proplaste-amyloplaste

Nous avons extrait les protéines totales des cellules BY2 en phase stationnaire (6 jours) cultivées dans le milieu de culture avec auxine et les protéines aux cours des 5 jours après transfert dans le milieu avec cytokinine. Les extraits protéiques sont séparés par SDS-PAGE et transférés sur membrane pour des analyses d'immunodétection avec les anticorps anti-FtsZ1 et anti-FtsZ2 (figure 4).

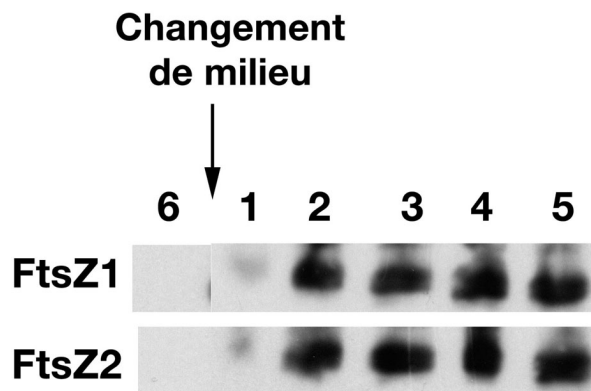


Figure 4. Expression de FtsZ1 et FtsZ2 au cours de la transition proplaste-amyloplaste. Western blots avec les protéines (30 µg) extraites par la méthode SDS de cellules BY-2 cultivées pendant 6 jours dans milieu avec auxine (6) et de cellules après changement de milieu pendant les 5 premiers jours (puits 1 à 5).

Il n'y a aucune expression des protéines FtsZ extraites par cette méthode dans les cellules BY-2 contenant des proplastes. L'induction de la transition proplaste-amyloplaste entraîne une légère expression des protéines FtsZ le premier jour, suivie d'une saturation de l'expression dès le deuxième jour de la synchronisation de la transition proplaste-amyloplaste. Pourquoi une telle augmentation de l'expression des protéines FtsZ ? Des études précédentes ont montré une accumulation des transcrits d'enzymes qui sont impliqués dans la synthèse du grain d'amidon, tel que l'ADP-glucose pyrophosphorylase, le GBSS (granule-bound synthase), le SBE (starch branching enzyme) après le transfert des cellules BY-2 dans un milieu de culture avec cytokinine (Miyazawa et al. 1999). Ces enzymes sont utilisés pour synthétiser l'amidon à partir de sucres importés tel que le glucose et le saccharose.

Cette forte expression des protéines FtsZ après l'induction de la formation d'amyloplastes pourrait indiquer une fonction possible des protéines FtsZ1 et FtsZ2 dans la synthèse du grain d'amidon.

4. Conclusion

L'étude des mutants knock-out *FtsZ1* et surexpressueur de *FtsZ1* d'*Arabidopsis* montrent des effets sur la forme et la structure du grain d'amidon indiquant une fonction possible de *FtsZ1* dans le métabolisme du grain d'amidon. Afin de déterminer le rôle des protéines *FtsZ* dans la synthèse du grain d'amidon, nous avons utilisé comme modèle d'études les cellules BY-2 de tabac. Les résultats préliminaires que nous avons obtenus sont encourageant car ils mettent en évidence une augmentation de l'expression des protéines *FtsZ* lors de la transition proplastés-amyloplastés.

Nous ne savons pas pour le moment si les protéines *FtsZ* jouent un rôle direct ou indirect dans la mise en place du grain d'amidon. Une implication de ces protéines dans un tel métabolisme représenterait une voie intéressante dans l'évolution des fonctions de ces protéines.

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

Il est maintenant bien admis que les plastes résultent d'une endosymbiose, impliquant un ancêtre des cyanobactéries actuelles et une cellule eucaryote contenant des mitochondries.

Du fait de cette double origine, procaryotique et eucaryotique, il n'est pas étonnant que les études sur la division des chloroplastes aient mis en évidence l'implication de protéines provenant à la fois du symbiote procaryotique et de l'hôte eucaryotique. Parmi les protéines d'origine procaryotique on trouve la protéine FtsZ, l'ancêtre de la tubuline, et pour les protéines d'origine eucaryotique, la dynamine.

Les deux protéines FtsZ et la dynamine, sont des GTPases capables de s'auto-assembler en filaments. Tout comme la protéine FtsZ bactérienne, la protéine FtsZ1 de plante polymérise *in vitro*, de façon GTP/GDP dépendante, pour former des protofilaments similaires aux microtubules (El-Kafafi et al. 2005). Ces résultats ont soulevé la question du rôle de ces protéines dynamiques dans la biogenèse des plastes

Afin de déterminer les fonctions respectives des trois protéines FtsZ, nous avons entrepris l'étude de tous les mutants *FtsZ* d'*Arabidopsis*.

Les trois protéines FtsZ présentes dans *Arabidopsis* interviennent dans la division des plastes. En effet nous avons observé chez tous les simples mutants un nombre réduit de plastes par rapport aux plantes sauvages, mais avec des plastes de plus grandes tailles. L'étude des doubles et du triple mutant montre un effet additif de l'absence des protéines sur la division des plastes. Un résultat intéressant de notre étude concerne par contre la mise en évidence de nouvelles fonctions associées à ces protéines.

Le phénotype associé à l'absence ou à la surexpression de la protéine FtsZ1, suggère l'implication de FtsZ1 dans la morphologie des thylacoïdes (El-Kafafi et al. 2008). Les protéines FtsZ2 présentent un profil de localisation similaire à celui de la protéine FtsZ1 avec une association aux thylacoïdes dans les stades jeunes de développement. On observe également une légère altération de l'organisation des thylacoïdes des mutants *FtsZ21* et *FtsZ22*, altération qui est amplifiée lorsque plusieurs gènes sont mutés.

Récemment le groupe de Katherine Osteryoung aux Etats-Unis a montré qu'une protéine de la famille des dynamines, FZL, était impliquée dans la morphologie des thylacoïdes (Gao et al. 2006). Ce résultat est intéressant puisqu'une dynamine a été aussi

impliquée dans la division des plastes. Comme pour la division, le couple FtsZ/dynamine pourrait participer à la mise en place des thylacoïdes.

La modification de la morphologie des thylacoïdes dans des mutants pour d'autres protéines impliquées dans la division des plastes a été rapportée (Ii et Webber 2005). Les mutants *arc5* et *arc6* contiennent des chloroplastes dans lesquels l'empilement des thylacoïdes en grana est plus important que celui observé dans les plantes sauvages. Le mutant *arc3* présente un phénotype similaire à celui des plantes surexprimant FtsZ1 avec la présence de thylacoïdes torsadés. Pour l'instant, aucune de ces protéines n'a été trouvée associée aux thylacoïdes. Par contre certaines de ces protéines interagissent avec les protéines FtsZ. ARC3 interagit avec FtsZ1 et ARC6 avec FtsZ2 (cf. tableau 4 dans Introduction) ce qui pourrait expliquer les phénotypes observés.

Outre son association aux thylacoïdes, FtsZ2 se trouve associée à l'enveloppe. Des protéines telles que VIPP1 (Kroll et al. 2001) et Thf1 (Wang et al. 2004) sont associées à la fois aux thylacoïdes et à la membrane interne et participent à la formation des vésicules qui génèrent les thylacoïdes. Les protéines FtsZ (en particulier FtsZ2) et dynamine (FZL) pourraient agir, soit dans la même voie que les protéines VIPP1 et Thf1, soit dans une voie nouvelle et indépendante. Cette nouvelle fonction est en accord avec les observations d'un lien entre le métabolisme des lipides chloroplastiques et le nombre de plaste (cf. introduction).

Les protéines FtsZ pourraient avoir d'autres fonctions comme celle d'être impliquées dans le métabolisme de l'amidon. Dans l'algue *Oestrococcus taurii*, l'unique grain d'amidon présent dans le chloroplaste se divise en même temps que l'unique plaste se divise au cours de la division cellulaire (Ral et al., 2004). Le grain d'amidon se partage en deux en même temps que la constriction se fait pour diviser le plaste, indiquant une coordination entre les deux mécanismes.

Nous avons plusieurs éléments en faveur d'un lien entre le métabolisme de l'amidon et les protéines FtsZ : (1) nous avons observé des différences de taille de grain d'amidon en fonction de l'expression des protéines FtsZ1 ; (2) les mutant FtsZ22 ont plus d'amidon en fin de journée que les plantes sauvages (communication personnelle, Christophe d'Hulst et Fabrice Wattebled, Lille) (3) Les études que nous avons menées avec les cellules BY-2, ont montré une augmentation de l'expression des protéines FtsZ lors de la transition proplaste-amyloplaste.

Plusieurs autres études ont montré que les protéines impliquées dans la division des plastes peuvent avoir d'autres fonctions qu'elles ont pu acquérir au cours de l'évolution.

Différentes isoformes de la protéine FtsZ1 ont été identifiées chez la mousse *Physcomitrella patens*, et l'une d'elles, FtsZ1-2, en plus d'être localisée dans le chloroplaste est aussi présente dans le cytoplasme, s'assemblant en anneaux dans les deux compartiments cellulaires. Ce résultat suggère que cette protéine peut effectuer en même temps la division des cellules et des organelles dans cet organisme (Kiessling et al. 2004). Récemment, la seconde isoforme FtsZ1-1 a été trouvée, lors d'une surexpression en fusion avec la GFP, dans une structure d'interconnection du chloroplaste, ce qui soulève la question de savoir si la protéine est une composante structurelle des stromules (Gremillon et al. 2007).

Il a été également suggéré que les isoformes de FtsZ2 pourraient être impliquées dans le maintien de l'intégrité du chloroplaste, avec une fonction de plastocytosquelette (Kiessling et al. 2000 ; Reski, 2002), comme cela a été suggéré récemment pour la protéine FtsZ de la cyanobactérie filamenteuse (Klint et al. 2007). Cette hypothèse est en accord avec le phénotype des plastes de nos mutants qui présentent des formes beaucoup plus plates que les chloroplastes du sauvage. L'absence de plastocytosquelette dans nos mutants pourrait être une explication de la moindre résistance à la pression exercée par la vacuole entraînant ces formes aplaties du plaste.

D'autres études permettant de caractériser de nouvelles protéines impliquées dans l'altération de la division des plastes, et les fonctions acquises par les protéines de division des plastes, permettront d'intégrer la division des plastes avec d'autres processus de développement des plantes.

L'étude des mutants *nulls* d'*Arabidopsis* pour les gènes *FtsZ*, a montré plusieurs fonctions possibles de ces protéines. Afin de confirmer le rôle de FtsZ dans la mise en place des thylacoïdes et son association à ces membranes, des expériences supplémentaires peuvent être menées :

- Confirmer l'adressage de FtsZ aux thylacoïdes par délétion des régions putatives, pouvant permettre cet adressage ou par mutagenèse dirigée.
- Déterminer le rôle de FtsZ dans le mécanisme de mise en place des thylacoïdes en relation avec les enzymes de biosynthèse des lipides et les autres protéines déjà connues.

La fonction possible de FtsZ dans la biosynthèse du grain d'amidon peut être également confirmée par la mise en évidence d'une interaction entre FtsZ et les enzymes impliqués dans la synthèse du grain d'amidon. Par ailleurs il sera intéressant de quantifier les transcrits des enzymes impliqués dans la synthèse du grain d'amidon, tel que l'ADP-glucose pyrophosphorylase, le GBSS (granule-bound synthase), le SBE (starch branching enzyme) dans les tissus des mutants *FtsZ*. Inversement il sera intéressant de quantifier l'expression des gènes *FtsZ* dans les mutants du métabolisme de l'amidon.

REFERENCES

REFERENCES

- Abdallah F, Salamini F and Leister D (2000) A prediction of the size and evolutionary origin of the proteome of chloroplasts of *Arabidopsis*. Trends Plant Sci 5: 141-142
- Aldridge C and Moller SG (2005) The plastid division protein AtMinD1 is a Ca²⁺-ATPase stimulated by AtMinE1. J Biol Chem 280: 31673-31678
- Archibald JM and Keeling PJ (2002) Recycled plastids: a 'green movement' in eukaryotic evolution. Trends Genet 18: 577-584
- Asano T, Yoshioka Y, Kurei S, Sakamoto W and Machida Y (2004) A mutation of the CRUMPLED LEAF gene that encodes a protein localized in the outer envelope membrane of plastids affects the pattern of cell division, cell differentiation, and plastid division in *Arabidopsis*. Plant J 38: 448-459
- Beech PL and Gilson PR (2000) FtsZ and organelle division in Protists. Protist 151: 11-16
- Bhattacharya D, Yoon HS and Hackett JD (2004) Photosynthetic eukaryotes unite: endosymbiosis connects the dots. Bioessays 26: 50-60
- Bhattacharya D, Archibald JM, Weber AP and Reyes-Prieto A (2007) How do endosymbionts become organelles? Understanding early events in plastid evolution. Bioessays 29: 1239-1246
- Birnboim H and Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res 7: 1513-1523
- Block M. A., Tewari A. K., Albrieux C., Marechal E. and Joyard J. (2002) The plant S-adenosyl-L-methionine:Mg-protoporphyrin IX methyltransferase is located in both envelope and thylakoid chloroplast membranes. Eur J Biochem 269: 240-248
- Block MA, Douce R, Joyard J and Rolland N (2007) Chloroplast envelope membranes: a dynamic interface between plastids and the cytosol. Photosynth Res 92: 225-244
- Boasson R and Laetsch WM (1969) Chloroplast Replication and Growth in Tobacco. Science 166: 749-751
- Bouck BJ (1962) Chromatophore development, pits, and other fine structure in the red alga, *Lomentaria baileyana* (Harv.) Farlow. J. Cell Biol. 12: 553-569
- Brocks JJ, Logan GA, Buick R and Summons RE (1999) Archean molecular fossils and the early rise of eukaryotes. Science 285: 1033-1036
- Cavalier-Smith T (2006) Cell evolution and Earth history: stasis and revolution. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 361: 969-1006
- Chaly N and Possingham JV (1981) Structure of constricted proplastids in meristematic plant tissues. Biol. Cell. 41: 203-210
- Chida Y and Ueda K (1991) Division of chloroplasts in a green alga, *trebouxia potteri*. Ann. Bot. 67: 435-442
- Clough SJ and Bent AF. (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. Plant J 16: 735-743
- Colletti KS, Tattersall EA, Pyke KA, Froelich JE, Stokes KD and Osteryoung KW (2000) A homologue of the bacterial cell division site-determining factor MinD mediates placement of the chloroplast division apparatus. Curr Biol 10: 507-516
- Dangeard P (1947) Cytologie végétale et cytologie générale. Paul Lechevalier, Paris
- Delwiche CF (1999) Tracing the thread of plastid diversity through the tapestry of life. Am. Nat. 154: S164-S177
- de Pater S, Caspers M., Kottenhagen M, Meima H, ter Stege R and de Vetten N (2006) Manipulation of starch granule size distribution in potato tubers by modulation of plastid division. Plant Biotechnol J 4: 123-134

- Din N, Quardokus EM, Sackett MJ and Brun YV (1998) Dominant C-terminal deletions of FtsZ that affect its ability to localize in *Caulobacter* and its interaction with FtsA. *Mol Microbiol* 27: 1051-1063
- Dinkins R, Reddy MS, Leng M and Collins GB (2001) Overexpression of the *Arabidopsis thaliana* MinD1 gene alters chloroplast size and number in transgenic tobacco plants. *Planta* 214: 180-188
- Dixon D, Cutt J and Klessing D (1995) In situ hybridization for the detection of RNA in plant tissues. In: P Maliga, D Klessig, A Cashmore, W Gruissem and J Varner (eds) *Methods in plant molecular biology* pp 111-139 Cold Spring Harbor laboratory Press, New York
- Douce R and Joyard J (1982) Purification of the chloroplast envelope. In: M Edelman, R. Hallick and NH Chua (eds) *Methods in chloroplast Molecular Biology* pp 239-256 Elsevier Science, Amsterdam
- Douce R, Holtz RB and Benson AA (1973) Isolation and properties of the envelope of spinach chloroplasts. *J Biol Chem* 248: 7215- 7222
- Doolittle WF (2000) The nature of the universal ancestor and the evolution of the proteome. *Curr Opin Struct Biol* 10: 355-358
- Douglas SE, Murphy CA, Spencer DF and Gray MW (1991) Cryptomonad algae are evolutionary chimaeras of two phylogenetically distinct unicellular eukaryotes. *Nature* 350: 148-151
- Douglas SE (1998) Plastid evolution: origins, diversity, trends. *Curr Opin Genet Dev* 8: 655-661
- Douglas SE and Penny SL (1999) The plastid genome of the cryptophyte alga, *Guillardia theta*: complete sequence and conserved synteny groups confirm its common ancestry with red algae. *J Mol Evol* 48: 236-244
- Doutreligne J (1935) Note sur la structure des chloroplastes. *Porc Akad Wetensch Amsterd* 38: 886-896
- Duckett JG and Ligrone R (1993) Plastid-dividing rings in the liverwort *Odontoschisma denudatum* (Mart) Dum. (Jungermanniales, Hepaticae). *Gio Bot Ital* 127: 318-319
- Duckett JG and Ligrone R (1993) Plastid-dividing rings in ferns. *Ann Bot* 72: 619-627
- Dyall SD, Brown MT and Johnson PJ (2004) Ancient invasions: from endosymbionts to organelles. *Science* 304: 253-257
- El-Kafafi S, Mukherjee S, El-Shami M, Putaux JL, Block MA, Pignot-Paintrand I, Lerbs-Mache S and Falconet D (2005) The plastid division proteins, FtsZ1 and FtsZ2, differ in their biochemical properties and sub-plastidial localization. *Biochem J* 387: 669-676
- El-Shami M, El-Kafafi S, Falconet D and Lerbs-Mache S (2002) Cell cycle-dependent modulation of FtsZ expression in synchronized tobacco BY2 cells. *Mol Genet Genomics* 267: 254-261
- Esser C and Martin W (2007) Supertrees and symbiosis in eukaryote genome evolution. *Trends Microbiol* 15: 435-437
- Fasse-Franzisket (1955) Die teilung der proplastiden und choroplasten by *Agapanthus umbellatus* l'hérit. *Protoplasma* 45: 194-227
- Feinberg A and Vogelstein B (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem*, 132: 6-13
- Forterre P and Philippe H (1999) Where is the root of the universal tree of life? *Bioessays* 21: 871-879
- Forterre P and Gribaldo S (2007) The origin of modern terrestrial life. *HFSP Journal* 1: 156-168

- Forth D and Pyke KA (2006) The suffulta mutation in tomato reveals a novel method of plastid replication during fruit ripening. *J Exp Bot* 57: 1971-1979
- Fraser PD, Pinto ME, Holloway DE. and Bramley PM (2000) Technical advance: application of high-performance liquid chromatography with photodiode array detection to the metabolic profiling of plant isoprenoids. *Plant J* 24: 551-558
- Fujiwara MT, Nakamura A, Itoh R, Shimada Y, Yoshida S and Moller SG (2004) Chloroplast division site placement requires dimerization of the ARC11/AtMinD1 protein in Arabidopsis. *J Cell Sci* 117: 2399-2410
- Gaikwad A, Babbarwal V, Pant V and Mukherjee SK (2000) Pea chloroplast FtsZ can form multimers and correct the thermosensitive defect of an Escherichia coli ftsZ mutant. *Mol Gen Genet* 263: 213-221
- Gantt E and Arnott HJ (1963) Chloroplast division in the gametophyte of the fern *Matteucia struthiopteris* (L.) Todaro. *J Cell Biol* 19: 446-448
- Gao H, Kadirjan-Kalbach D, Froehlich JE and Osteryoung KW (2003) ARC5, a cytosolic dynamin-like protein from plants, is part of the chloroplast division machinery. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 4328-4333
- Gao H, Sage TL and Osteryoung KW (2006) FZL, an FZO-like protein in plants, is a determinant of thylakoid and chloroplast morphology. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 6759-6764
- Garton S, Knight H, Warren GJ, Knight MR and Thorlby GJ (2007) crinkled leaves 8 - a mutation in the large subunit of ribonucleotide reductase - leads to defects in leaf development and chloroplast division in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 50: 118-127
- Gibbs SP (1978) The chloroplast of *Euglena* may have evolved from symbiotic green algae. *Can J Bot* 56: 2883-2889
- Glynn JM, Miyagishima SY, Yoder DW, Osteryoung KW and Vitha S (2007) Chloroplast division. *Traffic* 8: 451-461
- Gray MW, Burger G and Lang BF (1999) Mitochondrial evolution. *Science* 283: 1476-1481
- Green PB (1964) Cinematic observations on the growth and division of chloroplasts in *Nitella*. *Am J Bot* 51: 334-342
- Gris JBA (1857) Recherches microscopiques sur la chlorophylle. *Ann Sci Nat Bot Ser IV* 7: 179-219
- Gunning B, Koenig F and Govindjee (2006) A dedication to pionners of research on chloroplast structure. In: Wise RR, Hooper, J.K. (eds) *The Structure and Function of Plastids*. pp xxiii - xxxi.
- Hale CA, Rhee AC and de Boer PA (2000) ZipA-induced bundling of FtsZ polymers mediated by an interaction between C-terminal domains. *J Bacteriol* 182: 5153-5166
- Hashimoto H (1986) Double ring structure around the constricting neck of dividing plastids of *Avena sativa*. *Protoplasma* 135: 166-172
- Hashimoto H and Possingham JV (1989) Division and DNA distribution in ribosome-deficient plastids of the barley mutant "albostrians". *Protoplasma* 149: 20-23
- Hashimoto H (1992) Involvement of actin filaments in chloroplast division of the alga *closterium ehrengergii*. *Protoplasma* 167: 88-96
- Hashimoto H (1997) Electron-opaque annular structure girdling the constriction isthmus of the dividing chloroplasts of *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae, Chromophyta). *Protoplasma* 197: 210-216
- Hashimoto H (2003) Plastid division: its origins and evolution. *Int Rev Cytol* 222: 63-98
- Hashimoto H (2005) The ultrastructural features and division of secondary plastids. *J Plant Res* 118: 163-172

- Haswell ES and Meyerowitz EM (2006) MscS-like proteins control plastid size and shape in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Biol* 16: 1-11
- Hayashida A, Takechi K, Sugiyama M, Kubo M, Itoh RD, Takio S, Fujita T, Hiwatashi Y, Hasebe M and Takano H (2005) Isolation of mutant lines with decreased numbers of chloroplasts per cell from a tagged mutant library of the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Biol (Stuttg)* 7: 300-306
- Heitz E (1936) Untersuchungen über den bau der plastiden. I. Die Gerichteteten chlorophyllscheiben der chloroplasten. *Planta* 26: 134-163
- Hollande AC and Hollande G (1941) La structure des chloroplastes. *Cell and Tissue Res.* 31: 648-652
- Hong Z, Bednarek SY, Blumwald E, Hwang I, Jurgens G, Menzel D, Osteryoung KW, Raikhel NV, Shinozaki K, Tsutsumi N and Verma DP (2003) A unified nomenclature for *Arabidopsis* dynamin-related large GTPases based on homology and possible functions. *Plant Mol Biol* 53: 261-265
- Hu Z, Mukherjee A, Pichoff S and Lutkenhaus J (1999) The MinC component of the division site selection system in *Escherichia coli* interacts with FtsZ to prevent polymerization. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 14819-14824
- Hurkman W-J and Tanaka CK (1986) Solubilization of plant membrane-proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis. *Plant Physiol.* 81: 802-806
- Iino M and Hashimoto H (2003) Intermediate features of cyanelle division of *Cyanophora paradoxa* (Glaucocystophyta) between cyanobacterial and chloroplast division. *J Phycol* 39: 561-569
- Inoue H, Nojima H and Okayama H (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plamids. *Gene* 96: 23-28
- Itoh R, Fujiwara M, Nagata N and Yoshida S (2001) A chloroplast protein homologous to the eubacterial topological specificity factor minE plays a role in chloroplast division. *Plant Physiol* 127: 1644-1655
- Kameya T and Takahashi N (1971) Division of chloroplast in vitro. *Jap J Genet* 46: 153-157
- Kanamaru K, Fujiwara M, Kim M, Nagashima A, Nakazato E, Tanaka K and Takahashi H (2000) Chloroplast targeting, distribution and transcriptional fluctuation of AtMinD1, a Eubacteria-type factor critical for chloroplast division. *Plant Cell Physiol* 41: 1119-1128
- Kausche GA and Ruska H (1940) Zur frage der chloroplastenstruktur. *Naturwiss* 28: 303-304
- Kato K, Matsumoto T, Koiwia A, Mizusaki S, Nishida K, Noguchi M and Tamaki E (1972) "Fermentation Technology Today" (G.Terui, ed.), Soc Ferment Technol, Osaka, Japan: 689-695
- Keeling PJ (2004) Diversity and evolutionary history of plastids and their hosts. *Am J Bot* 91: 1481-1493
- Klint J, Rasmussen U and Bergman B (2007) FtsZ may have dual roles in the filamentous cyanobacterium *Nostoc/Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J Plant Physiol* 164: 11-18
- Kirk JTO and Tilney-Bassett RAE (1978) The plastids: Their Chemistry, Structure, Growth and Inheritance. Amsterdam: Elsevier/North Holland Biochemical Press.
- Koksharova OA and Wolk CP (2002) A novel gene that bears a DnaJ motif influences cyanobacterial cell division. *J Bacteriol* 184: 5524-5528
- Koncz C, Mayerhofer R, Koncz-Kalman Z, Nawrath C, Reiss B, Redei G P and Schell J (1990) Isolation of a gene encoding a novel chloroplast protein by T-DNA tagging in *Arabidopsis thaliana*. *EMBO J* 9: 1337-1346

- Kulandaivelu G and Gnanam A (1985) Scanning electron microscope evidence for a budding mode of chloroplast multiplication in higher plants. *Physiol Plant* 63: 299-302
- Kuroiwa T (1989) The nuclei of cellular organelles and the formation of daughter organelles by the "plastid dividing ring". *Bot Mag* 102: 291-329
- Kuroiwa T, Kuroiwa H, Sakai A, Takahashi H, Toda K and Itoh R (1998) The division apparatus of plastids and mitochondria. *Int Rev Cytol* 181: 1-41
- Kuroiwa T (2000) The discovery of the division apparatus of plastids and mitochondria. *J Electron Microsc (Tokyo)* 49: 123-134
- Kusunoki S and Kawasaki Y (1936) Beobachtungen über die Chloroplastenteilung by einigen blütenpflanzen. *Cytologia* 7: 530-534
- Laemmli U. K. (1971) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- Larkum AW, Lockhart PJ and Howe CJ (2007) Shopping for plastids. *Trends Plant Sci* 12: 189-195
- Leech RM, Thomson WW and Platt-Aloia KA (1981) Observations of the mechanisms of chloroplast division in higher plants. *New Phytol.* 87: 1-9
- Leech RM and Pyke K (1988) Chloroplast division in higher plants with particular reference to wheat. In: Boffey SA and Lloyd D (eds) *The division and segregation of organelles*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp 31-62.
- Lemieux C, Otis C and Turmel M (2007) A clade uniting the green algae *Mesostigma viride* and *Chlorokybus atmophyticus* represents the deepest branch of the Streptophyta in chloroplast genome-based phylogenies. *BMC Biol* 5: 1-17
- Lindsay MR, Webb RI, Strous M, Jetten MS, Butler MK, Forde RJ and Fuerst JA (2001) Cell compartmentalisation in planctomycetes: novel types of structural organisation for the bacterial cell. *Arch Microbiol* 175: 413-429
- Liu Z, Mukherjee A and Lutkenhaus J (1999) Recruitment of ZipA to the division site by interaction with FtsZ. *Mol Microbiol* 31: 1853-1861
- Low HH and Lowe J (2006) A bacterial dynamin-like protein. *Nature* 444: 766-769
- Luck BT and Jordan EG (1980) The Mitochondria and Plastids During Microsporogenesis in *Hyacinthoides non-scripta* (L.) Chouard. *Ann Bot (Lond)* 45: 511-514
- Lumière A (1919) *Le mythe des symbiotes*. Masson & Cie, Paris
- Lutkenhaus J and Addinall SG (1997) Bacterial cell division and the Z ring. *Ann Rev Biochem* 66: 93-116
- Lutkenhaus J (2007) Assembly dynamics of the bacterial MinCDE system and spatial regulation of the Z ring. *Annu Rev Biochem* 76: 539-562
- Ma X and Margolin W (1999) Genetic and functional analyses of the conserved C-terminal core domain of *Escherichia coli* FtsZ. *J Bacteriol* 181: 7531-7544
- Machida M, Takechi K, Sato H, Chung SJ, Kuroiwa H, Takio S, Seki M, Shinozaki K, Fujita T, Hasebe M and Takano H (2006) Genes for the peptidoglycan synthesis pathway are essential for chloroplast division in moss. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 6753-6758
- Maple J, Chua NH and Moller SG (2002) The topological specificity factor AtMinE1 is essential for correct plastid division site placement in *Arabidopsis*. *Plant J* 31: 269-277
- Maple J, Fujiwara MT, Kitahata N, Lawson T, Baker NR, Yoshida S and Moller SG (2004) GIANT CHLOROPLAST 1 is essential for correct plastid division in *Arabidopsis*. *Curr Biol* 14: 776-781

- Maple J, Aldridge C and Moller SG (2005) Plastid division is mediated by combinatorial assembly of plastid division proteins. *Plant J* 43: 811-823
- Maple J and Moller SG (2007a) Plastid division coordination across a double-membraned structure. *FEBS Lett* 581: 2162-2167
- Maple J and Moller SG (2007b) Plastid division: evolution, mechanism and complexity. *Ann Bot (Lond)* 99: 565-579
- Maple J and Moller SG (2007c) Interdependency of formation and localisation of the Min complex controls symmetric plastid division. *J Cell Sci* 120: 3446-3456
- Maple J, Vojta L, Soll J and Moller SG (2007) ARC3 is a stromal Z-ring accessory protein essential for plastid division. *EMBO Rep* 8: 293-299
- Margolin W (2005) FtsZ and the division of prokaryotic cells and organelles. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 862-871
- Marin B, Nowack EC and Melkonian M (2005) A plastid in the making: evidence for a second primary endosymbiosis. *Protist* 156: 425-432
- Marrison JL, Rutherford SM, Robertson EJ, Lister C, Dean C and Leech RM (1999) The distinctive roles of five different ARC genes in the chloroplast division process in *Arabidopsis*. *Plant J* 18: 651-662
- Martin W and Kowallik KV (1999) Annotated English translation of Mereschkowsky's 1905 paper 'Über natur und ursprung der chromatophoren im pflanzenreiche'. *Eur. J. Phycol.* 34: 287-295
- 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
- Matsuzaki M, Kikuchi T, Kita K, Kojima S and Kuroiwa T (2001) Large amounts of apicoplast nucleoid DNA and its segregation in *Toxoplasma gondii*. *Protoplasma* 218: 180-191
- McCourt P, Kunst L, Browse J and Somerville CR (1987) The Effects of Reduced Amounts of Lipid Unsaturation on Chloroplast Ultrastructure and Photosynthesis in a Mutant of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 84: 353-360
- McFadden GI, Gilson PR and Waller RF (1995) Molecular phylogeny of chlorarachniophytes based on plastid rRNA and rbcL sequences. *Archiv Protistenk.* 145: 231-239
- McFadden GI and van Dooren GG (2004) Evolution: red algal genome affirms a common origin of all plastids. *Curr Biol* 14: R514-516
- Menke W (1940) Untersuchungen über den feinaufbau des protoplasts mit dem universal-elektronenmikroskop. *Protoplasma* 35: 115-130
- Mereschkowsky C (1905) Über natur und ursprung der chromatophoren im pflanzenreiche. *Biol. centralblatt* 25: 593-604. English translation in Martin, W., Kowallik, K. V. (1999). Annotated English translation of Mereschkowsky's 1905 paper 'Über natur und ursprung der chromatophoren im pflanzenreiche'. *Eur J Phycol*, 1934: 1287-1295
- Meyer A (1883) Das chlorophyllkorn in chemischer, morphologischer und biologischer Beziehung. S. Felix, Leipzig
- Mita T, Kanbe T, Tanaka T and Kuroiwa T (1986) A ring structure around the dividing plane of the *Cyanidium caldarium* chloroplast. *Protoplasma* 130: 211-213
- Mita T and Kuroiwa T (1988) Division of plastids by a plastid-dividing ring in *Cyanidium caldarium*. *Protoplasma Suppl* 1: 133-152

- Miyagishima S, Ito M, Toda K, Takabayashi A, Kuroiwa H and Kuroiwa T (1998) Identification of a triple ring structure involve in plastid division in the primitive red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *J. Electron Microsc* 47: 269-272
- Miyagishima S, Kuroiwa H and Kuroiwa T (2001a) The timing and manner of disassembly of the apparatuses for chloroplast and mitochondrial division in the red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *Planta* 212: 517-528
- Miyagishima S, Takahara M and Kuroiwa T (2001b) Novel filaments 5 nm in diameter constitute the cytosolic ring of the plastid division apparatus. *Plant Cell* 13: 707-721
- Miyagishima S, Takahara M, Mori T, Kuroiwa H, Higashiyama T and Kuroiwa T (2001c) Plastid division is driven by a complex mechanism that involves differential transition of the bacterial and eukaryotic division rings. *Plant Cell* 13: 2257-2268
- Miyagishima SY, Nishida K, Mori T, Matsuzaki M, Higashiyama T, Kuroiwa H and Kuroiwa T (2003) A plant-specific dynamin-related protein forms a ring at the chloroplast division site. *Plant Cell* 15: 655-665
- Miyagishima SY, Nozaki H, Nishida K, Nishida K, Matsuzaki M and Kuroiwa T (2004) Two types of FtsZ proteins in mitochondria and red-lineage chloroplasts: the duplication of FtsZ is implicated in endosymbiosis. *J Mol Evol* 58: 291-303
- Miyagishima SY, Froehlich JE and Osteryoung KW (2006) PDV1 and PDV2 mediate recruitment of the dynamin-related protein ARC5 to the plastid division site. *Plant Cell* 18: 2517-2530
- Miyagishima SY and Kuroiwa T (2006) The mechanism of plastid division: the structure and origin of the plastid division apparatus. In: Wise RR, Hooper, J.K. (eds) *The Structure and Function of Plastids*. pp 103-121
- Miyake NH and Taniguchi T (1995) Ultrastructural changes of chloroplasts in peanut mesophyll protoplasts treated with electric fields. *Jpn J Crop Sci* 64: 131-138
- Miyazawa Y., Sakai A., Miyagishima S., Takano H., Kawano S. and Kuroiwa T. (1999) Auxin and cytokinin have opposite effects on amyloplast development and the expression of starch synthesis genes in cultured bright yellow-2 tobacco cells. *Plant Physiol* 121: 461-469
- Modrusan Z and Wrisher M (1990) Studies on chloroplast division in young leaf tissues of some higher plants. *Protoplasma* 154: 1-7
- Moehs CP, Tian L, Osteryoung KW and Dellapenna D (2001) Analysis of carotenoid biosynthetic gene expression during marigold petal development. *Plant Mol Biol* 45: 281-293
- Moreira D, Le Guyader H and Philippe H (2000) The origin of red algae and the evolution of chloroplasts. *Nature* 405: 69-72
- Morrisson WR and Karkalas J (1990) Starch. In *Methods in plant biochemistry 2 Carbohydrates*: Dey P (eds), Academic Press, London
- Morlot C, Noirclerc-Savoye M, Zapun A, Dideberg O and Vernet T (2004) The D,D-carboxypeptidase PBP3 organizes the division process of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* 51: 1641-1648
- Mosyak L, Zhang Y, Glasfeld E, Haney S, Stahl M, Seehra J and Somers WS (2000) The bacterial cell-division protein ZipA and its interaction with an FtsZ fragment revealed by X-ray crystallography. *EMBO J* 19: 3179-3191
- Mühlethaler K (1960) Die Struktur der Grana- und Stroma-Lamellen in Chloroplasten. *Z. Wissensch. Mikroskopie* 8: 444-452
- Mu-Forster C, Huang R, Powers JR, Harriman RW, Knight M, Singletary GW, Keeling PL and Wasserman BP (1996) Physical association of starch biosynthetic enzymes with starch granules of maize endosperm. Granule-associated forms of starch synthase I and starch branching enzyme II. *Plant Physiol* 111: 821-829

- Nass S and Nass MMK (1963) Intramitochondrial fibers with DNA characteristics. *J of Cell Biology* 19: 613-628
- Nisbet EG and Sleep NH (2001) The habitat and nature of early life. *Science* 409: 1083-1091
- Nogales E, Wolf SG and Downing KH (1998) Structure of the alpha beta tubulin dimer by electron crystallography. *Nature* 391: 199-203.
- Nägeli C (1846) Bläschenförmige gebilde im inhalte der pflanzenzelle. *Z Wiss Bot* 3/4: 94-128
- Ogawa S, Ueda K and Noguchi T (1995) Division apparatus of the chloroplast in *Nannochloris Bacillaris* (Chlorophyta). *J. Phycol.* 31: 132-137
- Oross JW and Possingham JV (1989) Ultrastructural features of the constricted region of dividing plastids. *Protoplasma* 150: 131-138
- Osteryoung KW and Vierling E (1995) Conserved cell and organelle division. *Nature* 376: 473-474
- Osteryoung KW, Stokes KD, Rutherford SM, Percival AL and Lee WY (1998) Chloroplast division in higher plants requires members of two functionally divergent gene families with homology to bacterial ftsZ. *Plant Cell* 10: 1991-2004
- Osteryoung KW and McAndrew RS (2001) The Plastid Division Machine. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 52: 315-333
- Palmer JD (2003) The symbiotic birth and spread of plastids: how many times and whodunit? *J. Phycol.* 39: 4-11
- Poole AM and Penny D (2007a) Evaluating hypotheses for the origin of eukaryotes. *Bioessays* 29: 74-84
- Poole AM and Penny D (2007b) Eukaryote evolution: engulfed by speculation. *Nature* 447: 913
- Portier P (1918) Symbiotes, mitochondries, bactéries. Masson et Cie, Paris, 44-98 p.
- Possingham JV and Saurer W (1969) Change in chloroplast number per cell during leaf development in spinach. *Planta* 86: 186-194
- Possingham JV and Lawrence ME (1983) controls to plastid division. *Int Rev Cytol* 84: 1-56
- Praefcke GJ and McMahon HT (2004) The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 133-147
- Pyke KA and Leech RM (1991) Rapid Image Analysis Screening Procedure for Identifying Chloroplast Number Mutants in Mesophyll Cells of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Physiol* 96: 1193-1195
- Ral JP, Derelle E, Ferraz C, Wattedled F, Farinas B, Corellou F, Buleon A, Slomianny MC, Delvalle D, d'Hulst C, Rombauts S, Moreau H and Ball S (2004) Starch division and partitioning. A mechanism for granule propagation and maintenance in the picophytoplanktonic green alga *Ostreococcus tauri*. *Plant Physiol* 136: 3333-3340
- Randolf LF (1922) Cytology of chlorophyll type of maize. *Bot Gaz* 73: 337-375
- Raskin DM and de Boer PA (1999) Rapid pole-to-pole oscillation of a protein required for directing division to the middle of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 4971-4976
- RayChaudhuri D (1999) ZipA is a MAP-Tau homolog and is essential for structural integrity of the cytokinetic FtsZ ring during bacterial cell division. *EMBO J* 18: 2372-2383
- Raynaud C, Cassier-Chauvat C, Perennes C and Bergounioux C (2004) An *Arabidopsis* homolog of the bacterial cell division inhibitor Sula is involved in plastid division. *Plant Cell* 16: 1801-1811

- Raynaud C, Perennes C, Reuzeau C, Catrice O, Brown S and Bergounioux C (2005) Cell and plastid division are coordinated through the prereplication factor AtCDT1. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 8216-8221
- Reddy MS, Dinkins R and Collins GB (2002) Overexpression of the *Arabidopsis thaliana* MinE1 bacterial division inhibitor homologue gene alters chloroplast size and morphology in transgenic *Arabidopsis* and tobacco plants. *Planta* 215: 167-176
- Reumann S, Inoue K and Keegstra K (2005) Evolution of the general protein import pathway of plastids (review). *Mol Membr Biol* 22: 73-86
- Reyes-Prieto A, Weber APM and Bhattacharya D (2007) The origin and establishment of the plastid in algae and plants. *Annu Rev Genet* 41: 147-168
- Ridley SM and Leech RM (1970) Division of chloroplasts in an artificial environment. *Nature* 227: 463-465
- Ris H and Plaut W (1962) Ultrastructure of DNA-containing areas in the chloroplast of *Chlamydomonas*. *J of Cell Biology* 19: 383-391
- Romberg L and Levin PA (2003) Assembly dynamics of the bacterial cell division protein FTSZ: poised at the edge of stability. *Annu Rev Microbiol* 57: 125-154
- Sagan LLM (1967) On the origin of mitosing cells. *J. Theor. Biol.* 14: 225-275
- Sakr S, Jeanjean R, Zhang CC and Arcondeguy T (2006) Inhibition of cell division suppresses heterocyst development in *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J Bacteriol* 188: 1396-1404
- Sambrook J., Fritsch E. F. and Maniatis T. (1989) *Molecular cloning: A Laboratory Manual*
- Sapp J (1994) *Evolution by association: A history of symbiosis*. Oxford University Press, New York and Oxford
- Sato N (2006) Origin and Evolution of plastids: genomic view on the unification and diversity of plastids. In: Wise RR, Hooper, J.K. (eds) *The Structure and Function of Plastids*. pp 75-102.
- Schimper AFW (1883) Über die Entwicklung der Chlorophyllkörner und Farbkörper. *Bot Zeit* 41: 105-112
- Schimper AFW (1885) Untersuchungen über die chlorophyllkörner und die ihnen homologen gebilde. *Jb Wiss Botan* 16: 1-247
- Schmitz FKJ (1883) Die chromatophoren der algen. *Verh. Naturhist. Ver. preuß. Rheinland und Westfalen* 40: 1-180
- Schopf JW (2006) Fossil evidence of Archaean life. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361: 869-885
- Scott NS, Cain P and Possingham JV (1982) Plastid DNA levels in albino and green leaves of the “albostrians” mutant of *Hordeum vulgare*. *Z Pflanzenphysiol* 108: 187-191
- Sharp LW (1934) *Introduction to cytology*. New York
- Shimada H, Koizumi M, Kuroki K, Mochizuki M, Fujimoto H, Ohta H, Masuda T and Takamiya K (2004) ARC3, a chloroplast division factor, is a chimera of prokaryotic FtsZ and part of eukaryotic phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase. *Plant Cell Physiol* 45: 960-967
- Staff IA and Parthasarathy MV (1984) The possibility of cell plate-induced plastid division in a flowering plant. *New Phytol* 97: 77-82
- Steahelin LA (2003) Chloroplast structure: from chlorophyll granules to supra-molecular architecture of thylakoid membranes. *Photosynth Res* 76: 185-196
- Strepp R, Scholz S, Kruse S, Speth V and Reski R (1998) Plant nuclear gene knockout reveals a role in plastid division for the homolog of the bacterial cell division protein FtsZ, an ancestral tubulin. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 4368-4373

- Striepen B, Crawford MJ, Shaw MK, Tilney LG, Seeber F and Roos DS (2000) The plastid of *Toxoplasma gondii* is divided by association with the centrosomes. *J Cell Biol* 151: 1423-1434
- Strugger S (1950) Über den Bau der Proplastiden und Chloroplasten. *Naturwissenschaften* 37: 166-167
- Strugger S (1957) Elektronenmikroskopische beobachtungen über die teilung der proplastiden im urmeristem der wurzelspitze von *Allium cepa*. *Z Naturforsch* 12b: 280-283
- Summons RE, Jahnke LL, Hope JM and Logan GA (1999) 2-Methylhopanoids as biomarkers for cyanobacterial oxygenic photosynthesis. *Nature* 400: 554-557
- Suzuki KI and Ueda R (1975) Electron microscope observations on plastid division in root meristematic cells of *Pisum sativum* L. *Bot Mag Tokyo* 88: 319-321
- Swain M and Ross NW (1995) A silver stain protocol for proteins yielding high resolution and transparent background in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 16: 948-951
- Tavva VS, Collins GB and Dinkins RD (2006) Targeted overexpression of the *Escherichia coli* MinC protein in higher plants results in abnormal chloroplasts. *Plant Cell Rep* 25: 341-348
- Tewinkel M and Volkmann D (1987) Observations on dividing plastids in the protonema of the moss *Funaria hygrometrica*. *Planta* 172: 309-320
- Trécul AAL (1858) Des formations vésiculaires dans les cellules végétales. *Ann Sci Nat Bot Ser IV* 8: 20-163, 205-382
- Ueda R, Tominga S and Tanuma T (1970) cinematographic observations on the chloroplast division in *Mnium* leaf cells. *Science Report of the Tokyo Daigaku, Section B* 14: 129-137
- Vaughan S, Wickstead B, Gull K and Addinall SG (2004) Molecular evolution of FtsZ protein sequences encoded within the genomes of archaea, bacteria, and eukaryota. *J Mol Evol* 58: 19-29
- Vicente M, Rico AI, Martinez-Arteaga R and Mingorance J (2006) Septum enlightenment: assembly of bacterial division proteins. *J Bacteriol* 188: 19-27
- Vitha S, Froehlich JE, Koksharova O, Pyke KA, van Erp H and Osteryoung KW (2003) ARC6 is a J-domain plastid division protein and an evolutionary descendant of the cyanobacterial cell division protein Ftn2. *Plant Cell* 15: 1918-1933
- von Wettstein D (1954) Formwechsel und teilung der chromatophoren von *Fucus vesiculosus* (translation: form change and division of the chromatophore of *Fucus vesiculosus*). *Z Naturforsch* 9B: 476-481
- Wakasugi T, Nagai T, Kapoor M, Sugita M, Ito M, Ito S, Tsudzuki J, Nakashima K, Tsudzuki T, Suzuki Y, Hamada A, Ohta T, Inamura A, Yoshinaga K and Sugiura M (1997) Complete nucleotide sequence of the chloroplast genome from the green alga *Chlorella vulgaris*: the existence of genes possibly involved in chloroplast division. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 5967-5972
- Wallin IE (1927) symbiogenesis and the origin of species. Williams and Wilkins, Baltimore
- Wang X, Huang J, Mukherjee A, Cao C and Lutkenhaus J (1997) Analysis of the interaction of FtsZ with itself, GTP, and FtsA. *J Bacteriol* 179: 5551-5559
- Wang Q, Sullivan RW, Kight A, Henry RL, Huang J, Jones AM and Korth KL (2004) Deletion of the chloroplast-localized Thylakoid formation1 gene product in *Arabidopsis* leads to deficient thylakoid formation and variegated leaves. *Plant Physiol* 136: 3594-3604

- Weatherill K, Lambiris I, Pickett-Heaps J, Deane JA and Beech PL (2007) Plastid division in *Mallomonas* (Synurophyceae, Heterokonta). *J Phycol* 43: 535-541
- WeiZhong L, Yong H, RunJie Z, WeiWei Z, YiaYing Z, XiangLin L and YiKun H (2007) Transfer of a eubacteria-type cell division site-determining factor CrMinD gene to the nucleus from the chloroplast genome in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Chin. Sci. Bull.* 52: 2514-2521
- Whatley JM (1988) Mechanism and morphology of plastid division. In: Boffey SA and Lloyd D (eds) *The division and segregation of organelles*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp 63-83
- Woese C (1998) The universal ancestor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 6854-6859
- Yan K, Pearce KH and Payne DJ (2000) A conserved residue at the extreme C-terminus of FtsZ is critical for the FtsA-FtsZ interaction in *Staphylococcus aureus*. *Biochem Biophys Res Commun* 270: 387-392
- Yoon HS, Hackett JD, Ciniglia C, Pinto G and Bhattacharya D (2004) A molecular timeline for the origin of photosynthetic eukaryotes. *Mol Biol Evol* 21: 809-818
- Yoshida Y, Kuroiwa H, Misumi O, Nishida K, Yagisawa F, Fujiwara T, Nanamiya H, Kawamura F and Kuroiwa T (2006) Isolated chloroplast division machinery can actively constrict after stretching. *Science* 313: 1435-1438
- Yuasa A (1949) Studies in the cytology of Pteridophyta. *Jpn J Genet* 24: 166-173